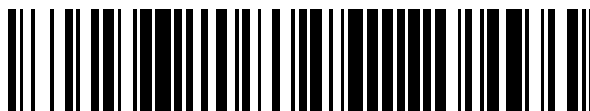


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 217**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2008 E 08732595 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2129680**

54 Título: **Composiciones combinadas antisentido de horquilla y métodos para modular la expresión**

30 Prioridad:

21.03.2007 US 896212 P

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

18.06.2015

73 Titular/es:

**BROOKHAVEN SCIENCE ASSOCIATES, LLC
(100.0%)
BUILDING 475D
UPTON, NY 11973-5000, US**

72 Inventor/es:

**SHANKLIN, JOHN y
NGUYEN, TAM**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 538 217 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

Composiciones combinadas antisentido de horquilla y métodos para modular la expresión.

Antecedentes

- 5 La supresión antisentido se refiere al enlazamiento de una cadena "antisentido" de un ácido nucleico a un gen o ARNm, previniendo de esta manera la expresión del gen o la traducción del ARNm. Típicamente, para la supresión antisentido, está diseñado un casete de expresión para expresar una molécula de ARN complementaria a todo o parte de un ARNm que codifica un objetivo. La sobreexpresión de la molécula ARN antisentido puede dar como resultado una expresión reducida del gen nativo.
- 10 El polinucleótido para uso en la supresión antisentido puede corresponder a todo o parte del complemento de la secuencia que codifica el objetivo, la totalidad o parte del complemento de la 5' y/o 3' región no traducida del transcripto objetivo, y/o la totalidad o parte del complemento de tanto la secuencia de codificación como de las regiones no traducidas de un transcripto que codifica el objetivo. Además, el polinucleótido antisentido puede ser totalmente complementario (esto es, 100% idéntico al complemento de la secuencia objetivo) o parcialmente complementario (esto es, menos del 100% idéntico al complemento de la secuencia objetivo) a la secuencia objetivo. La supresión antisentido puede utilizarse para inhibir la expresión de múltiples proteínas en la misma célula u organismo, como se describe, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos N° 5,952,657. Adicionalmente, porciones de los nucleótidos antisentido pueden ser utilizados para interrumpir la expresión del gen objetivo. Generalmente, se pueden utilizar secuencias de al menos 50, 100, 200, 300, 500, o 550 nucleótidos. Métodos para utilizar supresión antisentido para inhibir la expresión de genes endógenos en plantas se describen, por ejemplo, en Liu et al (2002) *Plant Physiol.* 129:1732-1753 y Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,759,829 y 5,952,657. La eficiencia de la supresión antisentido puede ser incrementada mediante la inclusión de una región poli-dT en el casete de expresión en una posición 3' con respecto a la secuencia antisentido y 5' de la señal de poliadenilación. Véase, la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20020058815.
- 15 La interferencia de ARN se refiere al proceso de silenciamiento génico postranscripcional específico para la secuencia en los animales mediado por los ARN de interferencia corto (ARNsi) (Fire et al, 1998, *Nature*, 391, 806; Hamilton et al, 1999, *Science*, 286, 950-951). El proceso correspondiente en plantas se denomina comúnmente como silenciamiento génico postranscripcional o silenciamiento de ARN, y también se conoce como sofocamiento en hongos. Se cree que el proceso de silenciamiento génico postranscripcional es un mecanismo de defensa celular conservado evolutivamente usado para evitar la expresión de genes foráneos y es comúnmente compartido por diversa flora y filum (Fire et al., 1999, *Trends Genet.*, 15, 358). Tal protección de expresión génica foránea puede haber evolucionado en respuesta a la expresión de los ARN de cadena doble (ARNds) derivados de la infección viral o de la integración aleatoria de elementos transposón en un genoma anfitrión a través de una respuesta celular que destruye específicamente ARN de cadena sencilla o ARN genómico viral homólogos. La presencia del ARNds en células desencadena la respuesta de iARN a través de un mecanismo que aún tiene que ser caracterizado completamente. Este mecanismo parece ser diferente de la respuesta del interferón que resulta de la activación mediada por ARNds de la proteína quinasa PKR y 2', 5'-oligoadenilato sintetasa dando como resultado la escisión no específica del ARNm por la ribonucleasa L.
- 20 La presencia de los ARNds largos en las células estimula la actividad de una enzima ribonucleasa III denominada como dícer. La dícer está involucrada en el procesamiento del ARNds en piezas cortas del ARNds conocido como los ARN de interferencia corto (ARNsi) (Hamilton et al, supra; Bernstein et al, 2001, *Nature*, 409, 363). Los ARN de interferencia corto derivados de la actividad de las dícer son típicamente de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud y comprenden aproximadamente 19 pares de bases dobles (Hamilton et al., supra; Elbashir et al., 2001, *Genes Dev.*, 15,188). La dícer también ha sido implicado en la escisión de los ARN temporales pequeños de 21- y 22- nucleótidos (ARNst) a partir de ARN precursor de estructura conservada que está implicado en el control de traducción (Hutvagner et al., 2001, *Science*, 293,834). La respuesta de la iARN también representa un complejo de endonucleasa, comúnmente preferido como un complejo silenciador inducido por ARN (RISC), que media la escisión de ARN de cadena sencilla que tiene secuencia complementaria a la cadena antisentido del ARNsi dúplex. La escisión del ARN objetivo tiene lugar en el medio de la región complementaria a la cadena antisentido del ARNsi dúplex (Elbashir et al., 2001, *Genes Dev*, 15,188).
- 25 La iARN ha sido estudiada en una variedad de sistemas. Fire et al., 1998, *Nature*, 391, 806, fueron los primeros en observar la iARN en *C. elegans*. Bahramian and Zarbl, 1999, *Molecular and Cellular Biology*, 19, 274-283 y Wianny y Goetz, 1999, *Nature Cell Biol.*, 2, 70, describen la iARN mediada por ARnds en sistemas de mamíferos. Hammond et al., 2000, *Nature*, 404, 293, describen la iARN en células de *Drosophila* transfectadas con ARnds. Elbashir et al., 2001, *Nature*, 411,494, describen la iARN inducida por la introducción de dúplex de ARNs de 21 nucleótidos sintéticos en células de mamífero cultivadas incluyendo células de riñón embrionario humano y de HeLa y. Métodos para utilizar la interferencia por ARnds para inhibir la expresión de genes vegetales endógenos se describen en Waterhouse et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13959-13965, Liu et al. (2002) *Plant Physiol.* 129:1732-1753, y WO 99/59029, WO 99/53050, WO 99/61631, y WO 00/59035.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

Se han descrito métodos de iARN adicionales relacionados con la inhibición de la expresión de uno o más objetivos obtenidos por interferencia por ARN de horquilla (ANRhp) o interferencia por ARN de horquilla que contiene intrones (ARNhpi). Estos métodos son altamente eficientes en la inhibición de la expresión de genes endógenos. Véase, Waterhouse and Helliwell (2003) Nat. Rev. Genet. 5:29-38 y las referencias citadas allí.

- 5 Para la interferencia por ARNhp, el casete de expresión está diseñado para expresar una molécula de ARN que hibrida consigo misma para formar una estructura de horquilla que comprende una región de bucle de cadena sencilla y un tallo de bases apareadas. La región del tallo de bases apareadas comprende una secuencia en sentido que corresponde a todo o parte del ARN mensajero endógeno que codifica el gen cuya expresión va a ser inhibida, y una secuencia antisentido que es total o parcialmente complementaria a la secuencia sentido. Así, la región de tallo de bases apareadas de la molécula determina generalmente la especificidad de la interferencia por ARN. Las moléculas de ARNhp son altamente eficientes en la inhibición de la expresión de genes endógenos, y la interferencia por ARN que las inducen es heredada por generaciones subsecuentes. Véanse, por ejemplo, Chuang and Meyerowitz (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:5985- 5990; Stoutjesdijk et al. (2002) Plant Physiol. 129:1723-1731; y Waterhouse and Helliwell (2003) Nat. Rev. Genet. 5:29-38. Métodos para utilizar la interferencia por ARNhp para inhibir o silenciar la expresión de genes se describen, por ejemplo, en Chuang and Meyerowitz (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:5985- 5990; Stoutjesdijk et al. (2002) Plant Physiol. 129:1723-1731; Waterhouse and Helliwell (2003) Nat. Rev. Genet. 5:29-38; Pandolfini et al. BMC Biotechnology 3:7, y la Publicación de Patente de Estados Unidos No. 20030175965. Un ensayo transiente para la eficiencia de los constructos de ARNhp para silenciar la expresión de genes *in vivo* ha sido descrito por Panstruga et al. (2003) Mol. Biol. Rep. 30: 135-150.
- 10
- 15
- 20 Para el ARNihp, las moléculas que interfieren tienen la misma estructura general que para el ARNhp, pero la molécula de ARN comprende además un intrón que es capaz de ser empalmado en la célula en la cual se expresa el ARNihp. El uso de un intrón minimiza el tamaño del bucle en la molécula de ARN de horquilla después del empalme, lo que incrementa la eficiencia de la interferencia. Véase, por ejemplo, Smith et al. (2000) Nature 507:319-320. De hecho, Smith et al., muestra 100% de supresión de la expresión genética endógena usando interferencia mediada por ARNihp. Métodos para utilizar la interferencia por ARNihp para inhibir la expresión de genes se describen, por ejemplo, en Smith et al. (2000) Nature 507:319-320; Wesley et al. (2001) Plant J. 27:581-590; Wang and Waterhouse (2001) Curr. Opin. Plant Biol. 5:156-150; Waterhouse and Helliwell (2003) Nat. Rev. Genet. 5:29-38; Helliwell and Waterhouse (2003) Methods 30:289-295, y la Publicación de Patente de Estados Unidos No. 20030180955.
- 25
- 30 Otros han informado en diversos sistemas de iARN y de silenciamiento de genes. Por ejemplo, Parrish et al., 2000, Molecular Cell, 6, 1077-1087, describen constructos específicos de ARNsi modificados químicamente dirigidos al gen *unc-22* de *C. elegans*. Grossniklaus, Publicación Internacional PCT N° WO 01/38551, describe ciertos métodos para regular la expresión génica de peine múltiple en plantas utilizando ciertos ARNds. Churikov et al., Publicación Internacional PCT No. WO 01/42443, describen ciertos métodos para modificar las características genéticas de un organismo usando ciertos ARNds. Cogoni et al., Publicación Internacional PCT N° WO 01/53475, describen ciertos métodos para aislar un gen de silenciamiento de *Neurospora* y usos de los mismos. Reed et al., Publicación Internacional PCT N° WO 01/68836, describen ciertos métodos para silenciamiento de genes en las plantas. Honer et al., Publicación Internacional PCT N° WO 01/70944, describen ciertos métodos de selección de fármacos utilizando nematodos transgénicos como modelos de la enfermedad de Parkinson utilizando ciertos ARNds. Deak et al., Publicación Internacional PCT N° WO 01/72774, describen ciertos productos génicos derivados de la *Drosophila* que pueden estar relacionados con iARN en *Drosophila*. Arndt et al., Publicación Internacional PCT N° WO 01/92513, describen ciertos métodos para mediar la supresión génica mediante el uso de factores que mejoran la iARN. Tuschl et al., Publicación Internacional PCT N° WO 02/44321, describen ciertos constructos de ARNip sintéticos. Pachuk et al, Publicación Internacional PCT N° WO 00/63364, y Satish Chandran et al., Publicación Internacional PCT N° WO 01/04313, describen ciertos métodos y composiciones para inhibir la función de ciertas secuencias de polinucleótidos utilizando ciertos ARNds. Echeverri et al., Publicación Internacional PCT N° WO 02/38805, describen ciertos genes de *C. elegans* identificados a través de iARN. Kreutzer et al., Publicaciones Internacionales PCT Nos. WO 02/055692, WO 02/055693, y EP 1144623 B1 describen ciertos métodos para inhibir la expresión génica utilizando iARN. Graham et al., Publicaciones Internacionales PCT Nos. WO 99/49029 y WO 01/70949, y AU 4037501 describen ciertos vectores expresados de moléculas de ARNsi. Fire et al., Patente de Estados Unidos No. 6,506,559, describen ciertos métodos para inhibir la expresión génica *in vitro* utilizando ciertos constructos de ARNds largos (mayor de 25 nucleótidos) que median la iARN.
- 35
- 40
- 45
- 50

Aunque se ha hecho mucho trabajo en el área de silenciamiento génico usando la iARN y tecnologías antisentido, las mejoras que permiten incrementar la modulación de la expresión génica sobre la iARN o la tecnología antisentido serían una mejora en la técnica.

55

Divulgación de la invención

La presente invención provee un método para regular la expresión, comprendiendo el método: proveer a una célula un constructo de nucleótidos, en donde dicho constructo de nucleótidos comprende: una primera y una segunda secuencia de nucleótidos que hibridan para formar el tallo de una estructura tallo-bucle, y una tercera secuencia de nucleótidos dispuesta entre las primera y segunda secuencias de nucleótidos, y los sitios de empalme

60

- operacionalmente colocados y orientado de tal manera que permita la escisión de la porción de bucle de la estructura de tallo-bucle de la porción del tallo de la estructura de tallo-bucle, en donde las primera y segunda secuencias de nucleótidos, cuando son apareadas, generan un ácido nucleico de interferencia pequeño que modula la expresión de un objetivo, en donde la tercera secuencia de nucleótidos es de longitud suficiente para permitir que
- 5 las primera y segunda secuencias de nucleótidos se apareen de forma estable una con otra, y en donde la tercera secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos antisentido capaces de modular la expresión de un objetivo a través de la supresión antisentido, y en donde el objetivo modulada por la secuencia de nucleótidos antisentido y el objetivo modulada por el ácido nucleico de interferencia pequeña puede ser el mismo o diferente; y cultivar dicha célula.
- 10 En una realización un constructo de nucleótidos, comprende: una secuencia de nucleótidos que forma un tallo y un bucle; en donde el bucle comprende una primera secuencia de nucleótidos que modula la expresión de un objetivo; en donde el tallo comprende una segunda secuencia de nucleótidos que modula la expresión de un objetivo; y en donde el objetivo modulado por la primera secuencia de nucleótidos y el objetivo modulado por la segunda secuencia de nucleótidos pueden ser el mismo o diferente.
- 15 En una realización de ejemplo adicional, la primera secuencia de nucleótidos que modula la expresión de un objetivo modula la expresión del objetivo a través de la ruta de la iARN. En una realización de ejemplo adicional, la primera secuencia de nucleótidos que modula la expresión de un objetivo modula la expresión del objetivo a través de modulación antisentido de la expresión.
- 20 En una realización particular un constructo de nucleótidos, comprende: una secuencia de nucleótidos que forma un tallo y un bucle; y un gen de interés enlazado operativamente a un promotor, en donde el tallo comprende una segunda secuencia de nucleótidos que modula la expresión de un objetivo; y en donde el bucle comprende una primera secuencia de nucleótidos que pueden o pueden no modular la expresión de un objetivo. En una realización de ejemplo adicional, el gen de interés enlazado operativamente a un promotor está localizado en el bucle.
- 25 Otra realización provee un vector que comprende las secuencias que codifican las secuencias de nucleótidos, como se describió previamente. Una realización alternativa provee un vector que comprende un promotor enlazado operativamente a una secuencia que codifica una secuencia de nucleótidos que forma un tallo y un bucle; en donde el bucle comprende una primera secuencia de nucleótidos que modula la expresión de un objetivo; y en donde el tallo comprende una segunda secuencia de nucleótidos que modula la expresión de un objetivo.
- 30 Una realización de ejemplo provee un método para regular la expresión de un objetivo, comprendiendo el método: proveer a una célula una secuencia que comprende una secuencia de nucleótidos que forma un tallo y un bucle; en donde el bucle comprende una primera secuencia de nucleótidos que modula la expresión del objetivo; y en donde el tallo comprende una segunda secuencia de nucleótidos que modula la expresión del objetivo; y cultivar dicha célula.
- 35 Una realización de ejemplo provee un método para regular la expresión de un objetivo, comprendiendo el método proveer a una célula un vector que comprende un promotor enlazado operativamente a una secuencia que codifica una secuencia de nucleótidos que forma un tallo y un bucle; en donde el bucle comprende una primera secuencia de nucleótidos que modula la expresión del objetivo; y en donde el tallo comprende una segunda secuencia de nucleótidos que modula la expresión del objetivo; y expresar la secuencia de nucleótidos de dicho vector en dicha célula.
- 40 Otra realización provee un método para tratar una condición en un sujeto que comprende administrar al sujeto la secuencia descrita previamente que comprende la secuencia de nucleótidos que forma un tallo y un bucle. Una realización particular comprende administrar al sujeto un vector que comprende un promotor enlazado operativamente a una secuencia que codifica una secuencia de nucleótidos que forma un tallo y un bucle.
- 45 Una realización particular provee un medicamento que comprende: una secuencia que comprende una secuencia de nucleótidos que forma un tallo y un bucle; en donde el bucle comprende una primera secuencia de nucleótidos que modula la expresión de un objetivo; y en donde el tallo comprende una segunda secuencia de nucleótidos que modula la expresión de un objetivo, y un vehículo, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptables. Una realización alternativa provee un medicamento que comprende una secuencia que comprende un vector que incluye un promotor enlazado operativamente a una secuencia que codifica una secuencia de nucleótidos que forma un tallo
- 50 y un bucle.
- Una realización de ejemplo provee una célula que comprende la secuencia de nucleótidos descrita previamente que forma un tallo y un bucle. Una realización alternativa comprende proveer una célula que comprende un vector que incluye un promotor enlazado operativamente a una secuencia que codifica una secuencia de nucleótidos que forma un tallo y un bucle.
- 55 Una realización ejemplo provee un método para hacer un constructo para regular un objetivo, comprendiendo el método: combinar en una secuencia de ácidos nucleicos individual una primera y segunda secuencia capaces de

5 apareamiento de bases para formar una estructura tallo-bucle en el constructo; y una tercera secuencia, dispuesta entre las primera y segunda secuencias; en donde dichas primera y segunda secuencias, cuando la base está apareada, son capaces de generar un ARNsi; en donde dicha tercera secuencia es de longitud suficiente para permitir que las primera y segunda secuencias se apareen de manera estable una con otra; y en donde dicha tercera secuencia comprende una secuencia capaz de modular un objetivo a través de la supresión antisentido.

10 Una realización de ejemplo provee un método para hacer un constructo para la regulación de un objetivo, comprendiendo el método: combinar en una secuencia de ácidos nucleicos individual una primera y segunda secuencia capaces de apareamiento de bases para formar una estructura tallo-bucle en el constructo; una tercera secuencia, dispuesta entre las primera y segunda secuencias; y una cuarta secuencia que comprende un gen de interés enlazado operativamente a un promotor; en donde dichas primera y segunda secuencias, cuando la base está apareada, son capaces de generar un ARNsi; en donde dicha tercera secuencia es de longitud suficiente para permitir que las primera y segunda secuencias se apareen de manera estable una con otra; y en donde dicha tercera secuencia puede o puede no comprender una secuencia capaz de modular un objetivo a través de la supresión antisentido.

15 Otra realización provee un método para producir una planta con niveles modificados de ácidos grasos de componente endógeno. El método incluye la modulación de los niveles de un gen heterólogo, tal como una síntesis de ácido graso o un gen del metabolismo lipídico.

20 La presente invención puede además ser utilizada en combinación con diversas metodologías de silenciamiento de genes utilizando iARN y tecnologías antisentido que son conocidas en la técnica para proveer modulación incrementada de la expresión génica adaptada a uno o más genes específicos y/o rutas genéticas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación gráfica de los constructos pPHAS-Fab1-AS, pPHAS-Fab1-HP, y pPHASFab1-HPAS.

25 La Figura 2 es una representación gráfica de los constructos pPHAS-Fad2-AS, pPHAS-Fad2-HP, pPHAS-Fad2-HPAS, y pPHAS-Fad2-HP-GUS.

La Figura 3 es una representación gráfica de los constructos pPHAS-Fad3-AS, pPHAS-Fad3-HP, y pPHASFad3-HPAS.

La Figura 4 es un diagrama que muestra cómo el constructo pPHAS-Fab1-HPAS puede ser procesado en una célula para modular la expresión de Fab1.

30 La Figura 5 es un diagrama esquemático de la producción de ácidos grasos en *Arabidopsis*.

La Figura 6 muestra trazas del cromatógrafo de gases que indican los niveles de diversos ácidos grasos en semillas que contienen pPHAS-Fab1-HP y pPHAS-Fab1-HPAS en comparación con la cepa de fondo

La Figura 7 es un resumen gráfico que indica los niveles de diversos ácidos grasos en semillas que contienen pPHASFab1- HP y pPHAS-Fab1-HPAS en comparación con la cepa de fondo

35 La Figura 8 muestra trazas del cromatógrafo de gases que indican los niveles de diversos ácidos grasos en semillas que contienen pPHAS-Fad2-AS en comparación con el tipo silvestre.

La Figura 9 muestra trazas del cromatógrafo de gases que indican los niveles de diversos ácidos grasos en semillas que contienen pPHAS-Fad2-HP y pPHAS-Fad2-HPAS en comparación con el mutante Fad2-MT.

40 La Figura 10 es un resumen gráfico que indica los niveles de diversos ácidos grasos en semillas que contienen pPHASFad2- AS, pPHAS-Fad2-HP, y pPHAS-Fad2- HPAS en comparación con el mutante Fad2-MT y la cepa de fondo.

La Figura 11 muestra trazas del cromatógrafo de gases que indican los niveles de diversos ácidos grasos en semillas que contienen pPHAS-Fad2-HP-GUS en comparación con la cepa de fondo.

45 La Figura 12 muestra una fotografía que contiene semillas de tipo silvestre (semillas más claras) y semillas que expresan GUS de pPHAS-Fad2-HP-GUS (semillas más oscuras).

La Figura 13 muestra trazas del cromatógrafo de gases que indican los niveles de diversos ácidos grasos en semillas que contienen pPHAS-Fad3-AS en comparación con el tipo silvestre.

La Figura 14 muestra trazas del cromatógrafo de gases que indican los niveles de diversos ácidos grasos en semillas que contienen pPHAS-Fad3-HP y pPHAS-Fad3-HPAS en comparación con el mutante Fad3-MT.

La Figura 15 es un resumen gráfico que indica los niveles de diversos ácidos grasos en semillas que contienen pPHAS-Fad3- AS, pPHAS-Fad3-HP, y pPHAS-Fad3- HPAS en comparación con el mutante Fad3-MT y la cepa de fondo.

Modos para llevar a cabo la invención

Un aspecto de la presente invención se relaciona con métodos útiles para modular la expresión de un objetivo en una célula. También se divulgan compuestos y composiciones útiles para modular la expresión de un objetivo en una célula. Específicamente, aspectos de la presente divulgación e invención se relacionan o usan secuencias de nucleótidos capaces de modular la expresión de un objetivo, tales como un gen, secuencia de oligonucleótidos, y/o proteína, por inferencia por ARN (iARNR) y/o supresión antisentido. Generalmente, las moléculas moduladoras de la secuencia de nucleótidos (mNS) pueden incluir una estructura de tallo-bucle, en donde el tallo provee un sustrato para dícir y puede actuar para suprimir un objetivo a través de la ruta de la iARN, y en donde la porción de bucle de la estructura puede comprender una primera secuencia que puede actuar para suprimir un gen a través de la supresión antisentido. Las moléculas mNS pueden ser, en su totalidad o en parte, modificadas químicamente y/o creadas sintéticamente. El uso de mNS modificadas químicamente puede mejorar diversas propiedades de las moléculas mNS, por ejemplo, a través de resistencia incrementada a la degradación de nucleasa in vivo y/o consumo celular mejorado. Las moléculas mNS modificadas químicamente proveen reactivos y métodos útiles para una variedad de aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico, agrícola, validación de objetivos, descubrimiento genómico, ingeniería genética, y farmacogenómica.

En una realización particular, las moléculas mNS comprenden una estructura de tallo-bucle (horquilla), en donde el tallo contiene una secuencia de ácidos nucleicos de doble cadena (NADs) capaz de ser escindida por dícir y liberar al menos un ácido nucleico de interferencia pequeño (siNA) que es capaz de suprimir un ARNm a través de la ruta de la iARN. Además, el bucle de la molécula de mNS contiene al menos un ácido nucleico antisentido (ANsa). Generalmente, tales moléculas serán denominadas aquí como ácidos nucleicos que forman horquillas con antisentido en bucle o "asANhp."

El ANsi y el ANasa del asANhp pueden apuntar al mismo lugar en el mismo gen y/o ARNm. En una realización de ejemplo adicional, el ANsi y el ANas de los asANhp pueden apuntar a una ubicación diferente en el mismo gen y/o ARNm. El ANsi y el ANas del asANhp también pueden apuntar a diferentes genes y/o ARNm.

La porción del tallo de la asANhp puede contener más de una secuencia capaz de generar un ANsi. Si hay más de un ANsi generado a partir del tallo de los asANhp, estos ANsi pueden apuntar al mismo sitio en el mismo ARNm. El ANsi puede apuntar a diferentes sitios en el mismo ARNm. El ANsi también puede apuntar a diferentes ARNm.

La porción de bucle del asANhp puede contener más de una secuencia ANas. Si hay más de un ANas en el bucle del asANhp, estos ANas podrán apuntar al mismo sitio en el mismo gen y/o ARNm. Los ANas pueden apuntar a diferentes sitios en el mismo gen y/o ARNm. Los ANas también pueden apuntar a diferentes genes y/o ARNm.

En una realización de ejemplo adicional, la porción de tallo del asANhp puede contener más de una secuencia capaz de generar un ANsi y la porción de bucle del asANhp puede contener más de una secuencia de ANas. Estos ANsi y ANas pueden apuntar al mismo sitio en el mismo ARNm, diferentes sitios en el mismo ARNm, diferentes ARNm, o cualquier combinación de los mismos.

En una realización particular, un ANsi y/o ANas individuales de un asANhp pueden direccionar más de un gen, secuencia de nucleótidos, y/o proteína. Puesto que muchos genes pueden compartir algún grado de homología de secuencia uno con otro, las moléculas de ANsi y/o ANas pueden ser diseñadas para direccionar una clase de genes (y receptor o genes de ligandos asociados) o, alternativamente, genes específicos mediante la selección de secuencias que, o bien son compartidas entre los diferentes objetivos génicos o alternativamente, que son únicos para un objetivo génico específico. En una realización de ejemplo, la molécula de ANsi y/o de ANas puede ser diseñada para direccionar regiones conservadas de, por ejemplo, una secuencia de ARN que tiene homología entre varios genes de tal manera que direcciona varios genes o familias de genes (por ejemplo, diferentes isoformas de genes, variantes de empalme, genes mutantes, etc.) con una molécula de ANsi y/o de ANas. En otra realización de ejemplo, la molécula de ANsi y/o de ANsa puede ser diseñada para direccionar una secuencia que es única para un gen específico, secuencia de nucleótidos, y/o proteína debido al alto grado de especificidad que la molécula de ANsi y/o de ANas requiere para mediar una actividad moduladora.

En una realización de ejemplo adicional, las moléculas de asANhp pueden contener uno o más sitios de empalme. Estos sitios de empalme pueden ser colocados operacionalmente y orientados de tal manera que permitan la escisión de la porción de bucle del asANhp de la porción de tallo del asANhp como si fuera un intrón. El asANhp que contiene tales sitios de empalme colocados orientados operacionalmente será denominado de aquí en adelante como "asANhp que contiene intrones" o "asNAihp"

En otra realización, la mNS puede contener un gen de interés enlazado operativamente a un promotor. Cuando las mNS contienen una horquilla o un bucle, realizaciones particulares permiten la presencia del promotor y el gen de interés dentro del bucle. En otras realizaciones, el ANas puede estar presente o ausente en el bucle que contiene el promotor y el gen de interés.

- 5 El gen de interés puede ser cualquier gen que un usuario desea expresar. El gen puede ser el mismo o relacionados con el objetivo de la mNS. A modo de ejemplo no limitativo, la mNS podría direccionar una forma mutada de un gen de interés mientras que al mismo tiempo provee una copia normal o manipulada como reemplazo. En una realización de ejemplo adicional, el promotor y el gen de interés pueden ser colocados cerca o dentro de una o más secuencias que promoverán la integración en un genoma. Ejemplos de promotores útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, promotores virales, retrovirales, de mamífero, vegetales, bacterianos, constitutivos, regulable, fúngicos, de levaduras, de algas, y de insectos. Promotores de plantas útiles en la presente invención incluyen, por ejemplo, los identificados en *Arabidopsis*, girasol, algodón, semilla de colza (incluyendo canola), maíz, trigo, castor, palma, tabaco, cacahuete, sorgo, caña de azúcar, o soja. Los promotores adecuados útiles en la presente invención incluyen, por ejemplo, promotores específicos de semillas, promotores inducibles, promotores constitutivos, incluyendo pero no limitados a, proteína de almacenamiento 2S, faseolina, CaMV 35S, napina, cruciferina, ubiquitina, oleosina, virus mosaico de la vena de cassava, prunina, legumina, y octopina sintasa.

- La introducción de nucleótidos y/o azúcares químicamente modificados o sintéticos en las moléculas mNS puede proveer una herramienta poderosa en la superación de las limitaciones potenciales de estabilidad y la biodisponibilidad *in vivo* inherente a las moléculas de ARN nativas que se suministran de forma exógena. Por ejemplo, el uso de mNS modificadas químicamente o nucleótidos sintéticos que contienen mNS pueden permitir una dosis inferior de una mNS particular para un efecto terapéutico dado ya que estas moléculas tienden a tener una vida media más larga en suero. Adicionalmente, ciertas modificaciones químicas pueden mejorar la biodisponibilidad de moléculas de ácido nucleico direccionando células o tejidos particulares, y/o mejorando el consumo celular de la molécula de ácido nucleico. Por lo tanto, incluso si la actividad de una molécula de ácido nucleico modificada químicamente o sintética es reducida en comparación con una molécula de ácido nucleico nativa (por ejemplo, cuando se compara con toda una molécula de ácido nucleico de ARN)), la actividad global de la molécula de ácido nucleico modificada o sintética puede ser mayor que la molécula nativa debido a estabilidad mejorada y/o suministro de la molécula. A diferencia del ARNsi nativo sin modificar, el ANsi modificado químicamente también puede minimizar la posibilidad de activar la actividad de interferón en los humanos.

- 30 En una realización representativa, una mNS puede comprender una o más modificaciones y/o bases sintéticas. Ejemplos de modificaciones y/o bases sintéticas incluyen, pero no se limitan a, 2'-amino, 2'-O-metilo, 2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-desoxi, 2'-metoxietilo, 4'-tio, 5-C-metilo, "base universal", ácido nucleico bloqueado (LNA), morfolino, y "nucleótidos acíclicos", así como nucleótidos que contienen un puente de metileno en 2'-O o 4'-C, incorporación de glicerilo terminal y/o de residuo desoxi abásico invertido, enlaces fosforotioato internucleósidos y nucleótidos que tiene una conformación Northern (Por ejemplo, ciclo de pseudorrotación Northern, véase por ejemplo Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag ed., 1984). Los mNS pueden comprender además uno o más desoxirribonucleótidos y/o didesoxirribonucleótidos.

- El término "base universal", como se usa aquí se refiere a análogos de bases de nucleótidos que forman pares de bases con cada una de las bases de ADN/ARN naturales con poca discriminación entre ellas. Ejemplos no limitantes de bases universales incluyen C-fenilo, C-naftilo y otros derivados aromáticos, inosina, azol carboxamidas, y derivados de nitroazol tales como 3-nitropirrol, 4-nitro-indol, 5-nitroindol, y 6-nitroindol como se conocen en la técnica (véase por ejemplo Loakes, 2001, Nucleic Acids Research, 29, 2437-2447). El término "nucleótido acíclico" como se usa aquí se refiere a cualquier nucleótido que tiene un azúcar ribosa acíclico, por ejemplo, donde cualquiera de los carbonos de ribosa (C1, C2, C3, C4 o C5), están independientemente o en combinación ausentes del nucleótido.

- 45 Las bases en una mNS se pueden modificar mediante, por ejemplo, la adición de sustituyentes en, o la modificación de una o más posiciones, por ejemplo, en las pirimidinas y purinas. La adición de sustituyentes puede o puede no saturar un doble enlace, por ejemplo, de las pirimidinas y las purinas. Ejemplos de sustituyentes incluyen, pero no se limitan a, grupos alquilo, grupos nitro, halógenos, y/o hidrógenos. Los grupos alquilo pueden ser de cualquier longitud, preferiblemente de uno a seis carbonos. Los grupos alquilo pueden ser saturados o insaturados; y pueden ser de cadena lineal, ramificada o cíclica. Los halógenos pueden ser cualquiera de los halógenos incluyendo, pero no limitado a, bromo, yodo, flúor y/o cloro.

- La modificación adicional de las bases puede lograrse mediante el intercambio y/o sustitución de los átomos en las bases. Ejemplos no limitantes incluyen: intercambiando las posiciones de un átomo de nitrógeno y un átomo de carbono en las bases, sustituyendo un átomo de nitrógeno y/ o uno de silicio por un átomo de carbono, sustituyendo un átomo de oxígeno por un átomo de azufre, y/o sustituyendo un átomo de nitrógeno por un átomo de oxígeno. Otras modificaciones de las bases incluyen, pero no se limitan a, la fusión de un anillo adicional a las bases, tales como un anillo adicional de cinco o seis miembros. El anillo fusionado puede llevar diversos grupos adicionales.

Ejemplos específicos de bases modificadas incluyen, pero no se limitan a, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, pseudoisocitosina, E-base, tiouracilo, ribotimidina, dihidrouridina, pseudouridina, 4-tiouridina, 3-metilcitosina, 5-

metilcitosina, N⁶-metiladenosina, N⁶-isopenteniladenosina, -metilguanosa, queuosina, wyosina, eteno-adenina, eteno-citosina, 5-metilcitosina, bromotimina, azaadenina, azaguanina, 2'-fluoro-uridina, y 2'-fluoro-citidina.

5 La mNS puede comprender nucleótidos modificados y/o sintéticos tal como un porcentaje del número total de nucleótidos presentes en la molécula de la mNS. Como tales, una molécula de mNS generalmente puede comprender nucleótidos modificados y/o sintéticos de aproximadamente 5 a aproximadamente 100% de las posiciones de nucleótidos (por ejemplo, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de las posiciones de nucleótidos). El porcentaje real de nucleótidos modificados presentes en una molécula de mNS dada depende del número total de nucleótidos presentes en la mNS.

10 En una realización particular, la mNS comprende un esqueleto molecular que une los diversos nucleótidos en secuencia. Realizaciones de ejemplo de mNS pueden tener esqueletos moleculares, que incluyen, pero no se limitan a, ribosa, 2'-alquil ribosa, 2'-O-metil ribosa, 2'-O-alil ribosa, desoxirribosa, 2-desoxirribosa, morfolino, y/o esqueletos peptídicos. El esqueleto puede comprender unidades de azúcar y/o sin azúcar. Estas unidades pueden unirse juntas de cualquier manera conocida en la técnica. Los nucleótidos pueden unirse mediante grupos de enlazamiento.

15 Algunos ejemplos de grupos de enlazamiento incluyen, pero no se limitan a, fosfato, tiofosfato, ditiofosfato; grupos metilfosfato, amidato, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, y/o fosforodiamidato. Alternativamente, los nucleótidos pueden estar unidos directamente entre sí.

20 Un esqueleto de azúcar puede comprender cualquier azúcar de origen natural. Ejemplos de azúcares de origen natural incluyen, pero no se limitan a, ribosa, desoxirribosa, y/o 2-desoxirribosa. Las unidades de azúcar de un esqueleto pueden ser modificados de tal manera que el esqueleto de azúcar modificado sea resistente a la escisión. Los azúcares de un esqueleto pueden ser modificados por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, para lograr la resistencia a la escisión de nucleasa. Ejemplos de azúcares modificados incluyen, pero no se limitan a, 2'-O-alquil ribosas, tales como 2'-O-metil ribosa, y 2'-O-alil ribosa. Las unidades de azúcar se pueden unir mediante enlazante de fosfato. Las unidades típicas de azúcar pueden estar enlazadas una a otra por enlaces de 3'-5', o 3'-3', o 5'-5'.

25 Adicionalmente, enlaces de 2'-5' también son posibles si el 2' OH no está modificado de otra manera.

30 Un esqueleto diferente a azúcar puede comprender cualquier molécula diferente a azúcar a la que pueden estar unidas las bases. Esqueletos diferentes a azúcar son conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, morfolino y ácidos nucleicos peptídicos (ANPs). Un esqueleto de morfolino está hecho de anillos de morfolino (tetrahydro-1,4-oxazina) y puede estar unido por grupos fosforodiamidato no iónicos. Los morfolinos modificados conocidos en la técnica pueden ser usados en la presente invención.

35 Los ANP resultan cuando las bases están unidas a un esqueleto de aminoácido mediante enlaces moleculares. Ejemplos de tales enlaces incluyen, pero no se limitan a, metileno carbonilo, etileno carbonilo, y los enlaces de etilo. Los aminoácidos pueden ser cualquier aminoácido, natural o no natural, modificado o sin modificar, y preferiblemente son aminoácidos alfa. Los aminoácidos pueden ser idénticos o diferentes uno del otro. Un ejemplo no limitante de un aminoácido adecuado incluye un amino alquil-amino ácido, tal como (2- aminoetilo)- aminoácido

Ejemplos de los ANP incluyen, pero no se limitan a, N-(2-aminoetil)-glicina, ANP de ciclohexilo, retro-inverso, fosfona, propinilo, y APN de aminoprolina. Los ANP se pueden sintetizar químicamente por métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, protocolos modificados de síntesis de péptidos Fmoc y/o tBoc.

40 Además de los oligonucleótidos antisentido uniformes mencionados anteriormente, es evidente para un experto en la técnica que se pueden mezclar múltiples tipos de esqueletos en una molécula mNS individual. Por ejemplo, una molécula mNS individual puede contener uno o más nucleótidos 2'-O-metilo, uno o más morfolinos, uno o más nucleótidos de ARN, y uno o más ANPs.

45 En realizaciones de ejemplo donde la mNS incluye un asANhp, la longitud del ANsi y/o ANas en un asANhp no es crítica, en tanto la longitud sea suficiente para hibridar específicamente al objetivo. Por ejemplo, el segmento de apareamiento de bases puede tener desde aproximadamente dos hasta aproximadamente 100 bases, desde aproximadamente 10 hasta 50 bases, aproximadamente 25 bases, o cualquier número individual entre aproximadamente 10 y aproximadamente 75 bases.

50 Se pueden considerar diversos factores al determinar la longitud de los segmentos de ANsi y/o ANas, tales como especificidad del objetivo, estabilidad de enlazamiento, transporte celular y/o suministro *in vivo*. Los segmentos de ANsi y/o ANas deben ser lo suficientemente largos para enlazarse de manera estable al objetivo de interés. También, los segmentos de ANsi y/o ANas deben ser lo suficientemente largos para permitir que la especificidad razonable de enlazamiento tal como una secuencia más corta tenga una probabilidad más alta de presentarse en diversos lugares en el genoma que una secuencia más larga. Consideraciones adicionales relacionadas con la longitud de segmentos de ANsi y/o ANas incluyen, la eficiencia del suministro *in vivo* o *ex vivo*, la estabilidad de los segmentos de ANsi y/o ANas *in vivo* o *in vitro*, y/o la estabilidad del objetivo de interés enlazado o no enlazado por un segmento de ANsi y/o de ANas.

55

En una realización de ejemplo adicional, una molécula de la mNS puede modificarse para optimizar su uso en diversas aplicaciones. La optimización puede incluir, pero no se limita a, una o más modificaciones para mejorar el suministro, el consumo celular, la localización intracelular, y/o la farmacocinética. Una manera en la que una molécula de mNS puede ser modificada es por la adición de secuencias de señal específicas. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, las señales de retención nuclear, señales de localización nuclear, y/o secuencias que promueven el transporte a través de membranas celulares, la barrera sangre/cerebro, y/o la barrera placentaria. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, polilisina, poli(EK), señal de localización nuclear del antígeno SV40 T, la terminal N de proteína del VIH-TAT, péptidos derivados de la proteína de Drosophila Antennapedia, un péptido de administración transdérmica tal como, por ejemplo, los descritos por Chen et al, Nature Biotechnology, 24:4 455 a 460, y/o el péptido de Dowdy Tat. También se contemplan secuencias que localizan oligonucleótidos antisentido para tipos específicos de células. En una realización, la divulgación presenta un ingrediente activo que comprende una molécula de mNS.

En una realización de ejemplo adicional, una mNS se pueden combinar con uno o más vehículos, adyuvantes y/o diluyentes para formar un medicamento o tratamiento químico para un organismo vivo. Ejemplos de tales vehículos, adyuvantes y/o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, solución de Ringer, colesterol y/o derivados de colesterol, liposomas, lipofectina, lipofectamina, polietilén glicol anclado a lípidos, copolímero de bloque F108, y/o fosfátidos, tales como dioleooxifosfatidiletanolamina, fosfatidil colina, fosfatidilglicerol, tocoferol alfa, y/o ciclosporina. En muchos casos, las moléculas mNS se pueden mezclar con uno o más vehículos, adyuvantes y/o diluyentes para formar una composición dispersada o medicamento que puede ser utilizado para tratar una enfermedad, infección o condición. Véase, por ejemplo Remington's Pharmaceutical Sciences; Goodman and Gilman's The Pharmacologic Basis of Therapeutics; Current Protocols in Molecular Biology. Sería evidente para una persona de experiencia normal en la técnica que tal composición dispersada también se puede utilizar para interrumpir la expresión adecuada de genes, secuencias de nucleótidos y/o proteínas involucradas en procesos de enfermedad o infecciosos, o en la producción de productos animales o vegetales. Por ejemplo, la composición puede ser utilizada para producir una planta con niveles incrementados de un producto de una síntesis de ácidos grasos o un gen del metabolismo lipídico.

Se pueden administrar moléculas mNS, con o sin un adyuvante y/o un vehículo, a un organismo o sujeto de cualquier manera que permitirá que las moléculas mNS modulen la expresión de un objetivo. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, la inyección específica de sitio, inyección sistémica, y/o administración por vía intravenosa, por vía oral, y/o tópica. Organismos y sujetos contemplados por la invención incluyen, pero no se limitan a, bacterias, células, sistemas de cultivo de células, plantas, hongos, animales, nemátodos, insectos y/o mamíferos, tales como humanos. Las plantas contempladas por la invención incluyen, por ejemplo, Arabidopsis, girasol, algodón, semilla de colza (incluyendo canola), maíz, trigo, castor, palma, tabaco, cacahuete, sorgo, caña de azúcar, y soja.

El objetivo puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico que puede ser un gen endógeno, un gen exógeno, un ácido nucleico viral, o ARN, tal como un gen de mamífero, el gen de la planta, gen viral, gen fúngico, gen bacteriano, gen viral de planta, o un gen viral de mamíferos. Ejemplos de virus de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, virus de la hepatitis C, virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la hepatitis B, virus del herpes simple, citomegalovirus, virus del papiloma humano, virus sincitial respiratorio, virus de la influenza, y el virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS).

Como será evidente para una persona de experiencia normal en la técnica, un objetivo también puede ser una secuencia de nucleótidos o proteínas. Tal como también se comprenderá, las moléculas de mNS no tienden a alterar la proteína misma, sino más bien direccionar las moléculas que controlan la generación de esa proteína. Ejemplos de proteínas incluyen, pero no se limitan a, proteína endógena, una proteína exógena, una proteína de mamífero, proteína vegetal, proteína viral, proteína fúngica, proteína bacteriana, proteína viral de la planta, o proteína viral de mamíferos. Ejemplos de secuencias de nucleótidos incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ADN, ARN, y de ANP.

En una realización de ejemplo, una molécula de mNS comprende una región sentido y una región antisentido, en donde la región sentido incluye una unidad estructural de cobertura terminal en el extremo 5', el extremo 3', o los dos extremos 5' y 3'. La unidad estructural de cobertura puede ser una unidad estructural abásica desoxi invertida, una unidad estructural desoxi timidina invertida, o una unidad estructural de timidina.

Una realización particular provee un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos una molécula demNS de una manera que permite la expresión de la molécula de ácido nucleico. Ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, cósmidos, vectores retrovirales, Agrobacterium, vectores virales, vectores bacterianos, vectores de levadura, vectores eucariotas, vectores de plantas, y vectores de mamíferos. Otras realizaciones proveen células de mamífero, células vegetales, o de Agrobacterium que comprenden tal vector. La célula puede ser de mamífero en la naturaleza, tal como, por ejemplo, una célula humana. La molécula de mNS del vector puede comprender una región sentido, una región antisentido, una secuencia antisentido, y/o un gen.

En una realización, las moléculas mNS caracterizan una molécula de ácido nucleico interferente pequeño modificada químicamente (ANSi) capaz de mediar la interferencia por ARN (iARN) dentro de una célula o sistema reconstituido

5 *en vitro*, en donde la modificación química comprende un conjugado unido a la molécula de ANSi modificada químicamente. El conjugado se puede unir a la molécula de ANSi modificada químicamente a través de una unión covalente. En una realización específica, el conjugado se une a la molécula de ANSi modificada químicamente a través de un enlazador biodegradable. La molécula de conjugado puede estar unida en el extremo 3' de bien sea la cadenas sentido, la cadena antisentido o ambas cadenas de la molécula de ANSi modificada químicamente. La molécula de conjugado puede estar unida en el extremo 5' de bien sea la cadena en sentido, la cadena antisentido o ambas cadenas de la molécula de ANSi modificada químicamente. La molécula de conjugado también se puede unir tanto al extremos 3' y al extremo 5' de bien sea la cadena en sentido, la cadena antisentido o ambas cadenas de la molécula de ANSi modificada químicamente, o cualquier combinación de las mismas. La molécula de conjugado puede comprender una molécula que facilita el suministro de una molécula de ANSi modificada químicamente en un sistema biológico, tal como una célula. En una realización particular, la molécula de conjugado unida a la molécula de ANSi modificada químicamente es un poli etilen glicol, albúmina de suero humano, o un ligando para un receptor celular que puede mediar el consumo celular. Ejemplos de moléculas de conjugado específicas contempladas por la presente invención que se pueden unir a moléculas de ANSi modificadas químicamente se describen en Vargeese et al., US Ser. Nº 10/201,394. El tipo de conjugados utilizados y el grado de conjugación de las moléculas de ANSi pueden ser evaluados para los perfiles farmacocinéticos, biodisponibilidad y/o estabilidad mejorados de los constructos de ANSi, mientras que al mismo tiempo se mantiene la capacidad del ANSi para mediar la actividad de la iARN. Como tal, un experto en la técnica puede seleccionar constructos de ANSi que se modifican con diversos conjugados para determinar si el complejo conjugado de ANSi posee propiedades mejoradas mientras se mantiene la capacidad para mediar la iARN, tal como, por ejemplo, en modelos animales que son generalmente conocidos en la técnica.

25 En otra realización, la invención caracteriza un método para modular la expresión de un gen dentro de una célula. El método incluye la síntesis de una molécula de mNS, que puede ser modificada químicamente, en donde la molécula de mNS comprende una secuencia complementaria al ARN del gen. La molécula de mNS puede incluir una secuencia sustancialmente similar a la secuencia del ARN objetivo. La molécula de mNS puede entonces ser introducida en una célula bajo condiciones adecuadas para modular la expresión del gen en la célula.

30 En otra realización de ejemplo, la invención presenta un método para modular la expresión de más de un gen dentro de una célula. El método incluye sintetizar una molécula de mNS, que puede ser modificada químicamente, en donde la molécula de mNS comprende una secuencia complementaria al ARN de los genes. La molécula de mNS puede entonces ser introducida en una célula bajo condiciones adecuadas para modular la expresión de los genes en la célula.

35 En otra realización de ejemplo, la invención presenta un método para modular la expresión de más de un gen dentro de una célula. El método incluye sintetizar una molécula de mNS, que puede ser modificada químicamente, en donde la molécula de mNS comprende una secuencia complementaria al ARN del gen y en donde la molécula de mNS comprende una secuencia sustancialmente similar a la secuencia del ARN objetivo. La molécula de mNS puede entonces ser introducida en una célula bajo condiciones adecuadas para modular la expresión de los genes en la célula.

40 En una realización particular, las moléculas mNS se utilizan como reactivos en aplicaciones *ex vivo*. Por ejemplo, las moléculas mNS pueden ser introducidas en tejidos o células que son trasplantados en un organismo o sujeto para efecto terapéutico. Las células y/o tejidos se pueden derivar de un organismo o sujeto que posteriormente recibe el explante. Alternativamente, las células y/o tejidos se pueden derivar de otro organismo o sujeto antes del trasplante. Las moléculas mNS se pueden utilizar para modular la expresión de uno o más genes en las células o tejido, de tal manera que las células o tejidos obtengan un fenotipo deseado y sean capaces de realizar una función cuando se trasplantan *in vivo*. En una realización de ejemplo, se extraen ciertas células objetivo de un organismo o sujeto. Estas células extraídas se ponen en contacto con las moléculas de la mNS direccionando una secuencia de nucleótidos específica dentro de las células bajo condiciones adecuadas para el consumo de las moléculas mNS por estas células (por ejemplo, usando reactivos de suministro tales como lípidos catiónicos, liposomas y similares, o usando técnicas tales como electroporación para facilitar el suministro de moléculas mNS en las células). Las células se reintroducen de nuevo en el mismo organismo o en otros organismos. Ejemplos no limitantes de aplicaciones *ex vivo* incluyen el uso en el trasplante de órgano/tejido, injerto de tejido, o en el tratamiento de la enfermedad pulmonar (por ejemplo, restenosis), o para prevenir la hiperplasia neointimal y la aterosclerosis en injertos venosos. Tales aplicaciones *ex vivo* también pueden ser usados para tratar condiciones asociadas con el fracaso del injerto de derivación coronaria y periférica, por ejemplo, tales métodos se pueden utilizar en conjunción con cirugía de injerto de *bypass* vascular periférico y cirugía de injerto de *bypass* de arteria coronaria. Las aplicaciones adicionales incluyen el uso en trasplantes para tratar las lesiones o daño del SNC, incluyendo el uso en el tratamiento de condiciones neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, epilepsia, demencia, enfermedad de Huntington, o esclerosis lateral amiotrófica (ALS).

60 En aún otra realización, la invención presenta un método para modular la expresión de un gen en un organismo. El método incluye sintetizar una molécula de mNS, en donde la molécula de mNS comprende una secuencia complementaria al ARN del gen. La molécula de mNS puede entonces ser introducida en el organismo bajo condiciones adecuadas para modular la expresión del gen en el organismo.

5 En otra realización de ejemplo, la invención presenta un método para modular la expresión de más de un gen en un organismo. El método incluye sintetizar una molécula de mNS, en donde la molécula de mNS comprende una secuencia complementaria al ARN de los genes. La molécula de mNS puede entonces ser introducida en el organismo bajo condiciones adecuadas para modular la expresión de los genes en el organismo. En una realización alternativa, la invención presenta un método para modular la expresión de un gen dentro de una célula sintetizando una molécula de mNS, en donde la molécula de mNS comprende una secuencia que tiene complementariedad con el ARN del gen. La molécula de mNS puede entonces ser introducida en una célula bajo condiciones adecuadas para modular la expresión del gen en la célula.

10 En otras realizaciones, la invención presenta un método para modular la expresión de más de un gen dentro de una célula, que incluye sintetizar moléculas mNS, en donde la molécula de mNS comprende una secuencia que tiene complementariedad con el ARN de los genes. La molécula de mNS puede entonces ponerse en contacto con una célula *in vitro* o *in vivo* bajo condiciones adecuadas para modular la expresión de los genes en la célula. En otra realización, la invención incluye un método para modular la expresión de un gen en un organismo. Una molécula de mNS que tiene complementariedad con el ARN del gen puede ser sintetizada y la molécula de mNS puede ser introducida en el organismo bajo condiciones adecuadas para modular la expresión del gen en el organismo. Otra realización presenta un método para modular la expresión de más de un gen en un organismo sintetizando las moléculas mNS que incluye una secuencia que tiene complementariedad con el ARN de los genes y la introducción de las moléculas mNS en el organismo bajo condiciones adecuadas para modular la expresión de los genes en el organismo. Otra realización incluye un método para modular la expresión de un gen en un organismo poniendo en contacto el organismo con la molécula de mNS bajo condiciones adecuadas para modular la expresión del gen en el organismo. Aún otra realización alternativa presenta un método para modular la expresión de más de un gen en un organismo poniendo en contacto el organismo con una o más moléculas mNS bajo condiciones adecuadas para modular la expresión de los genes en el organismo.

25 Las moléculas mNS pueden ser diseñadas para inhibir la expresión del gen objetivo a través del direccionamiento de la iARN de una variedad de moléculas de ARN. En una realización, las moléculas mNS pueden ser utilizadas para direccionar diversos ARN que corresponden a un gen objetivo. Ejemplos no limitantes de tales ARN incluyen ARN mensajero (ARNm), variantes de empalme de ARN alternos de genes objetivo, ARN modificados postranscripcionalmente de genes objetivo, pre-ARNm de genes objetivo, y/o plantillas de ARN. Si el empalme alterno produce una familia de transcriptos que se distinguen por el uso de exones apropiados, la presente invención puede ser utilizada para inhibir la expresión del gen a través de los exones apropiados para inhibir específicamente o para distinguir entre las funciones de miembros de la familia de genes. Por ejemplo, una proteína que contiene un dominio transmembrana empalmado alternativamente puede ser expresada tanto en los enlaces a la membrana como en las formas secretadas. El uso de la invención para dirigir el exón que contiene el dominio transmembrana puede ser usado para determinar las consecuencias funcionales de direccionamiento farmacéutico de enlace a la membrana, en oposición a la forma secretada de la proteína. Ejemplos no limitantes de aplicaciones de la invención en relación con el direccionamiento de estas moléculas de ARN incluyen aplicaciones terapéuticas farmacéuticas, aplicaciones de descubrimiento molecular y farmacéutico, modificación de productos/moléculas de animales y plantas, aplicaciones de diagnóstico molecular y función del gen, y mapeo de genes, por ejemplo, usando mapeo de polimorfismo nucleótido individual con moléculas de ANSi. Tales aplicaciones pueden ser implementadas usando secuencias génicas conocidas o a partir de secuencias parciales disponibles de una etiqueta de secuencia expresada (EST). En una realización, la modificación involucra un gen de síntesis de ácido graso o un gen del metabolismo lipídico en una planta.

45 En otra realización, las moléculas mNS se pueden utilizar para direccionar secuencias conservadas que corresponden a una familia de genes o familias de genes. Como tal, las moléculas mNS que direccionan múltiples objetivos de genes pueden proveer efecto biológico incrementado o un efecto modificado (tal como en la producción de síntesis de ácidos grasos en una planta o una semilla). Además, las moléculas de MNS pueden ser utilizadas utilizar para caracterizar las rutas de la función del gen en una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, la presente invención puede ser utilizada para inhibir la actividad de los genes objetivo en una ruta para determinar la función de los genes no caracterizados en el análisis de la función del gen, análisis de la función de ARNm, o el análisis de traducción. La invención puede ser utilizada para determinar las rutas potenciales del gen objetivo involucrado en diversas enfermedades y condiciones hacia el producto, la molécula, o el desarrollo farmacéutico. La invención puede ser usada para comprender las rutas de la expresión génica involucrada en, por ejemplo, el desarrollo, tal como el desarrollo prenatal y desarrollo postnatal, y/o la progresión y/o el mantenimiento del cáncer, enfermedades infecciosas, autoinmunidad, inflamación, trastornos endocrinos, renal enfermedad, enfermedad pulmonar, enfermedad cardiovascular, defectos de nacimiento, envejecimiento, cualquier otra enfermedad o condición relacionada con la expresión génica. La invención puede ser utilizada para modificar la expresión de genes en plantas o animales, o puede ser utilizada para modificar la síntesis de productos animales o vegetales, tales como, por ejemplo, la modificación de la síntesis de ácidos grasos en plantas y semillas de plantas.

60 En otra realización, la invención presenta un método para validar un gen objetivo. El método incluye sintetizar una molécula de mNS, la cual puede ser modificada químicamente y además incluye una secuencia complementaria al ARN de un gen objetivo. La molécula de mNS puede entonces ser introducida en un sistema biológico bajo

condiciones adecuadas para modular la expresión del gen objetivo en el sistema biológico. La función del gen puede entonces determinarse mediante ensayos para cualquier cambio fenotípico en el sistema biológico.

5 Por "sistema biológico" se entiende el material, en una forma purificada o no purificada, a partir de fuentes biológicas, incluyendo pero no limitado a, fuentes humanas, animales, vegetales, de insectos, bacterianas, virales u otras fuentes, en donde el sistema comprende los componentes necesarios para la actividad de la iARN. El término "sistema biológico" incluye, por ejemplo, una célula, tejido u organismo, o extracto de los mismos. El término sistema biológico también incluye sistemas de iARN reconstituidos que se pueden utilizar en unas condiciones *in vitro*.

10 Por "cambio fenotípico" se entiende cualquier cambio detectable a una célula que se produce en respuesta al contacto o el tratamiento con una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, mNS). Tales cambios detectables incluyen, pero no se limitan a, cambios en la forma, tamaño, proliferación, motilidad, expresión de la proteína o expresión del ARN u otros cambios físicos o químicos como tal como pueden ensayarse por métodos conocidos en la técnica. El cambio detectable también puede incluir la expresión de genes/moléculas informadoras tales como Proteína Verde fluorescente (GFP) o diversas etiquetas que se utilizan para identificar una proteína expresada o cualquier otro componente celular que puede ser ensayado.

15 En una realización particular, la divulgación presenta un kit que contiene una molécula de mNS, que se puede utilizar para modular la expresión de un objetivo en una célula, tejido u organismo. En otra realización, la divulgación presenta un kit que contiene más de una molécula de mNS, que puede ser modificada químicamente, que puede ser utilizada para modular la expresión de más de un gen objetivo en una célula, tejido u organismo. En aún otra realización, la divulgación presenta un kit que contiene un vector que codifica una molécula de mNS que puede ser utilizada para modular la expresión de un gen en un sistema biológico. En otra realización, la divulgación presenta un kit que contiene un vector que codifica más de una molécula de mNS que puede ser utilizada para modular la expresión de más de un gen objetivo en un sistema biológico.

20 Otra realización presenta una célula que contiene una o más moléculas mNS. En una realización particular, se provee una célula que contiene un vector que codifica una o más moléculas mNS. La célula que contiene una molécula de mNS puede ser una célula de mamífero o una célula vegetal. Por ejemplo, las células que contienen una molécula de mNS pueden ser de *Arabidopsis*, girasol, algodón, semilla de colza (incluyendo canola), maíz, trigo, castor, palma, tabaco, cacahuete, sorgo, caña de azúcar, o de soja.

25 La invención también incluye moléculas mNS la iARN en una célula o sistema reconstituido, en donde la molécula de mNS comprende una o más modificaciones químicas descritas aquí que modulan la actividad de la polimerasa de una polimerasa celular capaz de generar moléculas de ARNsi endógenas adicionales que tienen homología de secuencia con la molécula de mNS modificada químicamente.

30 La divulgación incluye una molécula de mNS que media la iARN en una célula o sistema reconstituido, en donde la molécula de mNS comprende una o más modificaciones químicas descritas aquí que modulan el consumo celular de la molécula de mNS. En una realización específica, la divulgación presenta molécula de mNS que media la expresión de un objetivo, en donde la molécula de mNS comprende una o más modificaciones químicas descritas aquí que incrementan la biodisponibilidad de la molécula de mNS, por ejemplo, uniendo conjugados poliméricos tales como polietilenglicol o conjugados equivalentes que mejoran la farmacocinética de la molécula de mNS, o uniendo conjugados que apuntan a tipos específicos de tejidos o tipos de células *in vivo*. Ejemplos no limitantes de tales conjugados se describen en Vargeese et al., US Ser. N° 10/201,394.

35 En una realización de ejemplo, la divulgación presenta un método para generar molécula de mNS con biodisponibilidad mejorada, que comprende (a) introducir un conjugado en la estructura de una molécula de mNS, y (b) ensayar la molécula de mNS de la etapa (a) bajo condiciones adecuadas para aislar la molécula de mNS que tiene una biodisponibilidad mejorada. Tales conjugados pueden incluir ligandos para receptores celulares, tales como péptidos derivados de ligandos de proteínas de origen natural; secuencias de localización de proteínas, incluyendo secuencias de código ZIP celular; anticuerpos; aptámeros de ácido nucleico; vitaminas y otros cofactores, tales como folato y N-acetilgalactosamina; polímeros, tales como polietileno glicol (PEG); fosfolípidos; colesterol; poliaminas, tales como espermina o espermidina; y otros. En otra realización, el polietileno glicol (PEG) puede estar unido covalentemente a la molécula de mNS. El PEG unido puede ser cualquier peso molecular, preferiblemente de aproximadamente 2,000 a aproximadamente 50,000 daltons (Da).

40 La presente invención puede ser utilizada sola o como un componente de un kit que tiene al menos uno de los reactivos necesarios para llevar a cabo la introducción *in vitro* o *in vivo* de ARN para las muestras y/o sujetos de prueba. Por ejemplo, los componentes adecuados del kit puede incluir una molécula de mNS y un vehículo que promueva la introducción de la molécula de mNS en células de interés como se describe aquí (por ejemplo, utilizando lípidos y otros métodos de transfección conocidos en la técnica, véase por ejemplo Beigelman et al, patente de Estados Unidos. N° 6,395,713). El kit puede ser utilizado para la validación de objetivos, tales como en la determinación de la función y/o actividad de los genes, o en la optimización de fármacos, y en el descubrimiento de fármacos (véase por ejemplo Usman et al., US Ser. No. 60/402,996). Tal kit puede incluir también instrucciones para permitir a un usuario del kit practicar la invención.

El término "ácido nucleico de interferencia corto", "ANsina", "ARN de interferencia corto", "ARNsi", "molécula de ácido nucleico de interferencia corto", "molécula de oligonucleótido interferencia pequeña" o "molécula de ácido nucleico interferente pequeña modificada químicamente", tal como se usa aquí se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico capaz de inhibir o desregular la expresión génica o replicación viral, por ejemplo, mediando la interferencia por ARN "iARN", o el silenciamiento de genes de una manera específica de secuencia; véase, por ejemplo Bass, 2001, Nature, 411, 428-429; Elbashir et al., 2001, Nature, 411,494-498; y Kreutzer et al., Publicación Internacional PCT No. WO 00/44895; Zernicka-Goetz et al., Publicación Internacional PCT No. WO 01/36646; Fire, Publicación Internacional PCT No. WO 99/32619; Plaetinck et al., Publicación Internacional PCT No. WO 00/01846; Mello and Fire, Publicación Internacional PCT No. WO 01/29058; Deschamps-Depaillette, Publicación Internacional PCT No. WO 99/07409; y Li et al., Publicación Internacional PCT No. WO 00/44914; Allshire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, Science, 297, 2215-2218; y Hall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237; Hutvagner and Zamore, 2002, Science, 297,2056-60; McManus et al., 2002, RNA, 8, 842-850; Reinhart et al., 20.02, Gene & Dev., 16, 1616-1626; y Reinhart & Bartel, 2002, Science, 297,1831). Por ejemplo, el ANsi puede ser una molécula de polinucleótido de doble cadena que comprende regiones complementarias en sentido y antisentido, en donde la región antisentido comprende la secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico objetivo o una porción de la misma y la región en sentido que tiene secuencias de nucleótidos correspondientes a la secuencia de ácidos nucleicos objetivo o una porción de la misma.

El ANsi puede ser ensamblado a partir de dos oligonucleótidos separados, donde una cadena es la cadena en sentido y la otra es la cadena antisentido, y en donde las cadenas antisentido y en sentido son complementarias (esto es, cada cadena comprende la secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en la otra cadena, tales como donde la cadena antisentido y la cadena en sentido forman una estructura dúplex o de cadena doble, por ejemplo en donde la región de cadena doble es de aproximadamente 19 pares de bases). La cadena antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico objetivo o una parte de la misma, y la cadena en sentido comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácidos nucleicos objetivo o una porción de la misma. Alternativamente, el ANsi puede ser ensamblado a partir de un oligonucleótido individual, donde las regiones en sentido y antisentido complementarios del ANsi están enlazadas por medio de un ácido nucleico con base en enlazadores basados en ácido no nucleico. El ANsi puede ser un polinucleótido con una estructura secundaria dúplex, dúplex asimétrica, de horquilla o de horquilla asimétrica, que tiene regiones en sentido y antisentido complementarias, en donde la región antisentido comprende la secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula separada de ácido nucleico objetivo o una porción de la misma, y la región en sentido que tiene secuencias de nucleótidos correspondientes a la secuencia de ácidos nucleicos objetivo o una porción de la misma. El ANsi puede ser un polinucleótido de cadena sencilla circular que tiene dos o más estructuras de bucle y un tallo que comprende regiones en sentido y antisentido complementarias, en donde la región antisentido comprende la secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico objetivo o una porción de la misma, y la región en sentido que tiene secuencia de nucleótidos correspondientes a la secuencia de ácidos nucleicos objetivo o una porción de la misma. El polinucleótido circular puede ser procesado, ya sea *in vivo* o *in vitro* para generar una molécula activa de ANsi capaz de mediar la iARN. El ANsi también puede comprender un polinucleótido de cadena sencilla que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico objetivo o una porción de la misma (por ejemplo, donde dicha molécula de ANsi no requiere la presencia dentro de la molécula de ANsi de la secuencia de nucleótidos correspondientes a la secuencia de ácidos nucleicos objetivo o una porción de la misma). El polinucleótido de cadena sencilla puede comprender además un grupo fosfato terminal, tal como un 5'-fosfato (véase, por ejemplo, Martínez et al., 2002, Cell., 110, 563-574 y Schwarz et al., 2002, Molecular Cell, 10, 537-568), o 5',3'-difosfato.

En ciertas realizaciones, la molécula de ANsi de la invención puede incluir secuencias o regiones separadas en sentido y antisentido, en donde las regiones en sentido y antisentido están enlazadas covalentemente por nucleótidos o moléculas enlazantes no nucleótidos tal como son conocidas en la técnica. Alternativamente, las regiones en sentido y antisentido pueden estar enlazadas de manera no covalente por interacciones iónicas, puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones hidrófobas, y/o interacciones de apilamiento. En ciertas realizaciones, las moléculas de ANsi comprenden una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de un gen objetivo. La molécula de ANsi puede interactuar con la secuencia de nucleótidos de un gen objetivo de una manera que cause la inhibición de la expresión del gen objetivo. Las moléculas de ANsi no necesitan estar limitadas a aquellas moléculas que contienen solamente ARN, pero pueden además abarcar nucleótidos y no nucleótidos modificados químicamente. En ciertas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico interferentes cortos carecen de nucleótidos que contengan 2'-hidroxi (2' OH). Las realizaciones particulares incluyen ácidos nucleicos de interferencia corto que no requieren la presencia de nucleótidos que tengan un grupo 2'-hidroxi para mediar la iARN y, como tal, las moléculas de ácido nucleico de interferencia corto opcionalmente no incluyen ningunos ribonucleótidos (esto es, nucleótidos que tengan un grupo 2'-OH). Tales moléculas de ANsi que no requieren la presencia de ribonucleótidos dentro de la molécula de ANsi para apoyar la iARN pueden, sin embargo, tener uno o más enlazantes adjunto u otros grupos unidos o asociados, unidades estructurales, o cadenas que contienen uno o más nucleótidos con grupos 2'-OH. Opcionalmente, las moléculas de

ANsi pueden comprender ribonucleótidos en aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, o 50% de las posiciones de los nucleótidos.

5 Las moléculas de ácido nucleico de interferencia corto también pueden ser denominadas como oligonucleótidos modificados de interferencia corto "ONMsi". Tal como se utiliza aquí, el término ANsi es equivalente a otros términos usados para describir moléculas de ácido nucleico que son capaces de mediar la iARN de secuencia específica, tales como, por ejemplo, ARN de interferencia corto (ARNsi), ARN de cadena doble (ARNds), micro-ARN (miARN), ARN de horquilla corto (ARNsh), oligonucleótido de interferencia corto, ácido nucleico de interferencia corto, oligonucleótido modificado de interferencia corto, ARNsi modificado químicamente, ARN de silenciamiento génico postranscripcional (ARNptgs). Además, tal como se usa aquí, el término iARN es equivalente a otros términos usados para describir la interferencia por ARN específica de la secuencia, tal como silenciamiento génico postranscripcional, la inhibición de la traducción, o la epigenética. Por ejemplo, las moléculas de ANSi se pueden usar para silenciar genes epigenéticamente tanto en el nivel postranscripcional como en el nivel pretranscripcional. A modo de ejemplo no limitativo, la regulación epigenética de la expresión génica por las moléculas de ANsi puede ser el resultado de la modificación mediada del ANsi de estructura de la cromatina para alterar la expresión génica (véanse, por ejemplo, Allshire, 2002, Science, 297, 1818-1819; Volpe et al., 2002, Science, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, Science, 297, 2215-2218; y Hall et al., 2002, Science, 297, 2232-2237).

20 El término de "horquilla asimétrica" significa una molécula de ANsi lineal que comprende una región antisentido, una porción de bucle que puede comprender nucleótidos o no nucleótidos, y una región en sentido que comprende menos nucleótidos que la región antisentido (en la medida en que la región en sentido tiene suficiente nucleótidos complementarios para pares de bases con la región antisentido y forman un dúplex con bucle). Por ejemplo, una molécula de ANsi de horquilla asimétrica puede comprender una región antisentido que tiene una longitud suficiente para mediar la iARN en una célula o sistema *in vitro* (por ejemplo, aproximadamente 19 a aproximadamente 22 nucleótidos) y una región de bucle que comprende de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 nucleótidos, y una región en sentido que tiene de aproximadamente 3 a aproximadamente 18 nucleótidos que son complementarias a la región antisentido. La molécula de ANSi de horquilla asimétrica también puede comprender un grupo fosfato de terminal 5' que puede ser modificada químicamente. La porción de bucle de la molécula de ANsi de horquilla asimétrica puede comprender nucleótidos, no nucleótidos, moléculas enlazantes, o moléculas de conjugado como se describe aquí.

30 El término "modular" significa que la expresión del gen, o el nivel de la molécula de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican una o más proteínas o subunidades de proteína, o la actividad o nivel de una o más proteínas o subunidades de proteínas, está sobrerregulada o subregulada, de tal manera que la expresión, nivel, o actividad es mayor o menor que la observada en ausencia del modulador. Por ejemplo, el término "modular" puede significar "inhibir", pero no se limita a esta definición.

35 Los términos "inhibir", "subregular" o "reducir", significa que la expresión del gen, o el nivel de moléculas de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican una o más proteínas o subunidades de proteína, o actividad de una o más proteínas o subunidades de proteínas, se reduce por debajo de la observada en ausencia de las moléculas mNS. En una realización particular, la inhibición, subregulación, o reducción con una molécula de mNS da como resultado un nivel que está por debajo del nivel observado en la presencia de una molécula inactiva o atenuada. Igualmente, la inhibición, subregulación, o reducción con moléculas mNS da como resultado un nivel que está por debajo del nivel observado en presencia de, por ejemplo, una molécula de la mNS una molécula de la mNS con secuencias mezcladas o con no coincidencias. En otro ejemplo, la inhibición, subregulación, o la reducción de la expresión génica con una molécula de ácido nucleico es mayor en presencia de la molécula de ácido nucleico que en su ausencia.

45 Por "gen" o "gen objetivo" se entiende, un ácido nucleico que codifica un ARN, por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos que incluyen, pero no se limitan a, genes estructurales que codifican un polipéptido. El gen objetivo puede ser un gen derivado de una célula, un gen endógeno, un transgén, o genes exógenos, tales como genes de un patógeno (por ejemplo, un virus), que está presente en la célula después de la infección. La célula que contiene el gen objetivo puede ser derivada de o contenida en cualquier organismo, tal como una planta, animal, protozoario, virus, bacteria, u hongo. Ejemplos de plantas no limitantes incluyen monocotiledóneas, dicotiledóneas, gimnospermas o, y más específicamente, *Arabidopsis*, girasol, algodón, colza, maíz, palma, tabaco, cacahuete o soja. Ejemplos no limitantes de animales incluyen vertebrados o invertebrados. Ejemplos no limitantes de hongos incluyen mohos o levaduras.

"Región de secuencia altamente conservada" significa una secuencia de nucleótidos de una o más regiones en un gen objetivo que no varía significativamente de una generación a la otra, o de un sistema biológico a otro.

55 "Región en sentido" significa una secuencia de nucleótidos de una molécula de ANsi que tiene complementariedad con una región antisentido de la molécula de ANsi. La región en sentido de una molécula de ANsi puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que tiene homología (esto es, identidad de secuencia o identidad parcial) con una secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

"Región antisentido" significa una secuencia de nucleótidos de una molécula de ANsi que tiene complementariedad con una secuencia de ácidos nucleicos objetivo. Además, la región antisentido de una molécula de ANsi puede comprender opcionalmente una secuencia de ácidos nucleicos que tiene complementariedad con una región en sentido de la molécula de ANsi.

- 5 "Ácido nucleico objetivo" significa cualquier secuencia de ácidos nucleicos cuya expresión o actividad ha de ser modulada. El ácido nucleico objetivo puede ser ADN o ARN, tales como ADN o ARN endógenos, ADN viral o ARN viral, u otro ARN codificado por un gen de un virus, bacteria, hongo, animal, o planta.

10 Tal como se hace referencia en esta solicitud, "tratar" o "tratamiento" no requiere una alteración completa de un fenotipo. Esto significa que los síntomas de la condición subyacente son menos reducidos, y/o que una o más de las causas celulares, fisiológicas, o bioquímicas subyacentes o mecanismos que causan los síntomas son reducidos y/o eliminados. Se entiende que reducido, tal como se usa en este contexto, significa en relación con el estado de la condición, incluyendo el estado molecular de la condición, no sólo el estado fisiológico de la condición.

15 Por "condición" se entiende cualquier estado en un sujeto u organismo que se podría desear alterar. Tal estado debe ser atribuible a la expresión o falta de expresión de un gen, secuencia de nucleótidos y/o proteína. Ejemplos de condiciones incluyen, pero no se limitan a, enfermedades, anomalías genéticas, infecciones, cánceres, mutaciones, y condiciones cosméticas, incluyendo, pero no limitadas a, alopecia, obesidad y arrugas en la piel. Un ejemplo no limitante adicional de una condición es el estado normal en un sujeto. Por ejemplo, la producción normal de ácidos grasos en una planta (por ejemplo, *Arabidopsis*, girasol, algodón, colza, maíz, palma, tabaco, cacahuete o soja) es una condición que puede ser alterada usando las composiciones de la divulgación y métodos de la presente invención. Como tal, el término condición incluye cualquier estado que podría ser alterado por razones científicas, agrícolas, médicas y/o personales.

20 Por "complementariedad" se entiende que un ácido nucleico puede formar enlaces de hidrógeno con otra secuencia de ácidos nucleicos, bien sea por el tradicional apareamiento de bases de Watson-Crick, el apareamiento de bases de Hoogstein, y/o apareamiento de bases Hoogstein reverso u otros tipos no tradicionales, en referencia a las moléculas de ácidos nucleicos, la energía libre de enlazamiento para una molécula de ácido nucleico con su secuencia complementaria es suficiente para permitir que ocurra la función relevante del ácido nucleico (por ejemplo, la actividad de la iARN). La determinación de energías libres de enlazamiento para moléculas de ácido nucleico es bien conocida en la técnica (véanse, por ejemplo, Turner et al, 1987, CSH Symp Quant Biol LII pp 123-133; Frier et al., 1986, Proc. Nat Acad ScL USA. 83:9373-9377; Turner et al., 1987, J. Am Chem Soc. 109: 3783-3785).

25 Un porcentaje de complementariedad indica el porcentaje de residuos contiguos en una molécula de ácido nucleico que puede formar enlaces de hidrógeno (por ejemplo, apareamiento de bases de Watson-Crick) con una segunda secuencia de ácidos nucleicos (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10 de 10 siendo 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, y 100% de complementariedad). "Complementariedad perfecta" significa que todos los residuos contiguos de una secuencia de ácidos nucleicos enlazarán hidrógeno con el mismo número de residuos contiguos en una segunda secuencia de ácidos nucleicos.

30 Las moléculas de ANsi representan una novedosa metodología terapéutica para un amplio espectro de enfermedades y condiciones, incluyendo el cáncer o enfermedad cancerosa, enfermedad infecciosa, enfermedad cardiovascular, enfermedad neurológica, enfermedad de prión, enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmune, enfermedad pulmonar, enfermedad renal, enfermedad hepática, enfermedad mitocondrial, enfermedad endocrina, enfermedades y condiciones relacionadas con la reproducción, síntesis de producto animal o vegetal, y cualesquiera otra indicación que pueda responder al nivel de un producto génico expresado en una célula o organismo.

35 Tal como se usa aquí "célula" es usado en su sentido biológico habitual y no se refiere a un organismo multicelular entero. La célula puede estar presente en un organismo (por ejemplo, plantas y animales, incluyendo mamíferos). La célula puede ser procariota (por ejemplo, células bacterianas) o eucariota (por ejemplo, célula de mamífero o de planta). La célula puede ser de origen somático o de línea germinal, totipotente o pluripotente, que se divide o que no se divide. La célula también se puede derivar de o puede comprender un gameto o embrión, una célula madre, o una célula completamente diferenciada, tal como, por ejemplo, de un animal, bacteria, planta o semilla.

40 Las moléculas mNS pueden añadirse directamente o pueden formar complejos con lípidos catiónicos, empaquetadas dentro de liposomas, o de otra manera suministradas a las células o tejidos objetivo. El ácido nucleico o complejos de ácido nucleico pueden ser administrados localmente a tejidos relevantes *ex vivo*, o *in vivo* a través de, por ejemplo, inyección, suministro por pistola de genes, bomba o cánula de infusión, con o sin su incorporación en biopolímeros.

45 En otro aspecto, la divulgación provee células que contienen una o más moléculas mNS. La una o más moléculas mNS pueden independientemente ser direccionadas a los mismos o diferentes sitios.

"ARN" significa una molécula que comprende al menos un residuo de ribonucleótido. Por "ribonucleótido" se entiende un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de una unidad estructural de β -D-ribo-furanosa. Los términos incluyen ARN de doble cadena, ARN de cadena sencilla, ARN aislado tal como ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido por vía recombinante, así como ARN alterado que difiere del ARN de origen natural por la adición, eliminación, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Tales alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleótido, tal como a los extremos del ANsi o internamente (por ejemplo, en uno o más nucleótidos del ARN). Los nucleótidos en las moléculas de ARN también pueden comprender nucleótidos no estándar, tales como los nucleótidos de origen no natural o nucleótidos sintetizados químicamente o desoxinucleótidos. Estos ARN alterados pueden ser denominados como análogos o como análogos de ARN de origen natural.

Por "sujeto" se entiende un organismo, el cual es un donante o receptor de células explantadas o las propias células. "Sujeto" también se refiere a un organismo al que se pueden administrar moléculas de ácidos nucleicos. Un sujeto puede ser una planta, células de plantas, un mamífero, o células de mamífero, incluyendo células humanas.

La invención puede ser utilizada en un método para producir una planta con niveles modificados de ácidos grasos de componente endógeno. El método incluye la modulación de los niveles de un gen heterólogo, tal como una síntesis de ácidos grasos o un gen del metabolismo lipídico. Se puede modificar la producción de ácidos grasos en plantas y semillas. Plantas representativas que se pueden modificar a través de la presente invención incluyen, por ejemplo, *Arabidopsis*, girasol, algodón, colza (incluyendo canola), maíz, trigo, castor, palma, tabaco, cacahuete, sorgo, caña de azúcar, y soja.

La mNS, individualmente, en combinación con otros compuestos, o en conjunción con otros compuestos (tales como fármacos), pueden usarse para tratar enfermedades o condiciones discutidas aquí (por ejemplo, cánceres y otras condiciones proliferativas, infección viral, enfermedad inflamatoria, autoinmunidad, enfermedad pulmonar, enfermedad renal, enfermedad ocular, etc.). Por ejemplo, para tratar una enfermedad o condición particular, las moléculas mNS pueden ser administradas a un sujeto o pueden ser administradas a otras células apropiadas evidentes para los expertos en la técnica, individualmente o en combinación con uno o más fármacos bajo condiciones adecuadas para el tratamiento.

En una realización de ejemplo adicional, las moléculas mNS pueden ser usadas en combinación con otros tratamientos conocidos para tratar condiciones o enfermedades discutidas anteriormente. Por ejemplo, las moléculas descritas podrían utilizarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos conocidos para el tratamiento de una enfermedad o condición. Ejemplos no limitantes de otros agentes terapéuticos que se pueden combinar fácilmente con una molécula de mNS son moléculas de ácido nucleico enzimáticas, moléculas de ácido nucleico alostéricas, moléculas de ácido nucleico alostéricas, de señuelo, o moléculas de ácido nucleico antisentido, aptámeras, anticuerpos (tales como anticuerpos monoclonales), moléculas pequeñas, y otros compuestos orgánicos y/o inorgánicos, incluyendo metales, sales e iones.

Técnicas de modelado por ordenador para uso en predicción/evaluación de derivados incluyen, pero no se limitan a: MFold versión 3.1 disponible de Genetics Corporation Group, Madison, WI (véase Zucker et al, Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. In RNA Biochemistry and Biotechnology, 11-43, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, (1999); Zucker et al., Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure. J. Mol. Biol. 288, 911-940 (1999); Zucker et al., RNA Secondary Structure Prediction. In Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry S. Beaucage, D.E. Bergstrom, G.D. Glick, and R.A. Jones eds., John Wiley & Sons, New York, 11.2.1-11.2.10, (2000)), COVE (análisis de la estructura del ARN (métodos de gramática libre de contexto estocástico) v.2.4.2 (Eddy & Durbin, Nucl. Acids Res. 1994, 22: 2079-2088) que se distribuye libremente como código fuente y que se puede descargar accediendo a <http://www.genetics.wustl.edu/eddy/software/> y FOLDALIGN, también distribuido libremente y disponible para su descarga en <http://www.bioinf.au.dk/FOLDALIGN/> (véase Finding the most significant common sequence and structure motifs in a set of RNA sequences. Gorodkin, L. J. Heyer and G. D. Stormo. Nucleic Acids Research, Vol. 25, no. 18 pp 3724-3732,1997; Finding Common Sequence and Structure Motifs in a set of RNA Sequences. J. Gorodkin, L. J. Heyer, and G. D. Stormo. ISMB 5;120-123,1997).

La presente invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, los cuales se ofrecen a manera de ilustración y no pretenden limitar la invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Construcción de plásmidos

pPHAS-Fab1-HP: la iARN de Horquilla fue empleada para disminuir los niveles de KASII (también conocida como, y denominada aquí frecuentemente como "Fab1"). Los fragmentos en sentido, antisentido y de intrón estaban ensamblados en el vector plásmido pGEM-T-Easy (Promega) antes de la clonación en el vector binario pDsRed-PHAS como fragmento PacI-NhoI. Un fragmento de 178 pb de 5'UTR del exón 1 de At1g74960 (*FAB1*), que no es

homólogo a cualquier otra de las secuencias de *Arabidopsis* que codifican enzimas KASI o KASIII, se amplificó a partir del ADN genómico de *Arabidopsis* usando oligonucleótidos

TTAATTAACGCATCGAAGCTCTCTGCACGC (SEQ ID NO: 1) y

5 GCTAGCGGCTTTGAGAAGAACCCAG (SEQ ID NO:2) y clonado subsecuentemente en pGEM-T-Easy (Promega), de tal manera que el sitio NheI del inserto era adyacente al sitio de pGEM-T-Easy para crear pGEM-T-Easy- HTM1.

El primer intrón de FAD2 fue entonces amplificado usando oligonucleótidos GCTAGCGTCAGCTCCATCTCCAGGTCC (SEQ ID NO:3) y GCTAGCGTTTCTGCAGAAAACCAAAGC (SEQ ID NO:4), de tal manera que este fragmento contenía 17 pb del exón 1 y 4 pb del exón 2 para asegurar la inclusión de los sitios de empalme 5' y 3'. Este fragmento se clonó entonces en el sitio PstI/NheI de pGEM-T-Easy-HTM1 para crear pGEM-TEasy- HTM2. Para completar la repetición invertida para Fab1 horquilla, el fragmento original de 178 pb 5'UTR se amplificó usando los cebadores CTGCAGAAACCCGGGCATCGAAGCTCTCTGCACGC (SEQ ID NO:5) and GAGCTCCTCGAGGGCTTTGAGAAGAACCCAG (SEQ ID NO:6), y clonado en el sitio SacI / Pst de pGEM-T-Easy-HTM2 para dar pGEM-T-Easy-HTM3. La secuencia de horquilla Fab1 resultante se escindió del pGEM-T-Easy-HTM3 y se insertó en pDsRed-PHAS como un fragmento de PacI/XhoI para producir pPHAS-FAB1-HP (Figura 1).

15 **pPHAS-Fab1-HPAS:** el primer exón de 107 pb del gen Fab1 se amplificó a partir de ADN genómico usando los cebadores KasII-S'exon-BglIII (GGGAGATCTGGCGCGCCGGCTATCTCTCCACCGTGA (SEQ ID NO:7) y KasII-3'exon-SpeI (GGGACTAGTTCTTCTTTTATGCCATGG (SEQ ID NO:8)). El fragmento fue reemplazado con una parte del intrón Fad2- en SpeI-BglII en pGEM-T-Easy-HTM3, entonces, un casete que contenía horquilla FAB1, intrones y Fab1 antisentido fue reemplazado con todo un intrón de horquilla de pPHASFab1- HP, como se representa en la Figura 1.

pPHAS-Fab1-AS: El 178 5'UTR del gen FAB1 anterior se amplificó usando los cebadores KasII-5'UTRNheI/ XhoI

(GGCTCGAGCTAGCCGCATCGAAGCTCTCTGCACGC (SEQ ID NO:9)) y KasH-3'UTR-PacI (GGTTAATTAAGGCTTTGAGAAGAACCCAG (SEQ ID NO:10)). Un fragmento fue reemplazado con todo un intrón de horquilla Fab1 en pPHAS-Fab1-HP en PacI-XhoI, tal como se representa en la Figura 1.

25 **pPHAS-Fad2-HP:** Los 118 pb de 5'UTR en sentido y antisentido de secuencias no codificadas de Fad2 se amplificó a partir de ADN genómico y se reemplazó con 5'UTR en sentido y antisentido de KASII en pPHAS-Fab1-HP, como se representa en la Figura. 2.

pPHAS-Fad2-HPAS: 1152 pb del gen Fad2 fue amplificado con los cebadores FAD2-5'SphI (CGCATGCATGGGTGCAGGTGGAAGAAT (SEQ ID NO: 11)) y FAD2-3'SpeI (CCACTAGTTCATAACTTATTGTTGTACCA (SEQ ID NO:12)), el fragmento fue reemplazado con la parte del intrón Fad2 en SpeI-SphI en dirección antisentido, como se representa en la Figura 2.

35 **pPHAS-Fad2-AS: El gen Fad2 fue amplificado con los cebadores** FAD2-5'XhoI (CCCTCGAGATGGGTGCAGGTGGAAGAAT (SEQ ID NO:13)) y FAD2-3'PacI (CCTTAATTAATCATAACTTATTGTTGTACCA (SEQ ID NO:14)), luego reemplazado con casete Fad2-HP en PPHAS- -Fad2-HP en Pac-XhoI como dirección antisentido como se representa en la Figura 3.

pPHAS-Fad3-HP: 138 pb de 3'UTR sentido y antisentido del gen Fad3 se amplificó a partir de ADN genómico. Los fragmentos fueron reemplazados con 5'UTR en sentido y antisentido de Fab1 en pPHAS-Fab1-HP, como se representa en la Figura 3.

40 **pPHAS-Fad3-IIPAS:** el primer exón de 301 pb del gen Fad3 se amplificó con los cebadores Fad3-anti-5'BglIII (GGAGATCTGGCGCGCCCGTGGCCGAGAACAAGATG (SEQ ID NO:15)) y Fad3-anti-3'SpeI (GGGACTAGTGTGTTGCTATGGACCAACGC (SEQ ID NO:16)), luego se reemplazó con una parte de Fad2-intrón en BglIII-SpeI en dirección antisentido, como se representa en la Figura 3.

45 **pPHAS-Fad3-AS:** El primer exón de 301 pb del gen Fad3 se amplificó a partir de ADN genómico usando los cebadores Fad3-anti-5'PacI (GGGTTAATTAACGTGGCCGAGAACAAGATG (SEQ ID NO:17)) y Fad3-anti-3'XhoI (CCCTCGAGAGTTGTTGCTATGGACCAACGC (SEQ ID NO:18)). El fragmento fue reemplazado con el casete FAD3-HP en PacI-XhoI, tal como se representa en la Figura 3.

Ejemplo 2: cultivo y transformación de *Arabidopsis*

50 La *Arabidopsis* se cultivó bajo ~ 250uE de la luz con un fotoperiodo de 16/8 h (luz / oscuridad) a 20 °C. Los vectores se introdujeron en cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 pMP90 por electroporación y se utilizaron para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* por el método de inmersión floral (Bechtold, N., Ellis, J., y Pelletier, G. (1993) CR Acad. Sci. París 316 , 1194-1198). La transformación se realizó ~5 días después de la floración inicial.

Ejemplo 3: Determinación del contenido de ácidos grasos en semillas de *Arabidopsis*

5 Análisis de ácidos grasos: Las semillas fueron metiladas (1 ml de HCl 1 N, metanol (Supelco), 80 °C durante 1 h),
 extraídas con hexano y trimetilsililado (100 µl de BSTFA- TMCS (bis(trimetilsilil) trifluoroacetamidatrimetilsilano)
 (Supelco), 90 °C durante 45 min). El BSTFA-TMCS se eliminó por evaporación y la muestra se resuspendió en
 hexano. Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 equipado con un detector
 10 selectivo de masas 5973 (GC/MS) y una columna capilar ciano SP-2340 (Supelco) (60 m x 250 µm x 0.25 µm). El
 inyector se mantuvo a 225 °C, la temperatura del horno varió (100-240 °C a 15 °C/min seguido de 240 °C durante 5
 min), y el flujo de helio fue de 1.1 ml/min. La asignación de las identidades pico se realizó con base en el tiempo de
 elución versus estándares auténticos y validados basado en sus espectros de masas. La cuantificación se realizó
 usando el software Chemstation de Hewlett-Packard.

Ejemplo 4: Modulación de la síntesis de ácidos grasos en *Arabidopsis*

15 Se compararon tres métodos de supresión génica (antisentido, iARN de horquilla, y iARN de horquilla con
 antisentido) del gen en el intrón. Aunque no se desea estar limitados por la teoría, las mRNA que contiene ARNi de
 horquilla y secuencias antisentido pueden ser más potentes en el silenciamiento de genes a través de un modelo tal
 como el representado en la Figura 4. En el modelo de la Figura 4, al empalme del intrón para crear el ARNs, se
 crearía un fragmento de ADN que contiene una porción antisentido del gen, proveyendo así un método potencial
 adicional de reducción de la expresión génica además del sustrato dicer de iARN que se genera.

20 Para la comparación de los tres métodos de supresión génica se escogieron tres genes (el FAB2 12-desaturasa y el
 FAD3 15-desaturasa porque son fácilmente registrados; y el FAD2 porque ha sido utilizado antes para la evaluación
 de la reducción en la expresión génica), así como el β-cetoacil-ACP sintasa (KAS) II. La relación entre estas enzimas
 y la síntesis de ácidos grasos en *Arabidopsis* se representa en la Figura 5.

25 Además de ser el tejido objetivo para la modificación del contenido de ácido graso de los cultivos de semillas
 oleaginosas, las semillas proveen una fuente fiable de material reproducible para el análisis de los resultados de las
 transformaciones llevadas a cabo utilizando los constructos creados en el Ejemplo 1. De este modo, el contenido de
 ácido graso de semillas a partir de las plantas transformadas se analizó por cromatografía de gases y el análisis de
 espectrometría de masas para confirmar cualitativamente las asignaciones de picos como ácidos grasos específicos.
 Se utilizó prueba t de Student para asignar importancia a las diferencias entre las medias (basados en 10 o más
 muestras por media). Los resultados para los constructos creados en el Ejemplo 1 están representados en los
 Ejemplos 5-8 a continuación.

Ejemplo 5: Modulación de la Expresión FAB1

30 FAB1 elonga ácidos grasos de 16 átomos de C (C16) a 18 átomos de C (C18) en el plástido. Para FAB1, los niveles
 ácidos grasos de 16:0 más 16:1 (los sustratos para FAB1) se compararon con los niveles de su producto 18:0 y
 18:1, más metabolitos 18:2 y 18:3. La *Arabidopsis* de tipo silvestre se comparó con la línea mutante *fab1 fae1* y con
 la línea mutante *fab1 Fae1* transformada con bien sea la horquilla de FAB1 (Fab1-HP) o con la FAB1 incluyendo la
 horquilla combinada y antisentido (*fab1-BPAS*). Los resultados se presentan en la Figura 6 y se resumen
 gráficamente en la Figura 7. La línea *fae1 fab1* mostró un incremento significativo en los ácidos grasos C18 debido a
 la mutación *fae1* que bloquea la elongación adicional al nivel de 20C. La introducción de la *fab1-HP* en el fondo
 mutante de *fab1 fae1* disminuyó los ácidos grasos C18 de 74.2% a 53.4%, mientras que la introducción del
 constructo *fab1-HPAS* dio como resultado una disminución a 41.6% de ácidos grasos de 18C.

Ejemplo 6: Modulación de la Expresión FAD2

35 Para FAD2, los niveles de ácidos grasos 18:1 (el sustrato para FAD2) se compararon con los niveles de su producto
 18:2 y el metabolito 18:3. Para el análisis, 18:2 se sumó con 18:3 para estimar la proporción total de ácidos grasos
 que habían sido desaturados por FAD2. La *Arabidopsis* de tipo silvestre se comparó con antisentido de FAD2 (Fad2-
 AS), iARN de horquilla de FAD2 (Fad2-HP), y FAD2 se comparó con la horquilla combinada y antisentido (Fad2-
 HPAS). Cada uno de éstas se comparó con el mutante FAD2 más severo, FAD2-2 (Fad2-MT). Los resultados se
 presentan en las Figuras 8 y 9 y se resumen gráficamente en la Figura 10.

40 Los niveles de WT de 18:2 + 18:3 fueron del 43% el cual declinó a 18.9% en la Fad2-AS, y a 9.4% en la línea Fad2-
 HP. Ambos cambios fueron significativos en el nivel de P <0.01. La declinación de 9.4% en la línea de Fad2-HP a
 7.2% en la línea de Fad2-HPAS fue significativa en el nivel de P <0.05. El 7.2% en la línea de Fad2-HPAS no fue
 50 significativamente diferente de la de la *fad2-MT* en 7.5%.

Ejemplo 7: Modulación de la Expresión FAD2 con introducción de la Expresión GUS

Para FAD2, los niveles de 18:1 de ácidos grasos (el sustrato para FAD2) se compararon con los niveles de su
 producto 18:2 y el metabolito 18:3. Para el análisis, 18:2 se sumó con 18:3 para obtener la proporción total de ácidos
 grasos que se habían sido desaturados por FAD2. La *Arabidopsis* de tipo silvestre se comparó con la iARN de

horquilla FAD2 que contiene el gen GUS en el intrón (Fad2-HP-GUS). Los resultados se presentan en las Figuras 11 y 12.

5 Los niveles de WT de 18:2 + 18:3 fueron del 49%, el cual declinó a 12.3% en la Fad2-HP-GUS. El cambio fue significativo en el nivel de P <0.01. Además, la tinción de azul para GUS fue evidente en las semillas transformadas, indicando expresión de GUS en esas semillas.

Ejemplo 8: Modulación de la Expresión FAD3

10 Para FAD3, los niveles de 18:1, más 18:2 de ácidos grasos (siendo 18:2 el sustrato para FAD3) se compararon con los niveles de su producto de 18:3. La *Arabidopsis* de tipo silvestre se comparó con FAD3-antisentido (FAD3-AS), con horquilla de FAD3 (FAD3-HP iARN), y con FAD3 con la horquilla y antisentido combinados (FAD3-HPAS). Los resultados se presentan en las Figuras 13 y 14 y gráficamente resumidos en la Figura 15.

15 Los niveles de WT de 18:3 fueron 17.0%, declinados a 10.7% en el Fad3-AS, 4.5% en la línea Fad3-HP y 3.0% en la línea Fad3-HPAS. Todos los tratamientos fueron significativamente diferentes de todos los otros tratamientos en el nivel de P <0.01. La línea de Fad3-HPAS al 3.0% no fue significativamente diferente del alelo de Fad3 del mutante más fuerte, Fad3-3, al 2.8%.

20 Aunque esta invención se ha descrito en ciertas realizaciones de ejemplo, la presente invención puede modificarse adicionalmente dentro del espíritu y alcance de esta divulgación. Esta solicitud está por lo tanto destinada a cubrir cualesquiera variaciones, usos o adaptaciones de la invención utilizando sus principios generales. Además, esta solicitud está destinada a cubrir tales desviaciones de la presente divulgación tal como vienen dentro de la práctica conocida o habitual en la técnica a la cual pertenece esta invención y las cuales caen dentro de los límites de las reivindicaciones anexas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Dow Chemical

Shanklin, John

Nguyen, Tam

25 <120> MÉTODO COMBINADO ANTISENTIDO DE HORQUILLA PARA MODULAR LA EXPRESIÓN

<130> 2971.01-8076

<160> 18

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

30 <211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

35 <400> 1

ttaattaacg catcgaagct ctctgcacgc 30

<210> 2

<211> 25

<212> ADN

40 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador
 <400> 2
 gctagcggct ttgagaagaa cccag 25
 <210> 3
 5 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 10 <400> 3
 gctagcgtca gctccatctc caggtcc 27
 <210> 4
 <211> 28
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 4
 gctagcgttt ctgcagaaaa ccaaaagc 28
 20 <210> 5
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Cebador
 <400> 5
 ctgcagaaac ccgggcatcg aagctctctg cacgc 35
 <210> 6
 <211> 31
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 6

gagctcctcg agggctttga gaagaacca g 31
<210> 7
<211> 37
<212> ADN
5 <213> Artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 7
gggagatctg gcgcgccggc tatctcctcc accgtga 37
10 <210> 8
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
15 <223> Cebador
<400> 8
gggactagtt ctcctttt atgcatgg 29
<210> 9
<211> 35
20 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 9
25 ggctcgagct agccgcatcg aagctctctg cacgc 35
<210> 10
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial
30 <220>
<223> Cebador
<400> 10
ggtaattaa ggcttgaga agaaccag 29
<210> 11

<211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> Cebador
 <400> 11
 cgcatgcatg ggtgcagggtg gaagaat 27
 <210> 12
 <211> 29
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 12
 15 ccactagttc ataactatt gttgtacca 29
 <210> 13
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Cebador
 <400> 13
 ccctcgagat ggtgcagggt ggaagaat 28
 <210> 14
 25 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 14
 ccttaattaa tcataactta ttgtgtacc a 31
 <210> 15
 <211> 36
 <212> ADN

<213> Artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 15
5 ggagatctgg cgcgcccgtg gccgagaaca aagatg 36
<210> 16
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial
10 <220>
<223> Cebador
<400> 16
gggactagtg ttgttgctat ggaccaacgc 30
<210> 17
15 <211> 31
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador
20 <400> 17
gggtaatta acgtggccga gaacaagat g 31
<210> 18
<211> 30
<212> ADN
25 <213> Artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 18
ccctcgagag ttgttgctat ggaccaacgc 30
30

REIVINDICACIONES

1. Un método para regular la expresión, comprendiendo el método:
- proveer a una célula un constructo de nucleótidos, en donde dicho constructo de nucleótidos comprende:
- 5 una primera y una segunda secuencia de nucleótidos que hibridan para formar el tallo de una estructura de tallo-bucle, y
- una tercera secuencia de nucleótidos dispuesta entre las primera y segunda secuencias de nucleótidos, y
- sitios de empalme colocados operacionalmente y orientados de tal manera que permiten la escisión de la porción de bucle de la estructura de tallo-bucle de la porción de tallo de la estructura de tallo-bucle,
- 10 en donde las secuencias primera y segunda de nucleótidos, cuando se aparean, generan un ácido nucleico de interferencia pequeño que modula la expresión de un objetivo,
- en donde la tercera secuencia de nucleótidos es de longitud suficiente para permitir que las primera y segunda secuencias de nucleótidos se apareen de manera estable una con otra, y en donde la tercera secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos antisentido capaces de modular la expresión de un objetivo a través de la supresión antisentido,
- 15 y en donde el objetivo modulado por la secuencia de nucleótidos antisentido y el objetivo modulado por el ácido nucleico de interferencia pequeño puede ser el mismo o diferente; y
- cultivar dicha célula.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico de interferencia pequeño que modula la expresión de un objetivo modula la expresión del objetivo a través de una ruta de la iARN.
- 20 3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde un gen de interés enlazado operativamente a un promotor está localizado en el bucle.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el bucle contiene más de una secuencia de nucleótidos que modula la expresión de un objetivo a través de la supresión antisentido.
- 25 5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el tallo contiene más de un par de secuencias de nucleótidos que, cuando se aparean, generan un ácido nucleico de interferencia pequeño que modula la expresión de un objetivo.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el constructo de nucleótidos comprende un ANP.
- 30 7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el constructo de nucleótidos está presente en un vector y está enlazado operativamente a un promotor.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el promotor es seleccionado del grupo que consiste de promotores virales, retrovirales, de mamífero, de plantas, bacterianos, constitutivos, regulables, fúngicos, de levadura, y de insectos.
- 35 9. El método de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde el vector es seleccionado del grupo que consiste de plásmidos, cósmidos, vectores retrovirales, *agrobacterium*, vectores virales, vectores bacterianos, vectores de levadura, vectores eucariotas, vectores de plantas, y vectores de mamíferos.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la célula es seleccionada del grupo que consiste de células procariotas, eucariotas, bacterianas, de *agrobacterium*, de levadura, de plantas, de mamífero, y humanas.
- 40 11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la planta se selecciona del grupo que consiste de *Arabidopsis*, girasol, algodón, colza, maíz, trigo, castor, palma, tabaco, cacahuete, sorgo, caña de azúcar, y soja.

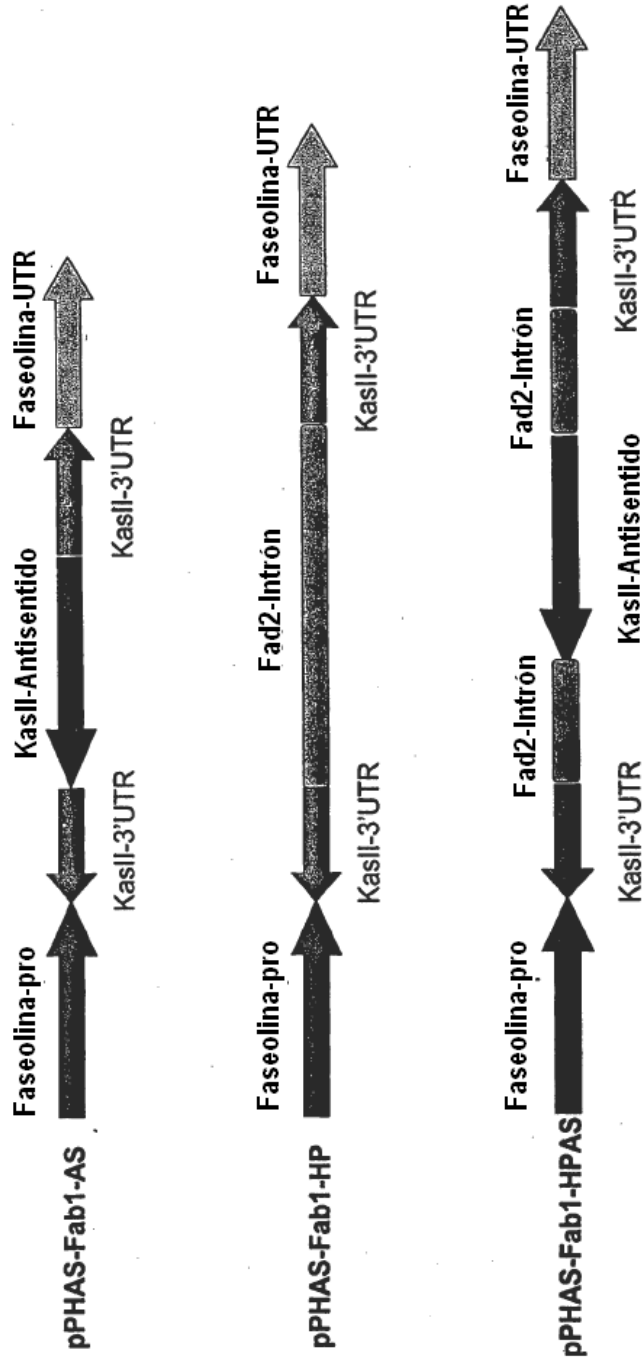


FIG. 1

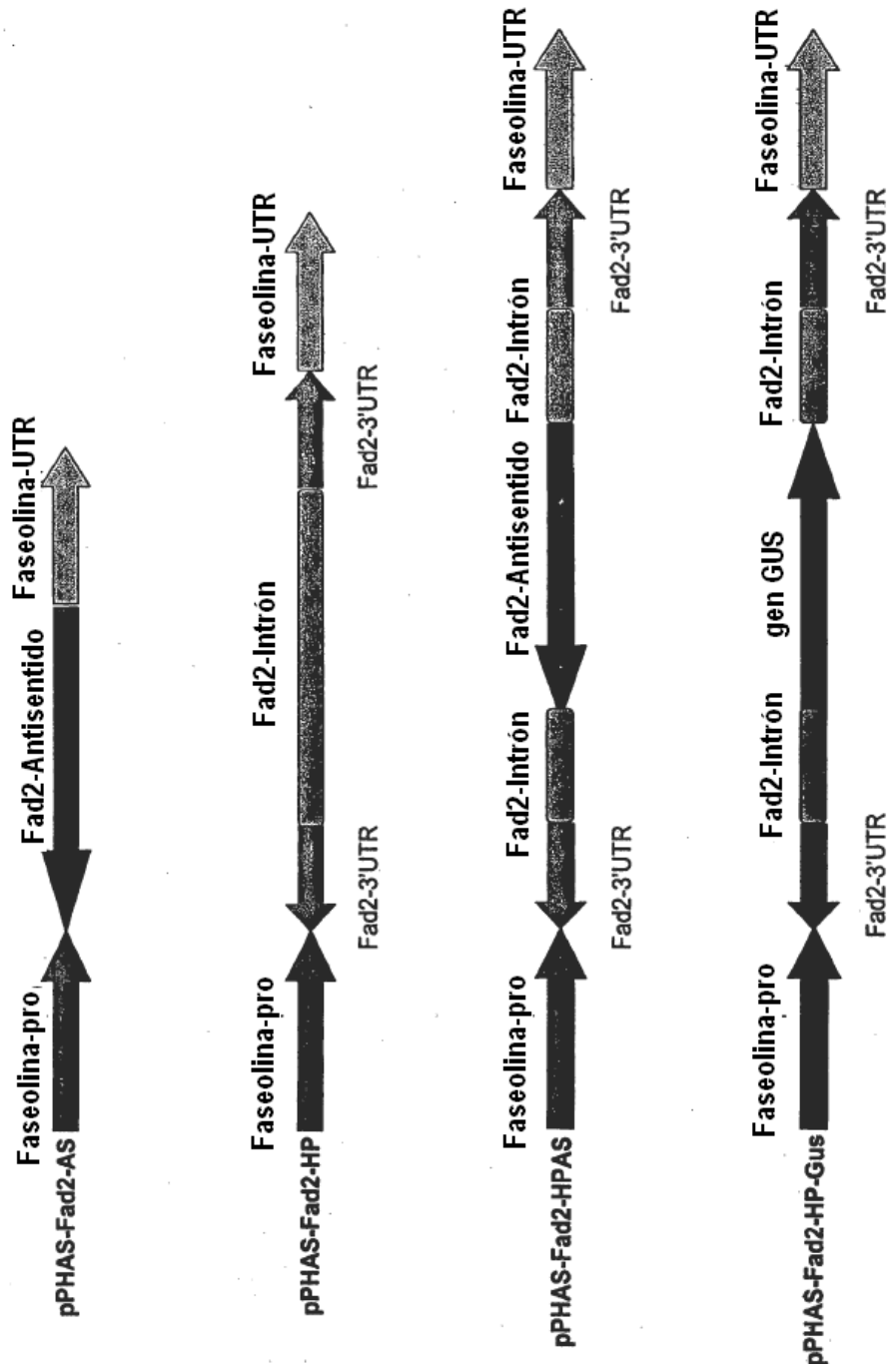


FIG. 2

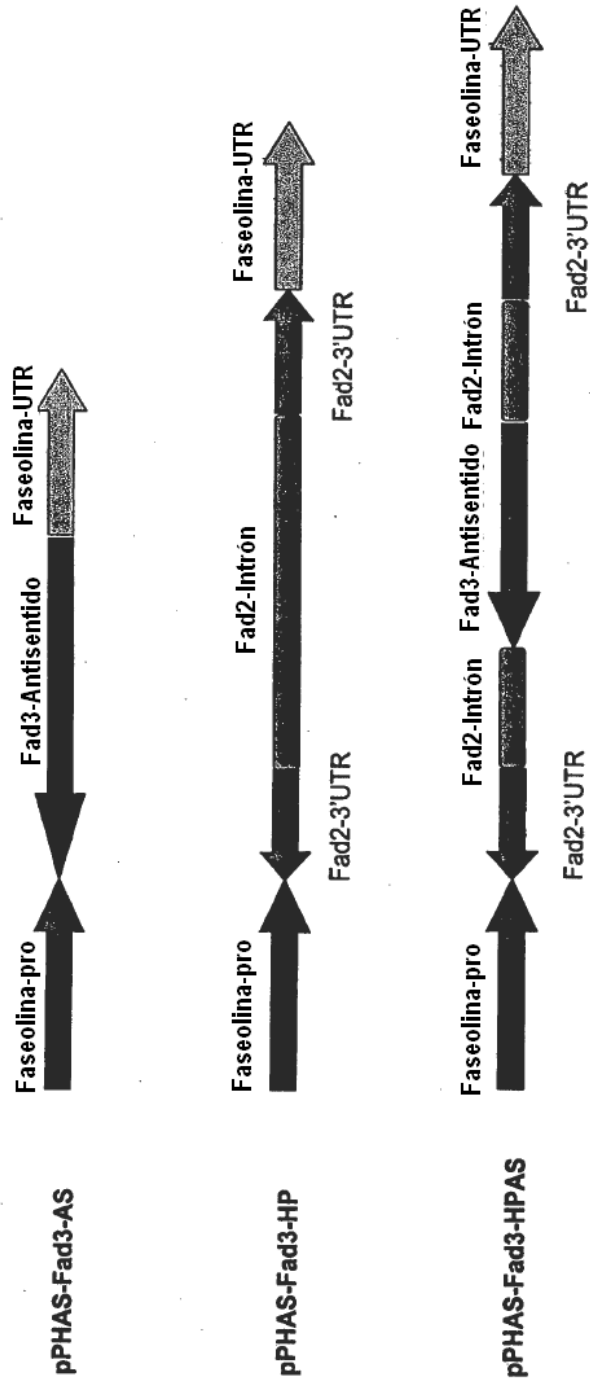


FIG. 3

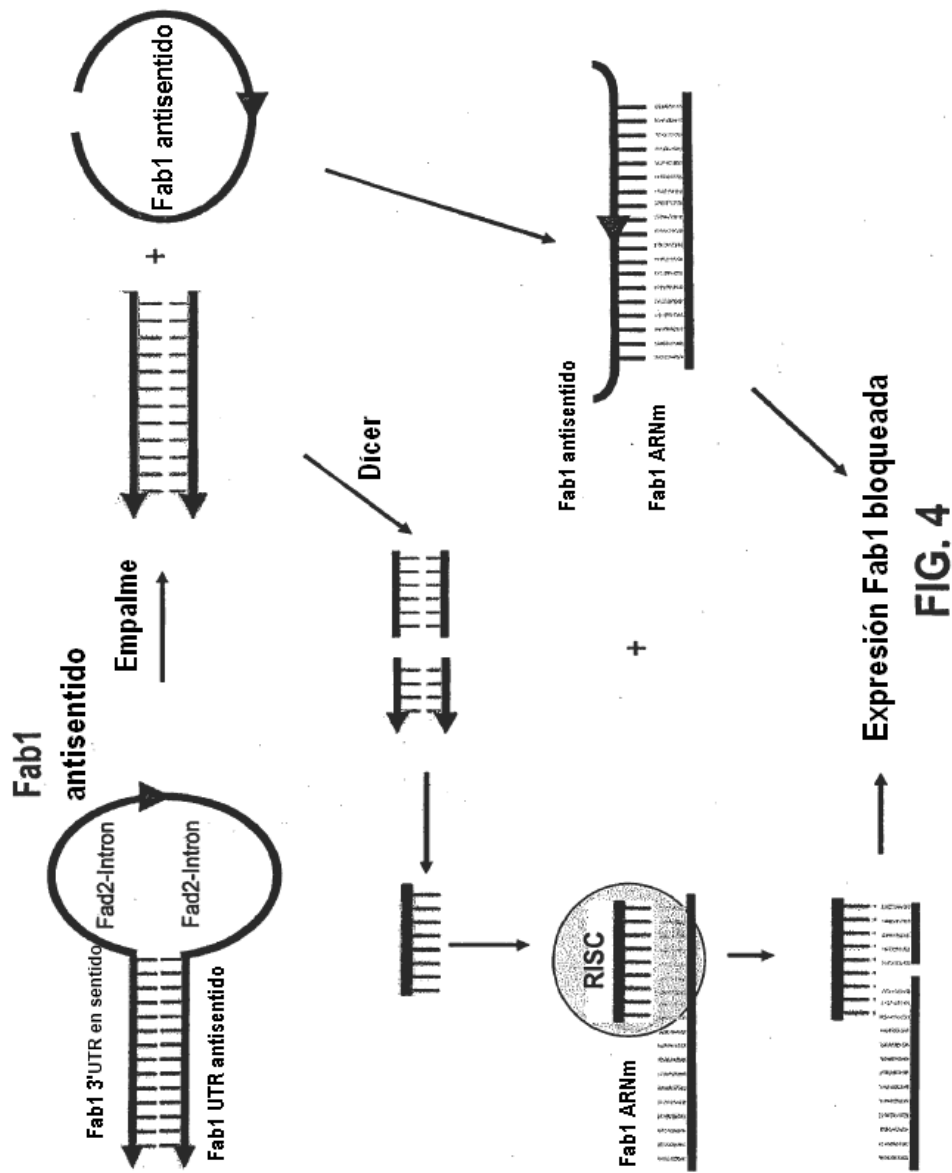


FIG. 4

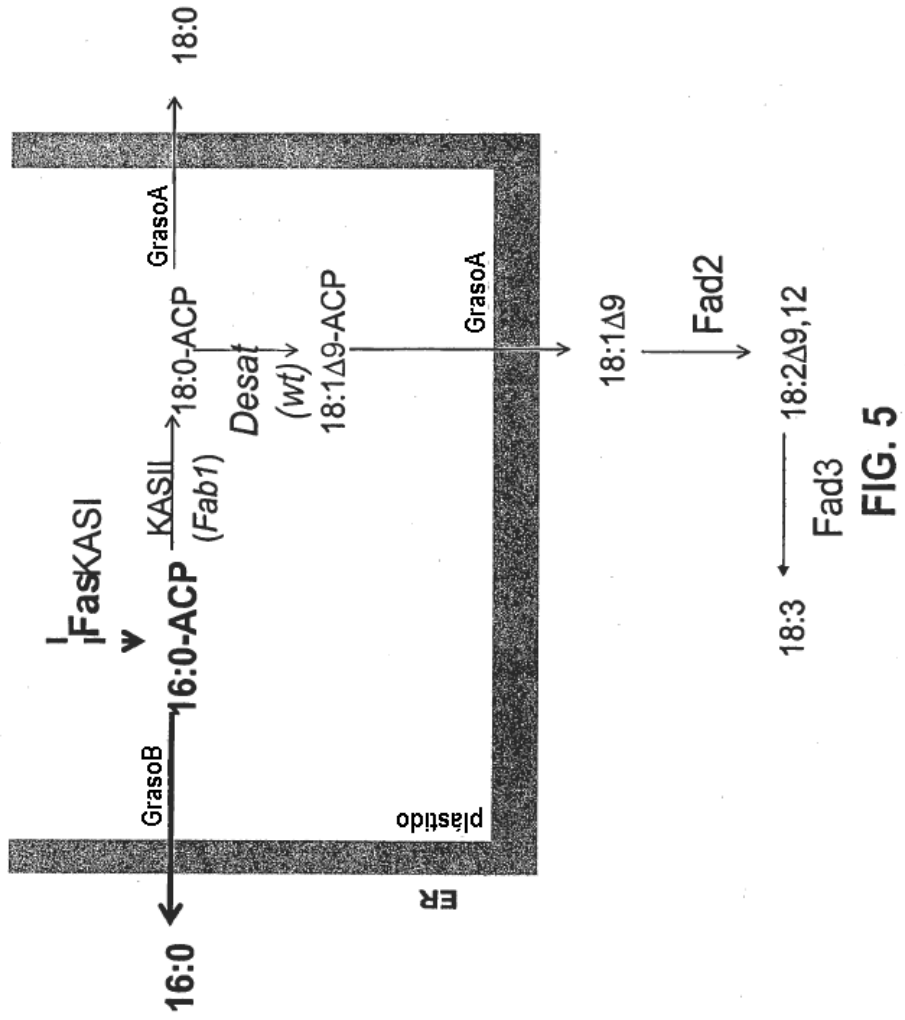


FIG. 5

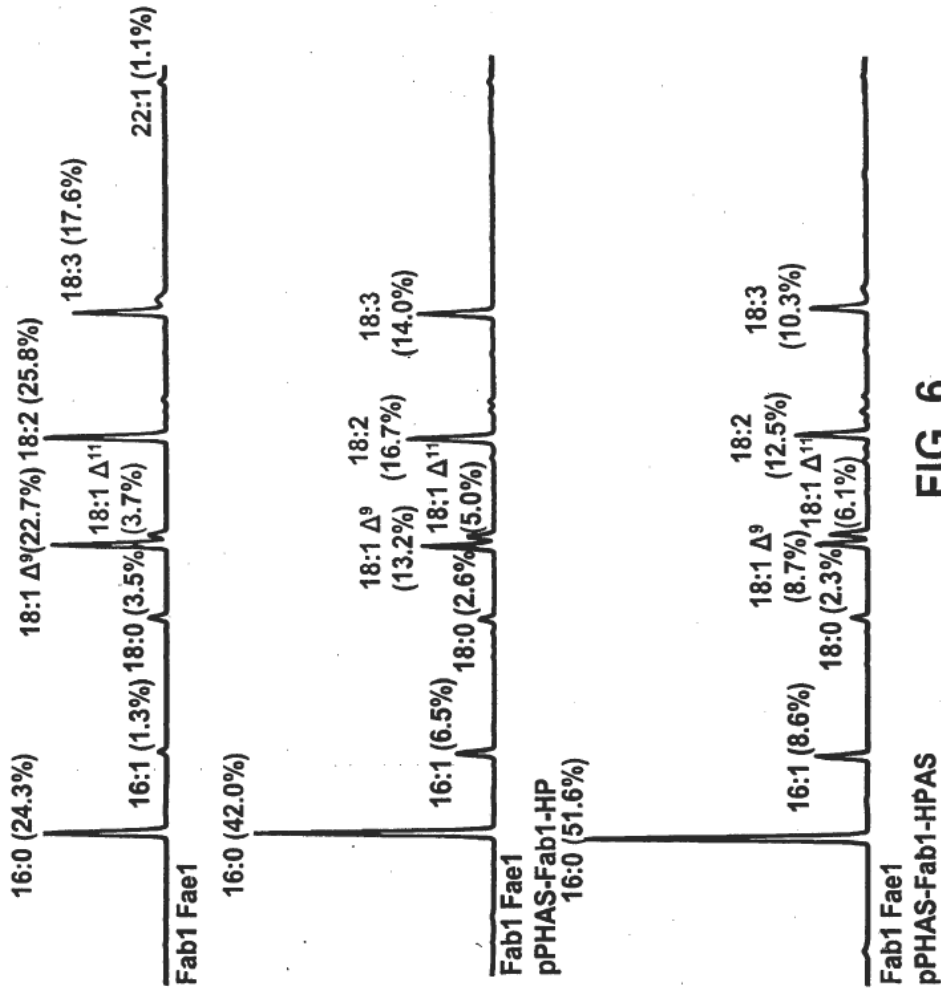


FIG. 6

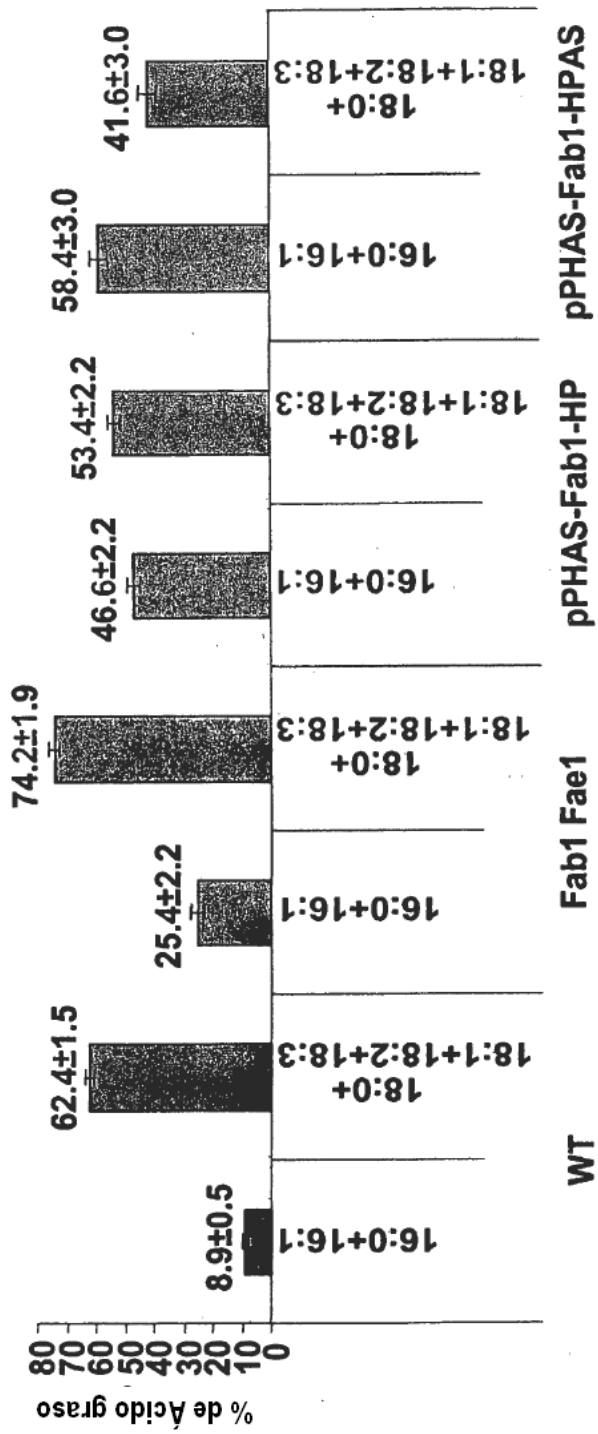


FIG. 7

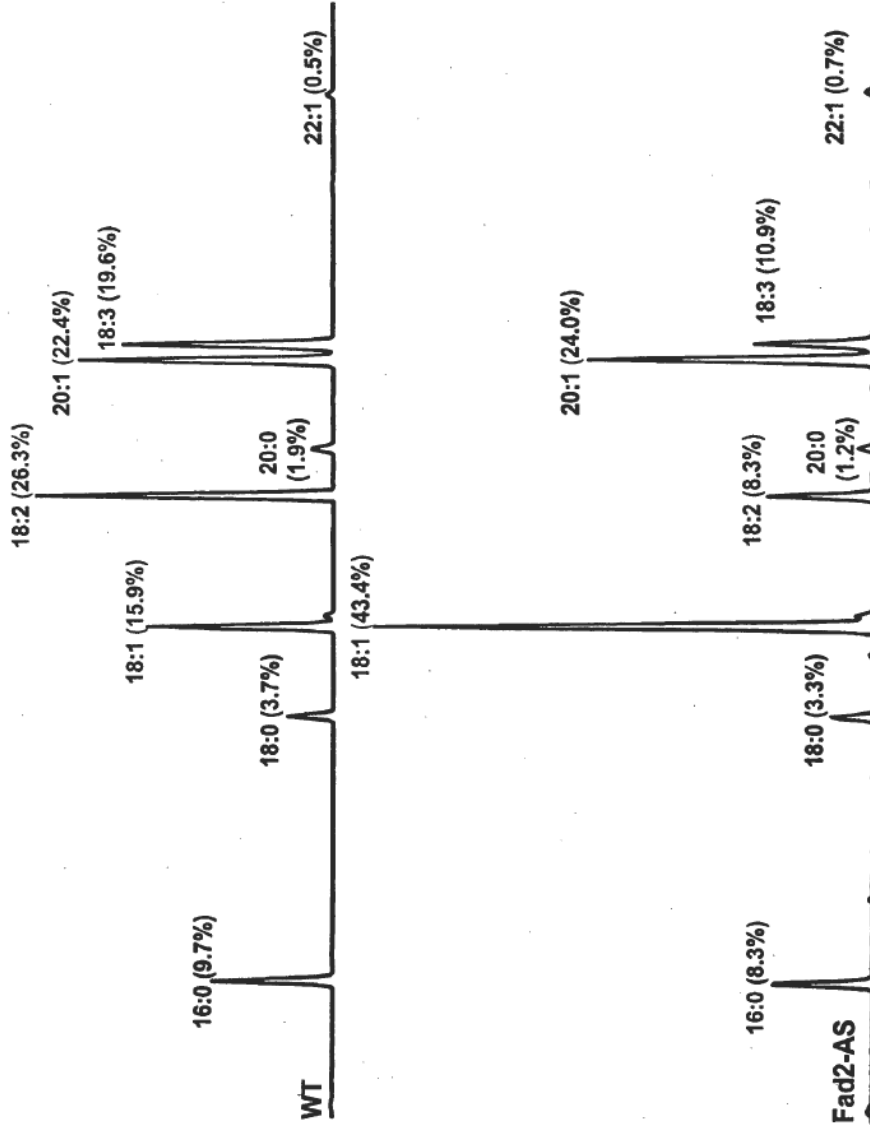


FIG. 8

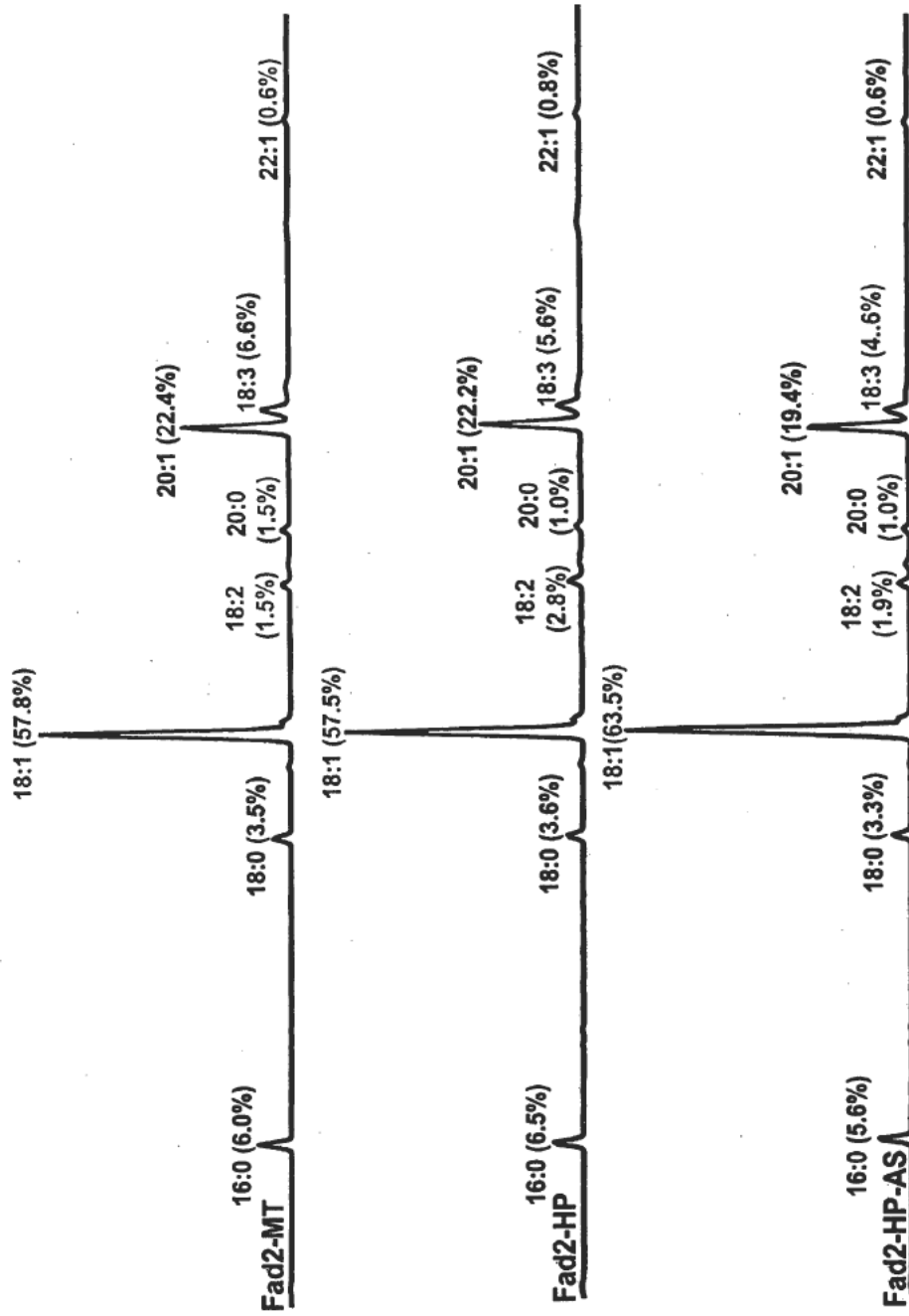


FIG. 9

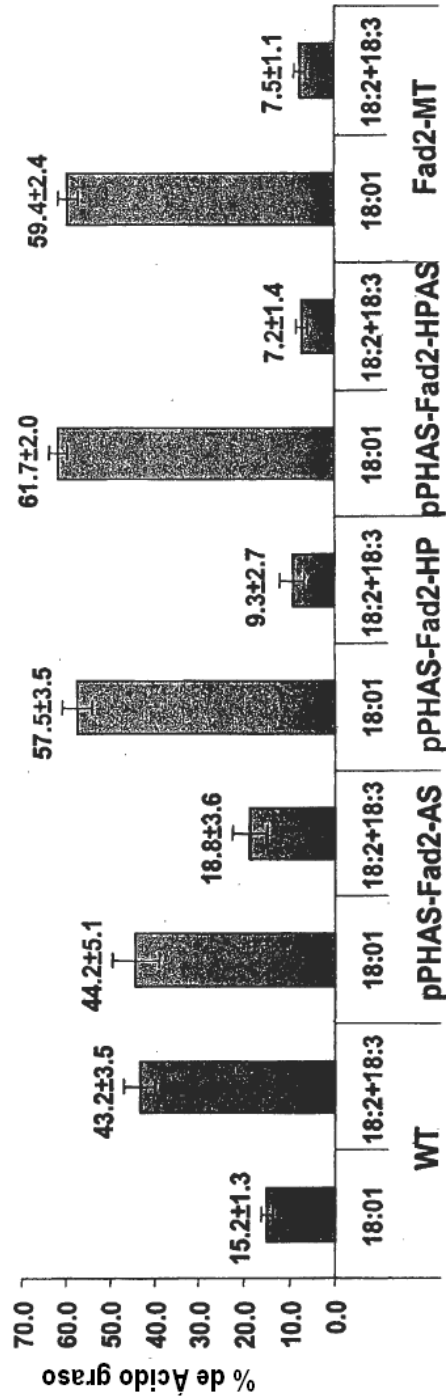


FIG. 10

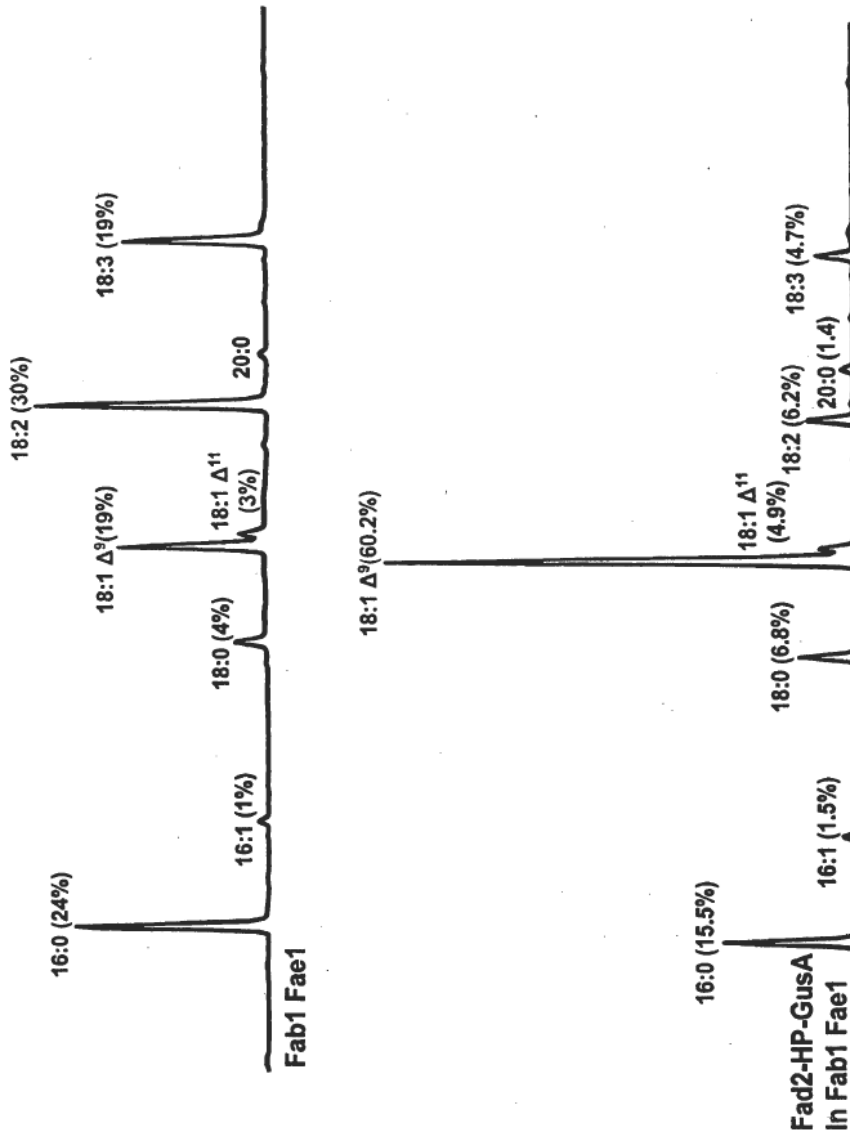


FIG. 11

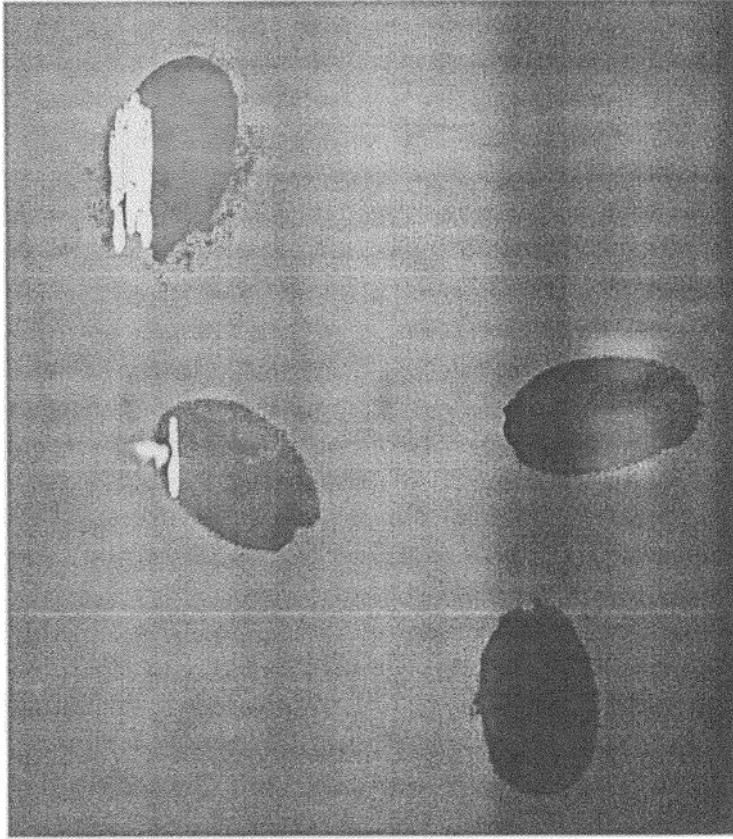


FIG. 12

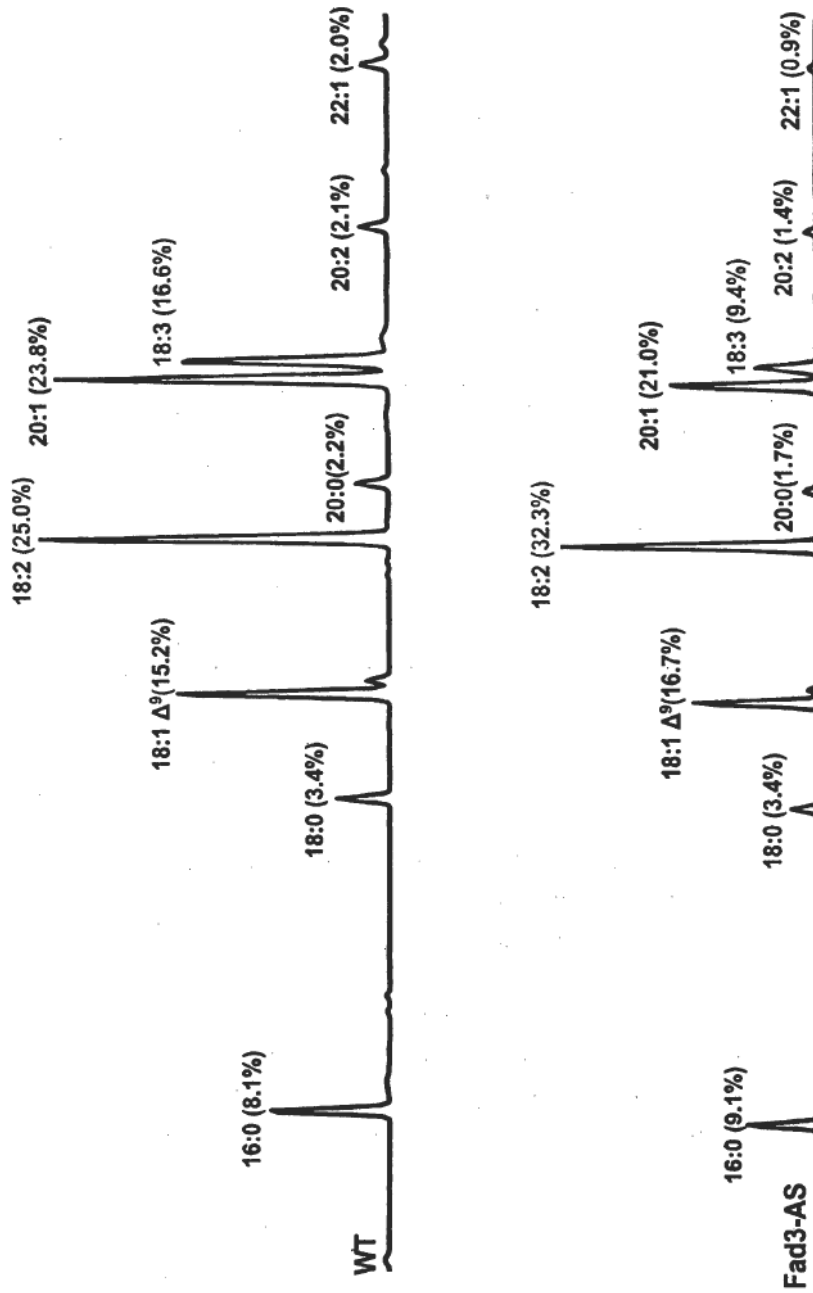


FIG. 13

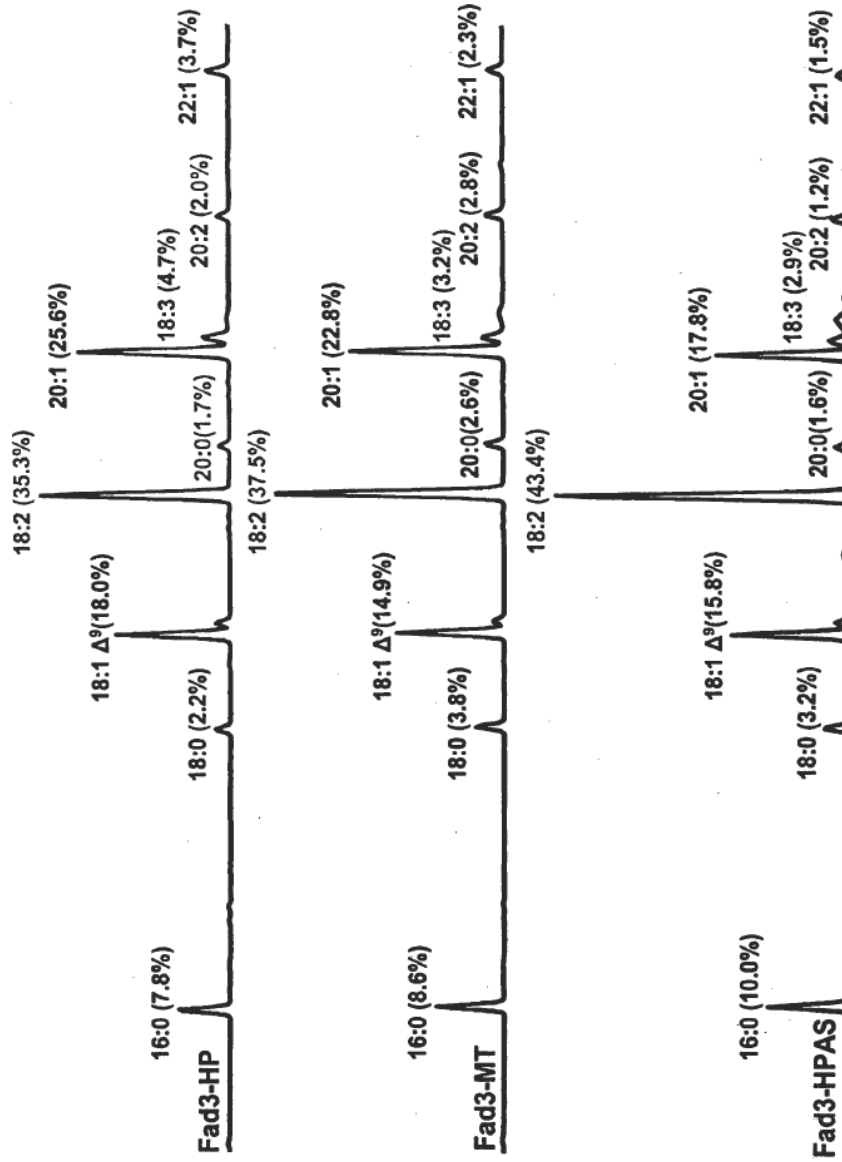


FIG. 14

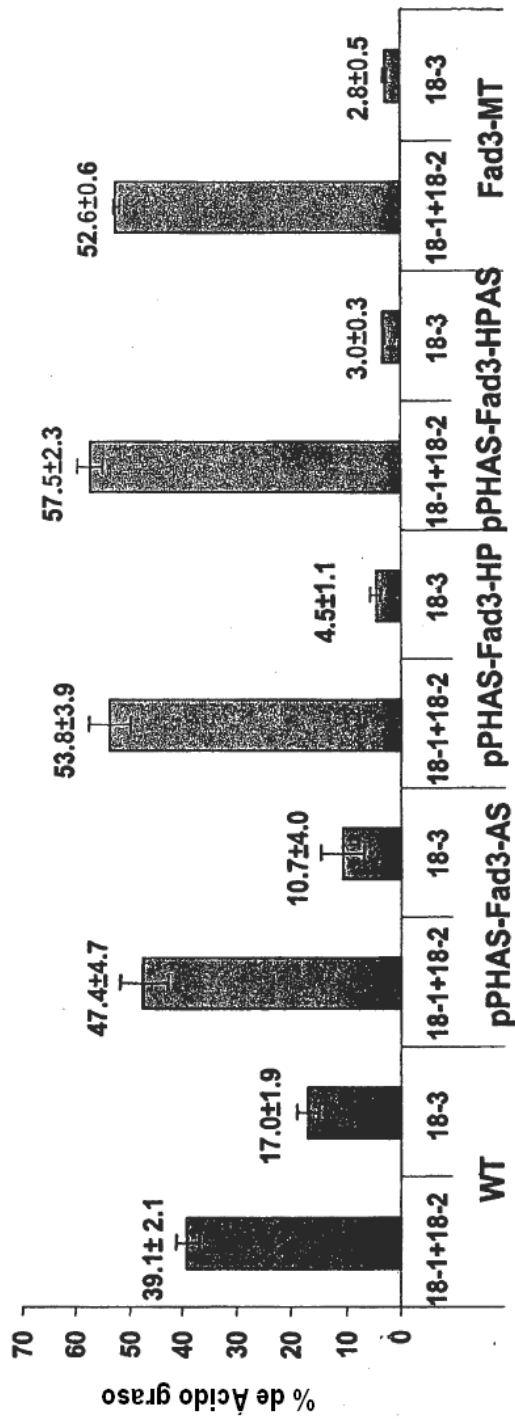


FIG. 15