

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 829**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 31/711 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2002 E 10178509 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 2280070**

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

30 Prioridad:

23.07.2001 US 307411 P

27.02.2002 US 360664 P

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

29.09.2015

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)
Office of the General Counsel Building 170, 3rd
Floor, Main Quad, P.O. Box 20386
Stanford CA 94305-2038, US**

72 Inventor/es:

**KAY, MARK y
MCCAFFREY, ANTON**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 546 829 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

Métodos y composiciones para la inhibición mediada por iARN de la expresión génica en mamíferos

5 Introducción

Campo de la invención

El campo de la presente invención es la iARN.

10

Antecedentes de la invención

El ARN bicatenario induce el silenciamiento génico fuerte y específico mediante un proceso denominado interferencia por ARN (iARN) o silenciamiento génico postranscripcional (SGPT). La iARN está mediada por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (CSIA), una nucleasa multicomponente específica de secuencia que destruye mensajeros de ARN homólogos al desencadenador del silenciamiento. Se sabe que el CSIA contiene ARN cortos (aproximadamente 22 nucleótidos) derivados del desencadenador de ARN bicatenario.

15

La iARN se ha convertido en el método de elección para las investigaciones de pérdida de función en numerosos sistemas que incluyen *C. elegans*, *Drosophila*, hongos, plantas, e incluso de líneas celulares de mamífero. Para silenciar específicamente un gen en la mayoría de las líneas celulares de mamífero, se usan ARN interferentes pequeños (ARNip) debido a que los ARNbc grandes (>30 pb) desencadenan la respuesta de interferón y producen silenciamiento génico no específico.

20

Hasta la fecha, los solicitantes no conocían ningún informe de aplicación satisfactoria de tecnología de iARN a organismos de mamífero no embrionarios. La demostración de que la iARN funciona en organismos de mamífero no embrionarios proporcionaría varias aplicaciones adicionales importantes para la tecnología de iARN, que incluyen tanto investigación como aplicaciones terapéuticas, y es, por tanto, de intenso interés.

25

30 Bibliografía relevante

Documento WO 01/68836. Véanse también: Bernstein et al., RNA (2001) 7: 1509-1521; Bernstein et al., Nature (2001) 409:363-366; Billy et al., Proc. Nat'l Acad. Sci USA (2001) 98:14428-33; Caplan et al., Proc. Nat'l Acad. Sci USA (2001) 98:9742-7; Carthew et al., Curr. Opin. Cell Biol (2001) 13: 244-8; Elbashir et al., Nature (2001) 411: 494-498; Hammond et al., Science (2001) 293:1146-50; Hammond et al., Nat. Ref. Genet. (2001) 2:110-119; Hammond et al., Nature (2000) 404:293-296; McCaffrey et al., Nature (2002): 418-38-39; y McCaffrey et al., Mol. Ther. (2002) 5:676-684; Paddison et al., Genes Dev. (2002) 16:948-958; Paddison et al., Proc. Nat'l Acad. Sci USA (2002) 99:1443-48; Sui et al., Proc. Nat'l Acad. Sci USA (2002) 99:5515-20. Las patentes de EE.UU. de interés incluyen 5.985.847 y 5.922.687. También de interés es el documento WO/11092. Referencias de interés adicionales incluyen: Acsadi et al., New Biol. (Jan. 1991) 3:71-81; Chang et al., J. Virol. (2001) 75:3469-3473; Hickman et al., Hum. Gen. Ther. (1994) 5:1477-1483; Liu et al., Gene Ther. (1999) 6:1258-1266; Wolff et al., Science (1990) 247: 1465-1468; y Zhang et al., Hum. Gene Ther. (1999) 10:1735-1737; y Zhang et al., Gene Ther. (1999) 7:1344-1349.

35

40

Resumen de la invención

45

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento que comprende administrar la composición a un mamífero adulto para reducir la expresión de una secuencia diana en el hígado de dicho mamífero adulto, comprendiendo la composición un vehículo farmacéuticamente aceptable y:

50

un agente de iARN seleccionado de un ARNip o un ARNhp, en el que dicho ARNip o ARNhp es específico para una secuencia diana presente en una célula hepática de dicho mamífero adulto y reduce la expresión de la secuencia diana y en el que el ARNip o ARNhp tiene entre 15 y 30 nucleótidos de longitud o tiene una estructura de dúplex de 15 a 29 pares de bases de longitud; o

55

un vector que comprende ADN que se transcribe *in vivo* en dicho ARNhp o ARNip.

La administración puede ser mediante un protocolo de administración hidrodinámica.

Breve descripción de las figuras

60

La Figura 1 proporciona construcciones de expresión empleadas en los experimentos de iARN descritos a continuación.

65

Figuras 2A a 2D: interferencia por ARN en ratones adultos. Figura 2A) Imágenes representativas de luz emitida de ratones co-transfectados con el plásmido de luciferasa pGL3-control y tanto sin ARNip (izquierda), ARNip de luciferasa (centro) como ARNip sin relacionar (derecha). Una imagen en pseudocolor que representa la intensidad de luz emitida (rojo principalmente y azul menos intenso) superpuesta en una imagen de referencia de escala de grises (para orientación) muestra que el iARN funciona en adultos mamíferos. Cuarenta µg de

ARNip 21-meros hibridados (Dharmacon) se co-inyectaron en los hígados de ratones con los 2 µg de pGL3-ADN de control y 800 unidades de RNasin (Promega) en 1,8 ml de PBS en 5-7 segundos. Setenta y dos horas después de la inyección original, los ratones se anestesiaron y se les administró 3 mg de luciferina intraperitonealmente 15 min antes de la obtención de imágenes. Figura 2B) Resumen de datos de ARNip. Los ratones que recibieron ARNip de luciferasa emitieron significativamente menos luz que los controles no tratados. Se realizó un análisis unilateral de ANOVA con una prueba de Fisher a posteriori. Los grupos de ARNip sin tratar y sin relacionar fueron estadísticamente similares. Figura 2C) pShh1-Ff1 (centro) pero no pShh1-Ff1rev (derecha) redujo la expresión de luciferasa en ratones en comparación con el control no tratado (izquierda). Se co-inyectaron 10 µg de pShh1-Ff1 o pShh1-rev con 40 µg de pLuc-NS5B en 1,8 ml de PBS. Figura 2D) Cuantificación de datos de pShh1. Los animales se trataron según las Pautas de la NIH para el Cuidado de Animales y las Pautas de la Universidad de Stanford.

La Figura 3 proporciona una representación esquemática de las construcciones empleadas en un ensayo de inhibición del VHC antisentido con morfolino fosforamidato realizado en la Sección experimental, más adelante. La Figura 4 proporciona información de fondo del mecanismo de inhibidores antisentido.

Las Figuras 5A a 5F proporcionan resultados gráficos de un ensayo de inhibición del VHC antisentido con morfolino fosforamidato.

Definiciones

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

Como se usa en el presente documento, el término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico con el que se ha asociado. Un tipo de vector es un vector integrado genómico, o “vector integrado”, que puede integrarse en el ADN cromosómico de la célula huésped. Otro tipo de vector es un vector episómico, es decir, un ácido nucleico capaz de replicación extra-cromosómica en un huésped apropiado, por ejemplo, una célula huésped eucariota o procariota. Los vectores que pueden dirigir la expresión de genes a los que están operativamente asociados se denominan en el presente documento “vectores de expresión”. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” se usan indistintamente, a menos que sea de otro modo evidente del contexto.

Como se usa en el presente documento, el término “ácido nucleico” se refiere a polinucleótidos tales como ácido desoxirribonucleico (ADN), y, cuando corresponda, ácido ribonucleico (ARN). También debe entenderse que el término incluye, según sea aplicable a la realización que se describe, polinucleótidos monocatenarios (tales como sentido o antisentido) y bicatenarios.

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

Una “secuencia codificante de proteína” o una secuencia que “codifica” un polipéptido o péptido particular es una secuencia de ácidos nucleicos que se transcribe (en el caso de ADN) y se traduce (en el caso de ARNm) en un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se pone bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de iniciación en el extremo 5' (amino) y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3' (carboxi). Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, ADNc de ARNm procariota o eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN procariota o eucariota, e incluso secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de la transcripción normalmente se localizará 3' con respecto a la secuencia codificante.

Asimismo, “codifica”, a menos que sea evidente de su contexto, pretenderá incluir secuencias de ADN que codifican un polipéptido, como normalmente se usa el término, además de secuencias de ADN que se transcriben en moléculas antisentido inhibitorias.

El término “pérdida de función”, como se refiere a genes inhibidos por el método de iARN objeto, se refiere a la disminución en el nivel de expresión de un gen cuando se compara con el nivel en ausencia del agente de iARN.

El término “expresión” con respecto a una secuencia de gen se refiere a la transcripción del gen y, según convenga, la traducción del transcrito de ARNm resultante a una proteína. Así, como será evidente del contexto, la expresión de una secuencia codificante de proteína resulta de la transcripción y traducción de la secuencia codificante.

“Células”, “células huésped” o “células huésped recombinantes” son términos usados indistintamente en el presente documento. Se entiende que tales términos se refieren no solo a la célula particular objeto, sino a la progenie o posible progenie de una célula tal. Debido a que ciertas modificaciones pueden producirse en generaciones sucesivas debido a tanto mutación como a influencias medioambientales, tal progenie puede, en realidad, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía están incluidas dentro del alcance del término como se usa en el presente documento.

Por “virus recombinante” se indica un virus que se ha alterado genéticamente, por ejemplo, mediante la adición o inserción de una construcción de ácidos nucleicos heteróloga en la partícula.

Como se usa en el presente documento, los términos “transducción” y “transfección” con reconocidos en la técnica y significan la introducción de un ácido nucleico, por ejemplo, un vector de expresión, en una célula receptora por transferencia génica mediada por ácido nucleico. “Transformación”, como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso en el que un genotipo de célula se cambia como resultado de la captación celular de ADN o ARN exógeno, y, por ejemplo, la célula transformada expresa una construcción de ARNbc.

“Transfección transitoria” se refiere a casos en los que el ADN exógeno no se integra en el genoma de una célula transfectada, por ejemplo, cuando el ADN episómico se transcribe en ARNm y se traduce en proteína.

Una célula se ha “transfectado establemente” con una construcción de ácidos nucleicos cuando la construcción de ácidos nucleicos puede ser heredada por células hija.

Como se usa en el presente documento, una “construcción de gen indicador” es un ácido nucleico que incluye un “gen indicador” operativamente ligado a al menos una secuencia reguladora transcripcional. La transcripción del gen indicador está controlada por estas secuencias a las que están asociadas. La actividad de al menos una o más de estas secuencias de control puede regularse directa o indirectamente por la proteína receptora diana. Secuencias de control de la transcripción a modo de ejemplo son secuencias promotoras. Un gen indicador pretende incluir una construcción de promotor-gen indicador que se expresa heterológamente en una célula.

Como se usa en el presente documento, “células transformadas” se refiere a células que se han convertido espontáneamente en un estado de crecimiento descontrolado, es decir, han adquirido la capacidad de crecer mediante un número indefinido de divisiones en cultivo. Las células transformadas pueden caracterizarse por tales términos como neoplásicas, anaplásicas y/o hiperplásicas, con respecto a su pérdida de control del crecimiento. Para los fines de la presente invención, los términos “fenotipo transformado de células de mamífero malignas” y “fenotipo transformado” pretenden englobar, pero no limitarse a, cualquiera de los siguientes rasgos fenotípicos asociados a la transformación celular de células de mamífero: inmortalización, transformación morfológica o del crecimiento, y tumorigenicidad, como se ha detectado por crecimiento prolongado en cultivo celular, crecimiento en medios semi-sólidos, o crecimiento tumorigénico en animales inmuno-incompetentes o singénicos.

Como se usa en el presente documento, “proliferar” y “proliferación” se refieren a células que se someten a mitosis.

Como se usa en el presente documento, “células inmortalizadas” se refiere a células que han sido alteradas mediante medios químicos, genéticos y/o recombinantes de forma que las células tengan la capacidad para crecer mediante un número indefinido de divisiones en cultivo.

El “estado de crecimiento” de una célula se refiere a la tasa de proliferación de la célula y el estado de diferenciación de la célula.

“Inhibición de la expresión génica” se refiere a la ausencia (o disminución observable) en el nivel de producto de proteína y/o de ARNm de un gen diana. “Especificidad” se refiere a la capacidad para inhibir el gen diana sin manifestar efectos sobre otros genes de la célula. Las consecuencias de la inhibición pueden confirmarse por examen de las propiedades externas de la célula u organismo (como se presentó más adelante en los ejemplos) o por técnicas bioquímicas tales como hibridación en solución de ARN, protección de nucleasa, hibridación Northern, transcripción inversa, monitorización de la expresión génica con una micromatriz, unión a anticuerpo, enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), transferencia Western, radioinmunoensayo (RIA), otros inmunoensayos y análisis de células derivadas de la fluorescencia (FACS). Para la inhibición mediada por ARN en una línea celular u organismo completo, la expresión génica se ensaya convenientemente por el uso de un indicador o gen de resistencia a fármaco cuyo producto de proteína se ensaya fácilmente. Tales genes indicadores incluyen acetohidroxiácido sintasa (AHAS), fosfatasa alcalina (AP), beta galactosidasa (LacZ), beta glucuronidasa (GUS), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína verde fluorescente (GFP), peroxidasa de rábano picante (HRP), luciferasa (Luc), nopalina sintasa (NOS), octopina sintasa (OCS) y derivados de las mismas. Están disponibles múltiples marcadores de selección que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfinotricina, puromicina y tetraciclina.

Dependiendo del ensayo, la cuantificación de la cantidad de expresión génica permite determinar un grado de inhibición que es superior al 10 %, 33 %, 50 %, 90 %, 95 % o el 99 % en comparación con una célula no tratada

según la presente invención. Menores dosis de agente activo administrado y tiempos más largos después de la administración de agente activo pueden producir la inhibición en una fracción más pequeña de células (por ejemplo, al menos el 10 %, 20 %, 50 %, 75 %, 90 % o el 95 % de las células elegidas como diana). La cuantificación de la expresión génica en una célula puede mostrar cantidades similares de inhibición al nivel de acumulación de ARNm
 5 diana o traducción de proteína diana. Como un ejemplo, la eficiencia de la inhibición puede determinarse evaluando la cantidad de producto génico en la célula: el ARNm puede detectarse con una sonda de hibridación que tiene una secuencia de nucleótidos fuera de la región usada para el ARN bicatenario inhibidor, o puede detectarse polipéptido traducido con un anticuerpo producido contra la secuencia de polipéptidos de esa región.

10 **Descripción de las realizaciones específicas**

Se describen métodos y composiciones para modular, por ejemplo, reducir, la expresión de secuencias codificantes en mamíferos. En la presente invención, una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un ARNip o ARNhp o un molde de transcripción de los mismos, como se ha descrito anteriormente, es para su uso en
 15 un método de tratamiento que comprende administrar la composición a un mamífero adulto, por ejemplo, mediante un protocolo de administración hidrodinámica.

Antes de describir adicionalmente el objeto de la invención, debe entenderse que la invención no se limita a las realizaciones particulares de la invención descritas más adelante, ya que pueden hacerse variaciones de las realizaciones particulares y todavía entrar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. También debe entenderse que la terminología empleada es con el fin de describir realizaciones particulares, y no pretende ser limitante. En su lugar, el alcance de la presente invención se establecerá por las reivindicaciones adjuntas.

En esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencia en plural, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido para un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención.

Si se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, al décimo de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo, entre el límite superior e inferior de ese intervalo, y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido, está englobado dentro de la invención. Los límites superiores e inferiores de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, y también están englobados dentro de la invención, sometidos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Si el intervalo establecido incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de aquellos límites incluidos también están incluidos en la invención.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido para un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento puede usarse en la práctica o prueba de la invención, hasta el punto que entran dentro de las reivindicaciones, ahora se describen métodos, dispositivos y materiales representativos.

iARN en mamíferos no embrionarios

Como se ha resumido anteriormente, la invención objeto proporciona composiciones para su uso en realizar iARN en mamíferos no embrionarios, específicamente mamíferos adultos. En la descripción posterior de este aspecto de la invención objeto, los métodos objeto de iARN se describen primero en mayor detalle, seguido de una revisión de las diversas aplicaciones representativas en las que la invención objeto encuentra uso, además de kits que se usan en la práctica de la invención objeto.

MÉTODOS

Como se ha indicado anteriormente, un aspecto de la invención objeto proporciona composiciones para su uso en métodos de emplear iARN para reducir la expresión de un gen diana o genes en un huésped mamífero no embrionario. Reduciendo la expresión se indica que el nivel de expresión de un gen diana o secuencia codificante se reduce o inhibe al menos aproximadamente 2 veces, normalmente al menos aproximadamente 5 veces, por ejemplo, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces o más, en comparación con un control. En ciertas realizaciones, la expresión del gen diana se reduce a un grado tal que la expresión del gen diana/secuencia codificante se inhiba eficazmente. Por modular la expresión de un gen diana se indica alterar, por ejemplo, reducir, la transcripción/traducción de una secuencia codificante, por ejemplo, ADN genómico, ARNm, etc., en un producto de polipéptido, por ejemplo, proteína.

La invención objeto proporciona composiciones para su uso en métodos de modular la expresión de un gen diana en un organismo mamífero no embrionario, más específicamente un adulto mamífero. Por organismo mamífero no embrionario se indica un organismo mamífero o huésped que no es un embrión, es decir, está en una etapa de desarrollo que es posterior en el tiempo a la etapa embrionaria de desarrollo, por ejemplo, un feto, o un organismo

huésped en una etapa post-natal de desarrollo, por ejemplo, juvenil, adulto, etc.

En la práctica de los métodos objeto, una cantidad eficaz de un agente de iARN se administra al organismo huésped para modular la expresión de un gen diana de una manera deseable, por ejemplo, para lograr la reducción deseada en la expresión génica de la célula diana.

Por agente de iARN se indica un agente que modula la expresión de un gen diana por un mecanismo de interferencia por ARN. Los agentes de iARN empleados en la invención objeto son moléculas de ácidos ribonucleicos pequeñas (también denominadas en el presente documento ácidos ribonucleicos interferentes), es decir, oligorribonucleótidos, que están presentes en estructuras de dúplex, por ejemplo, dos oligorribonucleótidos distintos hibridados entre sí o un único ribooligonucleótido que asume una formación de horquilla pequeña para producir una estructura de dúplex. Por oligorribonucleótido se indica un ácido ribonucleico que no supera aproximadamente 100 nt de longitud, y normalmente no supera aproximadamente 75 nt de longitud, en el que la longitud en ciertas realizaciones es inferior a aproximadamente 70 nt. En algunas realizaciones, si el agente de ARN es una estructura de dúplex de dos ácidos ribonucleicos distintos hibridados entre sí, por ejemplo, un ARNip (tal como d-ARNip como se describe en la solicitud pendiente de tramitación nº de serie 60/377.704), la longitud de la estructura de dúplex es de aproximadamente 15 a 29 pb, en la que las longitudes entre aproximadamente 20 y 29 pb, por ejemplo, 21 pb, 22 pb, son de particular interés en ciertas realizaciones. Si el agente de ARN es una estructura de dúplex de un único ácido ribonucleico que está presente en una formación de horquilla, es decir, un ARNhp, la longitud de la porción hibridada de la horquilla normalmente es la misma que la proporcionada anteriormente para el tipo de ARNip de agente o más por 4-8 nucleótidos hasta el punto de que éste entre dentro de las reivindicaciones. El peso de los agentes de iARN de esta realización normalmente oscila de aproximadamente 5.000 daltons a aproximadamente 35.000 daltons, y en muchas realizaciones es al menos aproximadamente 10.000 daltons e inferior a aproximadamente 27.500 daltons, frecuentemente inferior a aproximadamente 25.000 daltons.

En ciertas realizaciones, en lugar del agente de iARN que es un ácido ribonucleico interferente, por ejemplo, un ARNip o ARNhp como se ha descrito anteriormente, el agente de iARN puede codificar un ácido ribonucleico interferente, por ejemplo, un ARNhp, como se ha descrito anteriormente. En otras palabras, el agente de iARN puede ser un molde transcripcional del ácido ribonucleico interferente. En estas realizaciones, el molde transcripcional es un ADN que codifica el ácido ribonucleico interferente, presente en un vector, en el que se conocen varios vectores diferentes en la técnica, por ejemplo, un vector plasmídico, un vector viral, etc.

El agente de iARN puede administrarse al huésped mamífero no embrionario usando cualquier protocolo conveniente, en el que el protocolo empleado normalmente es un protocolo de administración de ácido nucleico, en el que se conocen varios protocolos diferentes tales en la técnica. La siguiente discusión proporciona una revisión de protocolos de administración de ácido nucleico representativos que pueden emplearse. Los ácidos nucleicos pueden introducirse en tejidos o células huésped por cualquier número de vías, que incluyen infección viral, microinyección o fusión de vesículas. También puede usarse inyección a chorro para administración intramuscular, como se describe por Furth et al. (1992), *Anal Biochem* 205:365-368. Los ácidos nucleicos pueden recubrirse sobre micropartículas de oro, y administrarse intradérmicamente por un dispositivo de bombardeo de partículas, o "pistola de genes" como se describe en la bibliografía (véase, por ejemplo, Tang et al. (1992), *Nature* 356:152-154), en la que los microproyectiles de oro están recubiertos con el ADN, luego se bombardea en las células de la piel. Los vectores de expresión pueden usarse para introducir los ácidos nucleicos en una célula. Tales vectores generalmente tienen sitios de restricción convenientes localizados cerca de la secuencia promotora para proporcionar la inserción de secuencias de ácidos nucleicos. Pueden prepararse casetes de transcripción que comprenden una región de iniciación de la transcripción, el gen diana o fragmento del mismo, y una región de terminación transcripcional. Los casetes de transcripción pueden introducirse en varios vectores, por ejemplo, plásmido; retrovirus, por ejemplo, lentivirus; adenovirus; y similares, en los que los vectores pueden mantenerse transitoria o establemente en las células, normalmente durante un periodo de al menos aproximadamente un día, más normalmente durante un periodo de al menos aproximadamente varios días a varias semanas.

Por ejemplo, el agente de iARN puede alimentarse directamente a, inyectarse en, el organismo huésped que contiene el gen diana. El agente puede introducirse directamente en la célula (es decir, intracelularmente); o introducirse extracelularmente en una cavidad, espacio intersticial, en la circulación de un organismo, introducirse por vía oral, etc. Métodos para la introducción oral incluyen mezcla directa de ARN con comida del organismo. Métodos físicos de introducción de ácidos nucleicos incluyen inyección directamente en la célula o inyección extracelular en el organismo de una solución de ARN. El agente puede introducirse en una cantidad que permite la administración de al menos una copia por célula. Mayores dosis (por ejemplo, al menos 5, 10, 100, 500 ó 1000 copias por célula) del agente pueden dar inhibición más eficaz; menores dosis también pueden ser útiles para aplicaciones específicas.

En ciertas realizaciones, se emplea un protocolo de administración hidrodinámica de ácido nucleico. Si el agente es un ácido ribonucleico, el protocolo de administración hidrodinámica de ácido nucleico descrito en detalle más adelante es de particular interés. Si el agente es un ácido desoxirribonucleico, los protocolos de administración hidrodinámica de ácido desoxirribonucleico descritos en Chang et al., *J. Virol.* (2001) 75:3469-3473; Liu et al., *Gene Ther.* (1999) 6:1258-1266; Wolff et al., *Science* (1990) 247: 1465-1468; Zhang et al., *Hum. Gene Ther.* (1999)

10:1735-1737; y Zhang et al., Gene Ther. (1999) 7:1344-1349; son de interés.

5 Protocolos de administración de ácido nucleico adicionales de interés incluyen, pero no se limitan a: aquellos descritos en las patentes de EE.UU. de interés incluyen 5.985.847 y 5.922.687 (cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia); documento WO/11092; Acsadi et al., New Biol. (1991) 3:71-81; Hickman et al., Hum. Gen. Ther. (1994) 5:1477-1483; y Wolff et al., Science (1990) 247: 1465-1468; etc.

10 Dependiendo de la naturaleza del agente de iARN, el (los) agente(s) activo(s) puede(n) administrarse al huésped usando cualquier medio conveniente que pueda producir la modulación deseada de la expresión del gen diana. Así, el agente puede incorporarse en varias formulaciones para administración terapéutica. Más particularmente, los agentes de la presente invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas por combinación con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables apropiados, y pueden formularse en preparaciones en formas sólidas, semi-sólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, disoluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes y aerosoles. Como tal, la administración de los agentes puede 15 lograrse de diversas formas, que incluyen administración oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, intratraqueal, etc.

20 En las formas de dosificación farmacéuticas, los agentes pueden administrarse solos o en asociación apropiada, además de en combinación, con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los siguientes métodos y excipientes son simplemente a modo de ejemplo y de ninguna forma son limitantes.

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

30 Los agentes pueden formularse en preparaciones para inyección disolviéndolos, suspendiéndolos o emulsionándolos en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros similares, glicéridos de ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol; y si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizadores y conservantes.

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

40 Además, los agentes pueden prepararse en supositorios mezclando con varias bases tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse rectalmente mediante un supositorio. El supositorio puede incluir vehículos tales como manteca de cacao, carboceras y polietilenglicoles, que funden a temperatura corporal, pero están solidificados a temperatura ambiente.

45 Pueden proporcionarse formas de dosificación unitaria para administración oral o rectal tales como jarabes, elixires y suspensiones en las que cada unidad de dosificación, por ejemplo, cucharadita al ras, cucharada grande, comprimido o supositorio, contenga una cantidad predeterminada de la composición que contiene uno o más inhibidores. Similarmente, las formas de dosificación unitaria para inyección o administración intravenosa pueden comprender el (los) inhibidor(es) en una composición como solución en agua estéril, solución salina normal u otro vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 El término "forma de dosificación unitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuestos de la presente invención calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las 55 memorias descriptivas para las novedosas formas de dosificación unitaria de la presente invención dependen del compuesto particular empleado y el efecto que va a lograrse, y la farmacodinámica asociada a cada compuesto en el huésped.

60 Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, vehículos o diluyentes, están fácilmente disponibles para el público. Además, sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste del pH y de tamponamiento, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizadores, agentes humectantes y similares, están fácilmente disponibles para el público.

65 Aquellos expertos en la materia apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar en función del compuesto específico, la naturaleza del vehículo de administración, y similares. Dosificaciones preferidas para un compuesto dado son fácilmente determinables por aquellos expertos en la materia mediante varios medios.

La administración de una cantidad eficaz de un agente de iARN a un huésped mamífero no embrionario según como se ha descrito anteriormente produce una modulación de la expresión de gen(es) diana, por ejemplo, una reducción de la expresión de gen(es) diana, como se ha descrito anteriormente.

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

10 Los métodos anteriormente descritos encuentran uso en varias aplicaciones diferentes, tipos representativos de las cuales se describen ahora en mayor detalle a continuación.

UTILIDAD

15 Los métodos descritos en el presente documento encuentran uso en varias aplicaciones diferentes, en las que aplicaciones representativas incluyen tanto aplicaciones académicas / de investigación como aplicaciones terapéuticas. Cada uno de estos tipos de aplicaciones representativas se describe más completamente más adelante. La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento.

20

Aplicación académica / de investigación

25 Los métodos descritos en el presente documento encuentran uso en varios tipos diferentes de aplicaciones académicas, de investigación, en las que se desea modular la expresión de uno o más genes diana (secuencias codificantes) en un huésped mamífero, por ejemplo, para determinar la función de un gen diana/secuencia codificante en un huésped mamífero. Los métodos encuentran uso particular en ensayos de tipo "pérdida de función", en los que se emplean los métodos objeto para reducir o disminuir o inhibir la expresión de uno o más genes diana/secuencias codificantes en un huésped mamífero.

30 Como tal, una utilidad representativa es como un método de identificar la función génica en un mamífero no embrionario, en el que un agente de iARN se administra a un mamífero con el fin de inhibir la actividad de un gen diana de función previamente desconocida. En lugar del aislamiento que requiere tiempo y es laborioso de mutantes por cribado genético tradicional, la genómica funcional usando los métodos objeto determina la función de genes sin caracterizar administrando un agente de iARN para reducir la cantidad y/o alterar el momento exacto de la actividad del gen diana. Tales métodos pueden usarse en determinar posibles dianas para productos farmacéuticos, entendimiento normal y acontecimientos patológicos asociados al desarrollo, determinación de vías de señalización responsables del desarrollo postnatal / envejecimiento, y similares. La velocidad creciente de adquisición de la información de la secuencia de nucleótidos de fuentes genómicas y de genes expresados, que incluyen secuencias

35 totales para genomas de mamífero, puede acoplarse al uso de los métodos para determinar la función génica en un organismo mamífero vivo. Puede usarse preferencia de diferentes organismos para usar codones particulares, buscando en bases de datos de secuencias para productos génicos relacionados, correlacionando el mapa de enlace de rasgos genéticos con el mapa físico del que se derivan las secuencias de nucleótidos y métodos de inteligencia artificial para definir supuestos marcos de lectura abiertos de las secuencias de nucleótidos adquiridas en tales proyectos de secuenciación.

40

45

Un simple ensayo representativo inhibe la expresión génica según la secuencia parcial disponible de una marca de secuencia expresada (EST). Alteraciones funcionales en el crecimiento, desarrollo, metabolismo, resistencia a enfermedad u otros procesos biológicos serían indicativos de la función normal del producto génico de EST. La función del gen diana puede ensayarse a partir de los efectos que tiene sobre el mamífero cuando se inhibe la actividad génica.

50 Si se determina que una característica de un organismo está genéticamente asociada a un polimorfismo mediante análisis de RFLP o QTL, la presente invención puede usarse para saber más sobre si ese polimorfismo genético podría ser directamente responsable de la característica. Por ejemplo, un fragmento que define el polimorfismo genético o secuencias en la vecindad de un polimorfismo genético tal puede emplearse para producir un agente de iARN, agente que puede entonces administrarse al mamífero, y puede determinarse si una alteración en la característica se correlaciona con la inhibición.

60 Los métodos descritos en el presente documento son útiles en permitir la inhibición de genes esenciales. Tales genes pueden requerirse para la viabilidad de organismos en solo etapas particulares del desarrollo o compartimentos celulares. Puede producirse el equivalente funcional de mutaciones condicionales inhibiendo la actividad del gen diana cuando o donde no se requiera para la viabilidad. El método permite la adición de un agente de iARN en momentos específicos del desarrollo y localizaciones en el organismo sin introducir mutaciones permanentes en el genoma diana.

65 En situaciones en las que el corte y empalme alternativo produce una familia de transcritos que son distinguidos por

el uso de exones característicos, los presentes métodos pueden dirigir la inhibición mediante los exones apropiados para inhibir específicamente o para distinguir entre las funciones de miembros de la familia. Por ejemplo, una hormona que contuvo un dominio transmembranario alternativamente cortado y empalmado puede expresarse en tanto formas unidas a la membrana como secretadas. En lugar de aislar una mutación no sentido que termina la traducción antes del dominio transmembranario, las consecuencias funcionales de tener solo hormona secretada pueden determinarse según la invención dirigiendo el exón que contiene el dominio transmembranario e inhibiendo así la expresión de hormona unida a la membrana.

Aplicaciones terapéuticas

La presente invención encuentra uso en varias aplicaciones terapéuticas en las que se desea modular, por ejemplo, uno o más genes diana en un mamífero, como se ha descrito anteriormente. En tales métodos, una cantidad eficaz de un agente de iARN activo se administra al huésped mamífero. Por cantidad eficaz se indica una dosificación suficiente para modular la expresión del (de los) gen(es) diana(s), según se desee. Como se indica anteriormente, en muchas realizaciones de este tipo de aplicación, los métodos objeto se emplean para reducir/inhibir la expresión de uno o más genes diana en el huésped con el fin de lograr un resultado terapéutico deseado.

Dependiendo de la naturaleza de la afección que esté tratándose, el gen diana puede ser un gen derivado de la célula, un gen endógeno, un gen patológicamente mutado, por ejemplo, un gen causante de cáncer, un transgén, o un gen de un patógeno que está presente en la célula después de la infección de la misma. Dependiendo del gen diana particular y la dosis de agente de iARN administrada, el procedimiento puede proporcionar pérdida de función parcial o completa para el gen diana. Dosis menores del material inyectado y tiempos más largos después de la administración del agente de iARN pueden producir la inhibición en una fracción más pequeña de células.

Los métodos objeto encuentran uso en el tratamiento de varias condiciones diferentes en las que se desea la modulación de la expresión del gen diana en un huésped mamífero. Mediante tratamiento se indica que se logra al menos una mejora de los síntomas asociados a la afección que afecta al huésped, usándose la mejora en un amplio sentido para referirse a al menos una reducción en la magnitud de un parámetro, por ejemplo, síntoma, asociado a la condición que está tratándose. Como tal, el tratamiento también incluye situaciones en las que la afección patológica, o al menos síntomas asociados a la misma, se inhiben completamente, por ejemplo, se previene que ocurra, o se detiene, por ejemplo, se termina, de forma que el huésped ya no padezca la afección, o al menos los síntomas que caracterizan la afección.

Varios huéspedes son tratables según los métodos objeto. Generalmente, tales huéspedes son "mamíferos" o "de mamífero," usándose estos términos ampliamente para describir organismos que están dentro de la clase mammalia, que incluye los órdenes carnívoros (por ejemplo, perros y gatos), roedores (por ejemplo, ratones, cobayas y ratas) y primates (por ejemplo, seres humanos, chimpancés y monos). En muchas realizaciones, los huéspedes serán seres humanos.

La presente invención no se limita a la modulación de la expresión de cualquier tipo específico de gen diana o secuencia de nucleótidos. Clases representativas de genes diana de interés incluyen, pero no se limitan a: genes del desarrollo (por ejemplo, moléculas de adhesión, inhibidores de ciclina cinasas, citocinas/linfocinas y sus receptores, factores de crecimiento/diferenciación y sus receptores, neurotransmisores y sus receptores); oncogenes (por ejemplo, ABLI, BCL1, BCL2, BCL6, CBFA2, CBL, CSFIR, ERBA, ERBB, EBRB2, ETSI, ETS1, ETV6, FOR, FOS, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MDM2, MLL, MYB, MYC, MYCLI, MYCN, NRAS, PIM 1, PML, RET, SRC, TALI, TCL3 y YES); genes supresores de tumores (por ejemplo, APC, BRCA 1, BRCA2, MADH4, MCC, NF 1, NF2, RB 1, TP53 y WTI); y enzimas (por ejemplo, ACC sintasas y oxidasas, ACP desaturasas e hidroxilasas, ADP-glucosa piroforilasas, ATPasas, alcohol deshidrogenasas, amilasas, amiloglucosidasas, catalasas, celulasas, chalcona sintasas, quitinasas, ciclooxigenasas, decarboxilasas, dextrinasas, ADN y ARN polimerasas, galactosidasas, glucanasas, glucosa oxidasas, sintasas de almidón unidas a gránulo, GTPasas, helicasas, hemicelulasas, integrasas, inulinasas, invertasas, isomerasas, cinasas, lactasas, lipasas, lipoxigenasas, lisozimas, nopalina sintasas, octopina sintasas, pectinesterasas, peroxidasas, fosfatasas, fosfolipasas, fosforilasas, fitasas, sintasas reguladoras del crecimiento de plantas, poligalacturonasas, proteinasas y peptidasas, pulanasas, recombinasas, transcriptasas inversas, RUBISCOs, topoisomerasas y xilanasas); quimiocinas (por ejemplo CXCR4, CCR5), el componente de ARN de la telomerasa, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), receptor de VEGF, factor nuclear kappa B de factores de necrosis tumoral, factores de transcripción, moléculas de adhesión a células, factor de crecimiento similar a la insulina, miembros de la familia beta de factores de crecimiento transformantes, receptores de la superficie celular, proteínas de unión a ARN (por ejemplo, ARN nucleolares pequeños, factores de transporte de ARN), factores de traducción, telomerasa transcriptasa inversa); etc.

KITS

También se describen en el presente documento reactivos y kits de los mismos para poner en práctica uno o más de los métodos anteriormente descritos. Los reactivos y kits de los mismos pueden variar enormemente. Normalmente, los kits incluyen al menos un agente de iARN como se ha descrito anteriormente.

Además de los componentes anteriores, los kits incluirán adicionalmente instrucciones para poner en práctica los métodos objeto. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits en varias formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el kit. Una forma en la que estas instrucciones pueden estar presentes es como información impresa sobre un medio o sustrato adecuado, por ejemplo, un trozo o trozos de papel sobre el que se imprime la información, en el envase del kit, en un prospecto, etc. Todavía otro medio sería un medio legible por ordenador, por ejemplo, disquete, CD, etc., sobre el que se ha grabado la información. Todavía otro medio que puede estar presente es una dirección de página web que puede usarse mediante internet para acceder a la información en un sitio eliminado. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

10 ADMINISTRACIÓN HIDRODINÁMICA DE ARN DESNUDO

También se describen en el presente documento métodos y composiciones para la introducción *in vivo* de un ácido nucleico desnudo, por ejemplo, ácido ribonucleico, ácidos desoxirribonucleicos o nucleicos químicamente modificados (incluyendo, pero no se limitan a, morfolino, ácidos nucleicos peptídicos, metilfosfonato, fosforotioato o 2'-O-metil-oligonucleótidos), en la célula diana de un organismo vascularizado, por ejemplo, un mamífero. Estos métodos se denominan convenientemente métodos "hidrodinámicos".

En una realización de los métodos descritos, una formulación acuosa de un ácido nucleico desnudo y un inhibidor de RNasa se administra en el sistema vascular del organismo. En muchas realizaciones, la formulación acuosa también incluye un ácido ribonucleico competidor, por ejemplo, un ácido ribonucleico no poliadenilado sin casquete. En todavía otras realizaciones, la co-administración de ADN que puede transcribirse en la molécula de ARN con agentes moduladores candidatos se realiza sin un inhibidor de RNasa o ácido ribonucleico competidor, en las que el agente modulador y el ADN pueden o pueden no administrarse como una única composición. Los métodos descritos encuentran uso en varias aplicaciones diferentes, que incluyen tanto aplicaciones de investigación como terapéuticas, y son particularmente aptos para uso en la administración *in vivo* de un ácido ribonucleico en una célula hepática, por ejemplo, para la administración *in vivo* dirigida al hígado de ácidos nucleicos.

En la descripción adicional de este aspecto de la invención objeto, los métodos descritos se describirán primero, seguido de una descripción de aplicaciones representativas en las que los métodos descritos encuentran uso y kits para su uso en poner en práctica los métodos objeto.

MÉTODOS

Como se ha resumido anteriormente, en el presente documento se describe un método para la introducción *in vivo* de un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido ribonucleico, en una célula diana presente en un organismo multi-celular vascularizado. Por introducción *in vivo* se indica que, en los métodos objeto, la célula diana en la que el ácido nucleico se introduce es una que está presente en el organismo multi-celular, es decir, no es una célula que se separe de, por ejemplo, se elimine de, el organismo multi-celular. Como tales, los métodos descritos son distintos de los protocolos de transferencia de ácido nucleico *in vitro*, en los que un ácido nucleico se introduce en una célula o células separadas del organismo multi-celular a partir del cual se originaron, por ejemplo, están en cultivo. En otras palabras, los métodos descritos no son métodos de transferencia de ácido nucleico *in vitro*.

Por introducción del ácido nucleico se indica que el ácido nucleico, por ejemplo, ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) o un análogo de ácido nucleico que no se produce naturalmente, se inserta en el citoplasma de la célula diana. En otras palabras, el ácido nucleico se mueve de fuera de la célula diana a dentro de la célula diana a través de la membrana celular.

Por organismo multi-celular vascularizado se indica un organismo multi-celular que incluye un sistema vascular. Organismos multi-celulares de interés incluyen plantas y animales, en los que los animales son de interés particular, particularmente animales vertebrados que tienen un sistema vascular constituido de un sistema de venas y arterias a través de las cuales circula la sangre, por ejemplo, en respuesta al latido de un corazón. Animales de interés son mamíferos en muchas realizaciones. Los mamíferos de interés incluyen: roedores, por ejemplo ratones, ratas; ganado, por ejemplo cerdos, caballos, vacas, etc., mascotas, por ejemplo perros, gatos; y primates, por ejemplo, seres humanos. En ciertas realizaciones, el organismo multi-celular es un ser humano. En otras realizaciones, el organismo multi-celular es un mamífero no humano, por ejemplo, un roedor, tal como un ratón, rata, etc.

Como se ha mencionado anteriormente, los métodos descritos son, en el sentido más amplio, adecuados para la introducción de ácidos nucleicos en la célula diana de un huésped. El término "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, significa un polímero compuesto de nucleótidos, por ejemplo, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o compuestos producidos sintéticamente (por ejemplo, PNA como se describen en la patente de EE.UU. nº 5.948.902 y las referencias citadas en su interior) que pueden hibridarse con ácidos nucleicos que se producen naturalmente de una manera específica de secuencia análoga a aquella de dos ácidos nucleicos que se producen naturalmente. Los términos "ácido ribonucleico" y "ARN", como se usan en el presente documento, significan un polímero compuesto de ribonucleótidos. Los términos "ácido desoxirribonucleico" y "ADN", como se usan en el presente documento, significan un polímero compuesto de desoxirribonucleótidos.

Los métodos descritos son particularmente aptos para uso en la administración de un ácido ribonucleico en una célula diana de un organismo multi-celular. Como tales, los métodos se describirán ahora adicionalmente en términos de la administración de ácidos ribonucleicos. Sin embargo, los siguientes protocolos también son adecuados para su uso en la administración de otros ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN (tales como ADN de plásmido), etc.

En la práctica de los métodos descritos, una composición acuosa del ácido ribonucleico en la que el ácido ribonucleico está presente como ácido ribonucleico desnudo se administra al sistema vascular del organismo multi-celular o huésped. En muchas realizaciones, la composición acuosa de ARN desnudo o formulación se administra a la vena del huésped, es decir, la formulación de ARN desnudo se administra intravenosamente. En ciertas realizaciones, la formulación de ARN desnudo se administra intravenosamente al huésped mediante inyección a alta presión. Por mediante inyección a alta presión se indica que la formulación acuosa se introduce intravenosamente a una elevada presión, en la que la elevada presión es generalmente al menos aproximadamente 20, normalmente al menos aproximadamente 30 mm de Hg. En muchas realizaciones, la elevada presión oscila de aproximadamente 10 a 50 mm de Hg, prefiriéndose frecuentemente 40 a 50 mm de Hg. Métodos de administración de formulaciones acuosas bajo alta presión, tales como aquellos descritos anteriormente, se describen en las referencias enumeradas en la sección de bibliografía relevante, arriba.

Como se ha mencionado anteriormente, el ARN o ADN que va a introducirse en la célula diana mediante los métodos descritos está presente en la formulación acuosa como ARN desnudo. Por "desnudo" se indica que el ARN está libre de cualquier vehículo de administración que pueda actuar para facilitar la entrada en la célula diana. Por ejemplo, los ARN desnudos o ADN administrados en los métodos objeto están libres de cualquier material que promueva la transfección, tal como formulaciones liposómicas, lípidos cargados o agentes precipitantes, por ejemplo, no están complejados a materiales coloidales (incluyendo preparaciones liposómicas). Además, los ARN desnudos no están contenidos en un vector que produciría la integración del ARN en el genoma de la célula diana, es decir, están libres de secuencias virales o partículas que llevan información genética.

Los ARN desnudos que pueden administrarse pueden variar ampliamente de longitud, dependiendo de su fin previsto, por ejemplo, la proteína que codifican, etc. Generalmente, los ARN desnudos tendrán al menos aproximadamente 10 nt de longitud, normalmente al menos aproximadamente 30 nt de longitud y más normalmente al menos aproximadamente 35 nt de longitud, pudiendo los ARN desnudos ser tan largos como 20.000 nt o más largos, pero generalmente no superarán aproximadamente los 10.000 nt de longitud y normalmente no superarán aproximadamente los 6.000 nt de longitud. En ciertas realizaciones en las que el ARN desnudo es un agente de iARN según la invención, como se ha descrito anteriormente, la longitud del ARN oscila de aproximadamente 15 a 30 nt, que incluye 15 a 25 nt, tal como 20 a 25 nt, por ejemplo, 21 ó 22 nt.

Los ARN desnudos que pueden introducirse en una célula diana según los métodos descritos pueden o pueden no codificar una proteína, es decir, pueden o pueden no ser capaces de ser traducidos en una proteína tras la introducción en la célula diana. En aquellas realizaciones en las que el ARN desnudo es capaz de ser traducido en una proteína tras la introducción en la célula diana, el ARN desnudo puede o puede no tener casquete, puede incluir un dominio IRES, etc. Sin embargo, en muchos protocolos particulares de esta realización, el ARN desnudo tiene casquete. Además, el ARN en estas realizaciones generalmente incluye al menos una señal de poliadenilación, y en muchas realizaciones está poliadenilado, en el que la cola de poli A, cuando está presente, generalmente oscila en longitud de aproximadamente 10 a 300, normalmente de aproximadamente 30 a 50. Descripción adicional de los ARN desnudos se proporciona abajo.

Como se ha mencionado anteriormente, una formulación acuosa del ARN desnudo se administra intravascularmente, normalmente intravenosamente, al huésped. En las formulaciones acuosas empleadas en los métodos descritos, una cantidad eficaz del ARN desnudo se combina con un vehículo de administración acuosa. Por cantidad eficaz se indica una cantidad que es suficiente para proporcionar la cantidad deseada de transferencia en la célula diana, por ejemplo, para proporcionar el resultado deseado, tal como la cantidad deseada de expresión de proteínas. En muchas realizaciones, la cantidad de ARN desnudo presente en la formulación acuosa es al menos aproximadamente 5 microgramos, normalmente al menos aproximadamente 10 microgramos y más normalmente al menos aproximadamente 20 microgramos, pudiendo la cantidad ser tan grande como 10 miligramos o mayor, pero generalmente no supera aproximadamente 1 miligramo y normalmente no supera aproximadamente 200 microgramos.

Los vehículos de administración acuosa de interés incluyen: agua, solución salina y medios tamponados. Vehículos específicos de interés incluyen: solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato, solución salina tamponada con fosfato, etc. Los vehículos de administración acuosa pueden incluir además conservantes y otros aditivos, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes, reforzadores de nutrientes, reforzadores de electrolitos, cationes divalentes, tales como magnesio, calcio y manganeso, etc. Es de particular interés en muchas realizaciones el uso de soluciones salinas tamponadas que son pseudofisiológicas.

Una característica de ciertas realizaciones de los métodos descritos es que el ARN desnudo se introduce en el sistema vascular del organismo multi-celular en combinación con un inhibidor de RNasa. Por inhibidor de RNasa se

indica un compuesto o agente que al menos reduce la actividad de, si no la inactiva completamente, una actividad de RNasa en el organismo multi-celular. En muchas realizaciones, el inhibidor de RNasa es un inhibidor de proteínas de RNasa, siendo el inhibidor placentario humano de RNasa de interés particular. El inhibidor de proteínas de RNasa puede purificarse de una fuente natural o producirse sintéticamente, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes. El inhibidor placentario humano de RNasa puede obtenerse de varias fuentes diferentes bajo varios nombres comerciales diferentes, incluyendo fuentes representativas: Promega, Inc., Strategene, Inc., Fisher Scientific, Inc., y similares.

Aunque el inhibidor de RNasa puede administrarse, en ciertas realizaciones, al huésped en una composición separada de la composición de ARN desnudo acuosa, en muchas realizaciones el inhibidor de RNasa está presente en la composición de ARN desnudo acuosa. La cantidad de inhibidor de RNasa que está presente en la composición acuosa es suficiente para proporcionar la captación deseada del ARN desnudo. Si el inhibidor de RNasa es un inhibidor de proteínas, la concentración del inhibidor en la composición acuosa que se introduce en el organismo multi-celular durante la práctica de los métodos objeto puede oscilar de aproximadamente 4 a 4.000 unidades, normalmente de aproximadamente 400 a 4.000 unidades y más normalmente de aproximadamente 400 a 1.500 unidades.

En ciertas realizaciones, el ARN desnudo e inhibidor de RNasa se administran conjuntamente con un ARN competidor. Por ARN competidor se indica un ARN que puede servir de inhibidor competitivo de la actividad de RNasa. En muchas realizaciones, el ARN competidor no tiene casquete y no está poliadenilado. Por no tiene casquete se indica que el ARN competidor carece de la estructura de casquete encontrada en el extremo 5' de ARN mensajero eucariota, es decir, carece de una 7 metil G en 5'. Por no poliadenilado se indica que el ARN competidor carece de una cola de poli A o dominio de poliadenilación en su extremo 3', como se encuentra en ARN mensajero eucariota. La longitud del ARN competidor puede variar, pero es generalmente al menos aproximadamente 70 nt, normalmente al menos aproximadamente 200 nt y más normalmente al menos aproximadamente 1.500 nt, pudiendo ser la longitud tan grande como 10.000 nt o mayor, pero generalmente no supera aproximadamente 3.500 nt y normalmente no supera aproximadamente 1.500 nt. La concentración de ARN competidor en la composición acuosa es suficiente para proporcionar la protección deseada del ARN desnudo (por ejemplo, mediante la competición para la unión por RNasa), y en muchas realizaciones oscila de aproximadamente 10 µg/ml a 10 mg/ml, normalmente de aproximadamente 20 a 200 µg/ml y más normalmente de aproximadamente 40 a 150 µg/ml.

Los métodos descritos producen transferencia altamente eficaz del ARN administrado en el citoplasma de la(s) célula(s) diana. Los métodos descritos son particularmente aptos para transferir ARN al citoplasma del hígado o células hepáticas y células no parenquimatosas en el hígado. Como tal, en muchas realizaciones, los métodos descritos son métodos *in vivo* de lograr ácido nucleico de alto nivel, por ejemplo, ARN, transferencia en células hepáticas o tejido hepático.

El ácido nucleico que se introduce en la célula diana mediante los métodos descritos tiene vida corta una vez dentro de la célula diana. Dependiendo de la naturaleza particular del ácido nucleico, la semivida del ácido nucleico tras la introducción mediante los métodos objeto generalmente oscila de aproximadamente 30 s a 10 días, normalmente de aproximadamente 1 min a 24 h, y más normalmente de aproximadamente 5 min a 10 h. Como tal, si el ácido nucleico es un ARN que codifica una proteína de interés, la expresión de proteínas tras la introducción mediante el método objeto es transitoria, durante normalmente durante un período de tiempo que oscila de aproximadamente 1 min a 3 días, normalmente de aproximadamente 5 min a 24 h. Como tal, en muchas realizaciones de los métodos descritos, los métodos son métodos de proporcionar la expresión transitoria de proteínas de un transgén, en el que la expresión de proteínas es igual a la vida del ARN. Sin embargo, la proteína expresada puede tener una vida más larga, dependiendo de la naturaleza de la proteína particular.

UTILIDAD

Los métodos descritos encuentran uso en varias aplicaciones diferentes en las que se desea la transferencia *in vivo* eficiente de un ácido nucleico desnudo en una célula diana. Aplicaciones en las que los métodos descritos encuentran uso incluyen tanto aplicaciones terapéuticas como de investigación. Aplicaciones terapéuticas de interés incluyen aplicaciones de terapia génica, aplicaciones de vacunación y similares. Aplicaciones de investigación de interés incluyen la producción de modelos animales para afecciones particulares, por ejemplo, infecciones virales de ARN, la observación de expresión génica en fenotipos para aclarar la función génica, etc. Otras aplicaciones en las que el método descrito encuentra uso incluyen el desarrollo de antisentido, ribozima y quimeroplastia (es decir, la reparación de genes mediante agentes terapéuticos de quimeras de ARN/ADN (véase, por ejemplo, Yoon et al., Proc Natl Acad Sci U S A (1996) 93(5):2071-6; Cole-Strauss et al., Science (1996) 273(5280):1386-9; y Zhu et al., Proc Natl Acad Sci U S A (1999) 96(15):8768-73), además de agentes terapéuticos de ARN interferente (ARN cuya presencia en la célula previene la traducción de ARN similares (véase, por ejemplo, Wianny et al., Nat Cell Biol (2000) 2(2):70-5; y SiQun et al., Nature (1998) 391: 806 - 811).

Un tipo de aplicación en la que los métodos descritos encuentran uso es en la síntesis de polipéptidos, por ejemplo, proteínas, de interés de una célula diana, particularmente la expresión transitoria de un polipéptido. En tales aplicaciones, un ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés en combinación con componentes de expresión requeridos y/o deseados, por ejemplo, estructuras de casquete de 5', dominios IRES, señales de poli A o colas, etc., se introduce en la célula diana mediante administración *in vivo* al organismo multi-celular en el que la célula diana reside, en el que la célula diana es para servir de huésped de expresión para la expresión del polipéptido. Por ejemplo, si el ácido nucleico desnudo administrado por los métodos objeto es ARN, el ARN es un ARN que puede ser traducido en el citoplasma de la célula diana en la proteína codificada por la secuencia contenida en el ARN. El ARN puede tener casquete o sin casquete, en el que cuando no tiene casquete generalmente incluye una secuencia de IRES. El ARN también incluye generalmente adicionalmente una cola de poli A, en la que la longitud de la cola de poli A normalmente oscila de aproximadamente 10 a 300, normalmente de aproximadamente 30 a 50 nt. Tras la administración *in vivo* y posterior introducción en la célula diana, el organismo multi-celular, y la célula huésped elegida como diana presente en su interior, se mantiene entonces en condiciones suficientes para la expresión de la proteína codificada por el ARN transferido. Entonces, la proteína expresada se recoge, y se purifica, si se desea, usando cualquier protocolo conveniente.

Como tales, los métodos descritos proporcionan un medio para al menos potenciar la cantidad de una proteína de interés en un organismo multi-celular. El término 'al menos potenciar' incluye situaciones en las que los métodos se emplean para aumentar la cantidad de una proteína en un organismo multi-celular en el que una cierta cantidad inicial de proteína está presente antes de la práctica de los métodos. El término 'al menos potenciar' también incluye aquellas situaciones en las que el organismo multi-celular incluye sustancialmente nada de la proteína antes de la práctica de los métodos. Como los métodos encuentran uso en al menos potenciar la cantidad de una proteína presente en un organismo multi-celular, encuentran uso en varias aplicaciones diferentes, que incluyen aplicaciones de preparación farmacéutica y aplicaciones terapéuticas, describiéndose las últimas en mayor detalle abajo.

Aplicaciones terapéuticas en las que los métodos descritos encuentran uso incluyen aplicaciones de terapia génica en las que los métodos descritos se usan para potenciar el nivel de una proteína terapéutica en el organismo huésped y aplicaciones de vacunación, en las que los métodos descritos se usan para vacunar el huésped (o desarrollar vacunas para la administración por otros métodos). A diferencia de los protocolos de expresión basados en ADN, los protocolos de expresión basados en ARN objeto no se complican por la necesidad de promotor, potenciador, represor y otros elementos reguladores comúnmente asociados a genes eucariotas. Los métodos descritos pueden usarse para administrar una amplia variedad de ácidos nucleicos terapéuticos que, tras la entrada en la célula diana, proporcionan el nivel de proteína potenciado requerido en el huésped. Ácidos nucleicos terapéuticos de interés incluyen ácidos nucleicos que sustituyen genes defectuosos en la célula huésped diana, tales como aquellos responsables de estados de enfermedad basados en defectos genéticos, codificando productos que se supone que se proporcionan al huésped por estos genes defectuosos; ácidos nucleicos que tienen utilidad terapéutica en el tratamiento del cáncer; y similares. Productos representativos que participan en los estados de enfermedad por defectos genéticos cuyo nivel puede potenciarse poniendo en práctica los métodos objeto incluyen, pero no se limitan a: factor VIII; factor IX, β -globina, receptor de proteína de baja densidad, adenosina desaminasa, purina nucleósido fosforilasa, esfingomielinasa, glucocerebrosidasa, regulador transmembranario de la fibrosis quística, α -antitripsina, CD-1 8, ornitina transcarbamilasa, arginosuccinato sintetasa, fenilalanina hidroxilasa, α -cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, fumarilacetoacetato hidrolasa, glucosa 6-fosfatasa, α -L-fucosidasa, β -glucuronidasa, α -L-iduronidasa, galactosa 1-fosfato uridiltransferasa y similares. Ácidos nucleicos terapéuticos del cáncer que pueden administrarse mediante los métodos descritos incluyen: ácidos nucleicos que potencian la actividad antitumoral de linfocitos codificando factores apropiados, ácidos nucleicos cuyo producto de expresión potencia la inmunogenicidad de células tumorales, ácidos nucleicos que codifican supresores tumorales, ácidos nucleicos que codifican toxinas, ácidos nucleicos que codifican factores suicidas, ácidos nucleicos que codifican productos de resistencia a múltiples fármacos, ribozimas, ADN ribozimas, quimeras de ADN/ARN, ARN interferente y secuencias antisentido, y similares.

Una característica importante de los métodos descritos, como se describen arriba, es que los métodos descritos pueden usarse para aplicaciones de terapia génica *in vivo*. Por aplicaciones de terapia génica *in vivo* se indica que la célula diana o células en las que la expresión del gen terapéutico se desea no se eliminan del huésped antes de la práctica de los métodos descritos. A diferencia, las composiciones de ácido nucleico desnudo se administran directamente al organismo multi-celular y se recogen por las células diana, tras lo cual se produce la expresión del producto codificado.

Como se ha mencionado anteriormente, otra aplicación terapéutica en la que los métodos descritos encuentran uso es en la vacunación de un huésped (además del desarrollo de una vacuna que va a administrarse por otros métodos). En estos métodos, el ácido nucleico desnudo, por ejemplo ARN, que se administra al huésped mediante los métodos descritos codifica un inmunogén deseado que, tras la entrada del ARN en la célula diana, se expresa y secreta para provocar la respuesta inmunitaria deseada. Métodos de vacunación en los que se emplean el ácido nucleico desnudo y en los que encuentran uso los métodos descritos de administración de ácido nucleico desnudo se describen adicionalmente en el documento WO 90/11092.

Como se ha mencionado anteriormente, los métodos descritos también encuentran uso en diversas aplicaciones de

investigación. Una aplicación de investigación en la que el método descrito encuentra uso es en la producción de modelos animales de infección por virus de ARN, en la que los virus de ARN de interés incluyen: VHC, VIH, gripe A, hepatitis A, virus de la poliomielitis, enterovirus, rinovirus, aftovirus y similares. Para producir tales modelos animales, primero se proporcionan construcciones que incluyen uno o más elementos reguladores del virus de ARN de interés operativamente ligados a un dominio indicador, por ejemplo, un dominio que codifica un producto detectable (tal como luciferasa, una proteína fluorescente, etc.); etc. Alternativamente, pueden emplearse construcciones de ADN que pueden transcribirse *in vivo* en tales construcciones de ARN. Estas construcciones se administran entonces a un huésped, por ejemplo, un ratón, según los métodos descritos para producir un modelo animal de una infección por el virus de ARN correspondiente. Como tales, también se proporcionan modelos animales de virus de ARN producidos por los métodos descritos. Un protocolo representativo para la producción de un modelo animal de virus de ARN se proporciona en la sección experimental abajo.

Los métodos también encuentran uso en la administración de agentes terapéuticos y/o de investigación por iARN, que incluyen ARNip y, ARNhp según la invención, como se describen más completamente anteriormente y en la sección experimental, más adelante.

También se describen métodos de cribado de agentes moduladores candidatos, por ejemplo, potenciadores o inhibidores, usando tales modelos animales. Pueden cribarse varios tipos diferentes de agentes candidatos según los métodos descritos. Agentes candidatos engloban numerosas clases químicas, aunque normalmente son moléculas orgánicas, preferentemente compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular superior a 50 e inferior a aproximadamente 2.500 daltons. Agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente enlace de hidrógeno, y normalmente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferentemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos frecuentemente comprenden estructuras de carbono cíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. También se encuentran agentes candidatos entre biomoléculas que incluyen péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

De particular interés en ciertas realizaciones son ácidos nucleicos antisentido. El reactivo antisentido puede ser oligonucleótidos antisentido (ODN), particularmente ODN sintéticos que tienen modificaciones químicas de ácidos nucleicos nativos, o construcciones de ácidos nucleicos que expresan tales moléculas antisentido como ARN. La secuencia antisentido es complementaria al ARNm del gen elegido como diana, e inhibe la expresión de los productos génicos elegidos como diana. Las moléculas antisentido inhiben la expresión génica mediante diversos mecanismos, por ejemplo, reduciendo la cantidad de ARNm disponible para la traducción, mediante la activación de RNasa H, o impedimento estérico. Puede administrarse una o una combinación de moléculas antisentido, pudiendo comprender una combinación múltiples secuencias diferentes.

Las moléculas antisentido pueden producirse por expresión de toda o una parte de la secuencia del gen diana en un vector apropiado, en la que la iniciación de la transcripción está orientada de forma que una hebra no codificante se produzca como una molécula de ARN. Alternativamente, la molécula antisentido es un oligonucleótido sintético. Los oligonucleótidos antisentido tendrán generalmente al menos aproximadamente 7, normalmente al menos aproximadamente 12, más normalmente al menos aproximadamente 16 nucleótidos de longitud, y no más de aproximadamente 500, normalmente no más de aproximadamente 50, más normalmente no más de aproximadamente 35 nucleótidos de longitud, si la longitud está gobernada por la eficiencia de inhibición, especificidad, que incluye ausencia de reactividad cruzada, y similares. Se ha encontrado que oligonucleótidos cortos, de 7 a 8 bases de longitud, pueden ser inhibidores fuertes y selectivos de la expresión génica (véase Wagner et al. (1996), Nature Biotechnol. 14:840-844).

Una región específica o regiones de la secuencia de ARNm de hebra codificante endógena se elige para estar complementada por la secuencia antisentido. La selección de una secuencia específica para el oligonucleótido puede usar un método empírico, en el que varias secuencias candidatas se ensayan para la inhibición de la expresión del gen diana en un modelo *in vitro* o animal. También puede usarse una combinación de secuencias, en las que varias regiones de la secuencia de ARNm están seleccionadas para complementación antisentido.

Los oligonucleótidos antisentido pueden sintetizarse químicamente por métodos conocidos en la técnica (véase Wagner *et al.* (1993), arriba, y Milligan *et al.*, arriba). Los oligonucleótidos preferidos se modifican químicamente a partir de la estructura de fosfodiéster nativa, con el fin de aumentar su estabilidad intracelular y afinidad de unión. Se han descrito varias de tales modificaciones en la bibliografía, que alteran la química del esqueleto, azúcares o bases heterocíclicas.

Entre los cambios útiles en la química del esqueleto están enlaces fosfordiamidato, metilfosfonatos fosforotioatos; fosforditioatos, en los que los dos oxígenos que no forman puente están sustituidos con azufre; fosforoamidatos; alquil fosfotriésteres y boranofosfatos. Derivados de fosfato aquirales incluyen 3'-O-5'-S-fosforotioato, 3'-S-5'-O-fosforotioato, 3'-CH₂-5'-O-fosfonato y 3'-NH-5'-O-fosforoamidato. Los ácidos nucleicos peptídicos sustituyen el esqueleto de fosfodiéster de ribosa entero con un enlace peptídico. También se usan modificaciones de azúcar para potenciar la estabilidad y afinidad. Un ejemplo es la sustitución del azúcar de ribosa con una morfina. Puede

usarse el α -anómero de desoxirribosa, en el que la base está invertida con respecto al β -anómero natural. El 2'-OH del azúcar de ribosa puede alterarse para formar 2'-O-metil- o 2'-O-aliil-azúcares, que proporcionan resistencia a la degradación sin comprender afinidad. La modificación de las bases heterocíclicas debe mantener el apropiado apareamiento de bases. Algunas sustituciones útiles incluyen desoxiuridina por desoxitimidina; 5-metil-2'-desoxicidina y 5-bromo-2'-desoxicidina por desoxicidina. Se ha mostrado que la 5-propinil-2'-desoxiuridina y 5-propinil-2'-desoxicidina aumentan la afinidad y actividad biológica cuando se sustituyen por desoxitimidina y desoxicidina, respectivamente.

Los agentes candidatos se obtienen de una amplia variedad de fuentes que incluyen bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, están disponibles numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, que incluyen la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Alternativamente, están disponibles bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, de planta y animales o se producen fácilmente. Adicionalmente, las bibliotecas naturales o sintéticamente producidas y los compuestos se modifican fácilmente mediante medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y pueden usarse para producir bibliotecas combinatorias. Agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc., para producir análogos estructurales.

En tales ensayos de cribado, la construcción de ácidos nucleicos (por ejemplo, construcción de ARN o ADN descrita anteriormente) y el agente candidato se administran al huésped animal, se observa el efecto del agente candidato sobre la actividad de la construcción, y el efecto observado se relaciona con la actividad moduladora del compuesto candidato. El agente candidato y la construcción de ácidos nucleicos pueden administrarse al huésped según los métodos objeto al mismo tiempo o en momentos diferentes, donde en ciertas realizaciones preferidas los dos componentes se administran al huésped simultáneamente, por ejemplo, en forma de una única composición fluida. Ensayos de cribado representativos se proporcionan en la sección experimental, abajo.

Otra aplicación de investigación en la que los métodos descritos encuentran uso es la aclaración de la función génica. En tales métodos, el ARN que tiene una secuencia de genes particular se introduce mediante los métodos descritos y se observa el efecto del gen sobre el fenotipo del organismo. Beneficios de uso de los métodos descritos para las aplicaciones de investigación de la función génica incluyen la capacidad para expresar los genes sin preocuparse de elementos reguladores genéticos. Otras aplicaciones de investigación en las que los métodos descritos encuentran uso incluyen, pero no se limitan a: el estudio de ribozima y eficacia antisentido; el estudio del metabolismo de ARN, y similares.

KITS

También se describen kits para su uso en poner en práctica los métodos de administración de ácido nucleico *in vivo* a una célula diana, por ejemplo, células hepáticas. Los kits generalmente incluyen un ácido nucleico desnudo que se desea introducir en la célula diana y un inhibidor de RNasa. Los kits pueden incluir además un vehículo de administración acuoso, por ejemplo, una solución salina tamponada, etc. Además, los kits pueden incluir un ARN competidor, como se describe arriba. En los kits descritos, los componentes anteriores pueden combinarse en una única composición acuosa para administración al huésped o separarse como composiciones diferentes o dispares, por ejemplo, en recipientes separados. Opcionalmente, el kit puede incluir además un medio de administración vascular para administrar la composición acuosa al huésped, por ejemplo, una jeringa etc., donde el medio de administración puede o puede no estar pre-cargado con la composición acuosa. En casos en los que el gen indicador se transcribe *in vivo* a partir de un ADN, no se requieren inhibidor de RNasa y ARN competidor.

Además de los componentes anteriores, los kits descritos incluirán adicionalmente instrucciones para poner en práctica los métodos objeto. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits descritos en varias formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el kit. Una forma en la que estas instrucciones pueden estar presentes es como información impresa en un medio o sustrato adecuado; por ejemplo, un trozo o trozos de papel sobre el que se imprime la información, en el envase del kit, en un prospecto, etc. Todavía otro medio sería un medio legible por ordenador, por ejemplo, disquete, CD, etc., sobre el que se ha grabado la información. Todavía otro medio que puede estar presente es una dirección de sitio web que puede usarse mediante internet para acceder a la información en un sitio eliminado. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

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

EXPERIMENTAL

I. iARN en mamíferos

A. Los presentes inventores co-administraron 2 microgramos de plásmido que expresa un ARNm de luciferasa (pCMVGL3) mezclado con 1,8 ml de PBS, 1200 unidades de RNasin y 40 microgramos de ARN competidor junto con las siguientes formulaciones:

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

2) (Grupo 2 ARN antisentido) 1,8 ml de PBS mezclado con 20 microgramos de quimera de ARN 21-mero/ADN de orientación antisentido con la secuencia 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdT-3' (SEC ID N°: 01) (los residuos de desoxitimidilato se indican por dT, los nucleótidos restantes son ribonucleótidos); o

5 3) (Grupo 3 iARN) 1,8 ml de PBS mezclados con 20 microgramos de 21-mero antisentido descrito anteriormente hibridado con 20 microgramos de su complemento sentido (con la secuencia 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3') (SEC ID N°: 02).

10 Los oligonucleótidos se trataron con cinasa usando adenosina trifosfato y T4 polinucleótido cinasa. Cada formulación (1-3) se probó por inyección a alta presión en la vena de la cola en ratones BALB/c hembra de 5 semanas de vida. 5, 72 y 96 horas después de la inyección, la luz emitida como resultado de la expresión de luciferasa se midió como se ha descrito anteriormente. Los resultados de este experimento se resumen en la tabla a continuación. Los números se expresaron como unidades de luz relativas.

	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 3
		patrón		patrón		patrón
		error		error		error
	Sin ARN		Antisentido		iARN	
3 horas	1,11x10 ⁹	2,05x10 ⁸	1,29x10 ⁹	7,90x10 ⁷	7,90x10 ⁸	3,54x10 ⁷
72 horas	6,60x10 ⁶	7,57x10 ⁵	5,41x10 ⁶	9,91x10 ⁵	8,23x10 ⁵	2,86x10 ⁵
96 horas	3,41x10 ⁶	4,50x10 ⁵	2,72x10 ⁶	5,25x10 ⁵	4,61x10 ⁵	6,77x10 ⁴

15 Los resultados anteriores demuestran que la iARN (grupo 3) causó la destrucción de ARN de luciferasa en el hígado de un mamífero adulto. Esta destrucción produjo una disminución en la luz emitida como resultado de la actividad de luciferasa cuando se compara con animales que no recibieron ARN o recibieron oligonucleótido antisentido solo. A conocimiento de los presentes inventores, esta es la primera demostración de que la iARN es eficaz en un mamífero adulto. Este método proporciona un sistema modelo para estudiar el mecanismo por el que la iARN funciona en un

20 mamífero. También es útil para el desarrollo y optimización de terapéuticos basados en iARN. Además, no se necesita coadministrar el plásmido de expresión con el agente de modulación. También podría administrarse un agente de modulación que se dirige a un gen endógeno.
B. Aquí, los presentes inventores prueban la capacidad de iARN para suprimir la expresión génica en mamíferos adultos. Los presentes inventores encuentran que los ARN interferentes pequeños (ARNip) sintéticos son fuertes

25 inhibidores de la expresión génica *in vivo*. Además, los ARN de horquilla pequeña (ARNhp) son similarmente eficaces. En particular, estos agentes de iARN pueden administrarse tanto como ARN sintéticos como transcribirse *in vitro* a partir de construcciones de expresión de ADN. Estos estudios indican que la iARN puede desarrollarse como una herramienta terapéutica y demuestran que puede emplearse con estrategias de terapia génica convencionales.

30 1. ARNip

Los presentes inventores modificaron los métodos de transfección hidrodinámica existentes (J. Chang, L. J. Sigal, A. Lerro, J. Taylor, *J Virol* 75, 3469-73. (2001)) para permitir la eficaz administración de ARN desnudos. Tanto un

35 ARNip derivado de luciferasa de luciérnaga como un ARNip sin relacionar se co-inyectaron con un plásmido de expresión de luciferasa (descripción de la construcción en la Figura 1). La expresión de luciferasa se monitorizó en animales vivos usando obtención de imágenes cuantitativas de cuerpo entero tras la inyección de un sustrato de luciferasa (4) y fue dependiente de la cantidad de plásmido indicador inyectado y el tiempo después de la transfección (datos no mostrados). Animales representativos se muestran en la Figura 2A. La cuantificación de estos

40 resultados se muestra en la Figura 2B.
En cada experimento, mediciones en suero de un plásmido co-inyectado que codifica α -1 antitripsina humana (hAAT) (S. R. Yant, et al., *Nat Genet* 25, 35-41. (2000)) sirvieron de control interno para normalizar la eficiencia de transfección y para monitorizar la inhibición traduccional no específica. Los niveles de hAAT en suero promedio a las

45 2. ARNhp

Los resultados de los presentes inventores indican inhibición específica mediada por ARNip de la expresión de luciferasa en ratones adultos ($p < 0,0115$); los ARNip sin relacionar no tuvieron efecto ($p < 0,864$). En 11 experimentos independientes, los ARNip de luciferasa redujeron la expresión de luciferasa (luz emitida) por un promedio del 81 %

50 (+/- 2,2 %).

55 2. ARNhp

ARN de horquilla pequeña (ARNhp) que se dirigen a luciferasa de luciérnaga de luciferasa de renilla se sintetizaron por transcripción *in vitro* no iniciada con T7 polimerasa. La co-transfección de estos ARN transcritos *in vitro* con pGL3-ADN de control produjeron la expresión de luciferasa de luciérnaga reducida en cultivo (Paddison et al, *Genes*

Dev. 16(8):948-58 (2002)). Con el fin de probar si estos ARN de horquilla fueron funcionales en ratones, los presentes inventores transfectaron hidrodinámicamente 40 µg de ARNhp de luciferasa transcrito *in vitro* (o como control, ARNhp de renilla), 2 µg de pGL3-ADN de control, 2 µg de pThAAT, 800 unidades de RNasin y 1,8 ml de PBS en ratones. La luz emitida de ratones 72 horas después de recibir los ARNhp de luciferasa de luciérnaga se redujo un promedio del 95 % (+ / - 1,4 %) en comparación con el control no tratado. La luz emitida de ratones que recibieron el ARNhp de renilla se redujo solo ligeramente. Sorprendentemente, la co-transfección del ADN de molde de la transcripción de T7 con un plásmido que expresa la proteína de T7 polimerasa no condujo a ninguna reducción en la actividad indicadora de luciferasa en cultivo o en ratones (datos no mostrados).

10 Secuencia de ARNhp de luciferasa de luciérnaga (de 5' a 3')

**GGUCGAAGUACUCAGCGUAAGUGAUGUCCACUUAAGUGGGUGUUGUUUGUG
UUGGGUGUUUUGGUU (SEC ID N°: 11)**

15 Secuencia de ARNhp de luciferasa de renilla (de 5' a 3')

**GGGAUGGACGAUGGCCUUGAUCUUGUUUACCGUCACACCCACCACUGGGAG
AUACAAGAUCAAGGCCAUCGUCUCCU (SEC ID N°: 12)**

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

20 3. Conclusión

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

25 C. El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus de ARN que infecta a 1 de cada 40 personas en el mundo y es la causa subyacente más común de trasplante de hígado en el mundo occidental. Para determinar si la iARN podría dirigirse contra un patógeno humano, se probaron varios ARNip para su capacidad para dirigir el ARN de VHC en hígado de ratón. Los presentes inventores usaron una estrategia indicadora en la que secuencias del VHC se fusionaron con ARN de luciferasa y la iARN se monitorizó por co-transfección *in vivo*. Los ARNip que se dirigen al sitio interno de entrada al ribosoma del VHC y la región codificante de la proteína del núcleo dejaron de inhibir la expresión de luciferasa. A diferencia, los ARNip que se dirigen a la región NS5B de un ARN quimérico de fusión de proteína NS5B del VHC-luciferasa redujeron la expresión de luciferasa el 75 % (+/- 6,8 %). Estos resultados indican la utilidad del uso de iARN terapéuticamente para dirigirse a patógenos humanos importantes.

30 35 D. A partir de estos datos, es evidente que los ARNip son funcionales en ratones. Los ARNhp funcionales, que son igualmente eficaces en inducir la supresión génica, pueden expresarse *in vivo* a partir de moldes de ADN usando promotores de ARN polimerasa III (Paddison et al., presentado). La expresión de un ARNhp relacionado (pShh1-Ff1) indujo hasta el 98 % (+/- 0,6 %) de supresión de la expresión de luciferasa, con una supresión promedio del 92,8 % (+/- 3,39 %) en tres experimentos independientes (Figuras 2C y 2D). Un vector de expresión de ARNhp vacío no tuvo efecto (datos no mostrados). Además, la inversión de la orientación del inserto de ARNhp (pShh1-Ff1 rev) suprimió el silenciamiento, debido a la terminación alterada por ARN polimerasa III y la consecuente producción de un ARNhp inapropiadamente estructurado (Paddison et al., presentado). Estos datos indican que los ARNhp codificados por plásmido pueden inducir una fuerte respuesta de iARN y específica en ratones adultos. Además, demuestra que este método de administración de iARN puede adaptarse para aprovechar el significativo progreso que se ha hecho en el desarrollo de vectores de transferencia génica.

Las estrategias de terapia génica existentes dependen ampliamente de la expresión ectópica de proteínas exógenas para lograr un resultado terapéutico. Desde su descubrimiento, la iARN ha mantenido la promesa de complementar estos enfoques de aumento de la función proporcionando un medio para silenciar genes relacionados con enfermedad. Considerados juntos, los resultados de los presentes inventores indican que la iARN puede inducirse en mamíferos adultos usando construcciones de ADN para dirigir la expresión de ARN de horquilla pequeña. Estos estudios demuestran que la presente invención proporciona sistemas de administración viral y no viral para la aplicación de iARN terapéutica a un amplio intervalo de enfermedades.

55

II. Administración hidrodinámica de ARN desnudo

A. Introducción

5 A menos que se indique lo contrario, en todos los experimentos se añadieron ARN y ADN a la cantidad indicada de RNasin y se llevaron a un volumen final de PBS igual a 1,4-1,8 mililitros. Esta solución se inyectó en la vena de la cola de los ratones en 4-5 segundos. Todos los ARN usados en estos estudios se sintetizaron usando un kit mMessage Machine y se purificaron usando un kit RNeasy (ambos de Qiagen Inc.). Sin embargo, no debe ser necesario purificar el ARN y existen otros métodos de purificación que también deben funcionar. El RNasin usado en
 10 todos los experimentos enumerados aquí fue RNasin nativo purificado de placenta humana, a menos que se indique lo contrario (comprado de Promega Inc.). Para muestras de luciferasa, en el momento indicado, los ratones se administraron con una inyección intraperitoneal de luciferina (1,5 microgramos / gramo de peso corporal) y se midió la luz emitida del ratón. El fondo es $\sim 2 \times 10^2$ unidades relativas de luz. Se analizaron muestras de factor IX humano usando un inmunoensayo ligado a enzima.

15 B. Administración hidrodinámica de ARN desnudo

Se inyectaron ARN que codifican proteína luciferasa en ratones vivos con:

- 20 1) sin inhibidor de RNasa; o
 2) inhibidor de RNasa (denominado RNasin).

Todas las muestras de ARN también contuvieron un ARN sin poliadenilar sin casquete (ARN competidor) que se incluyó como inhibidor competitivo de la actividad de RNasa. El ARN total en cada muestra se ajustó a un total de 80
 25 microgramos con ARN competidor. Como control negativo (descrito a continuación) también se inyectaron ADN que expresan la proteína luciferasa bajo el control de un promotor procariota. A las 3 y 6 horas los ratones se administraron con una inyección intraperitoneal de luciferina (el sustrato para la enzima luciferasa) y se midió la luz emitida del ratón.

30 Resultados resumidos en la Tabla 1

Tabla 1

Ácido nucleico usado	Número de ratones (N)	Formulación	Unidades relativas de luz (URL/ 5 min)
ARN de poli A	1	4 unidades de RNasin	$1,0 \times 10^6$
ARN de poli A	1	400 unidades de RNasin	$2,0 \times 10^7$
ARN con señal de poli A	1	4 unidades de RNasin	$7,2 \times 10^4$
ADN molde	1	ninguna	señal en el fondo

Los resultados anteriores muestran que:

- 35
- Se transfecta ARN inyectado en el hígado de ratones vivos.
 - ARN poliadenilado con casquete con una cola de poli A (ARN de poli A) se traduce en hígados de ratón debido a que el ARN poliadenilado con casquete da una fuerte señal de luciferasa
 - ARN con casquete con una señal de poli A (ARN con señal de poli A) se traduce en hígados de ratón pero da una señal pero es aproximadamente 100 veces inferior a la observada con el ARN que tiene una cola de poli A
- 40

Los ARN usados en todos los experimentos descritos aquí se transcribieron a partir de un promotor bacteriano en un plásmido de ADN. Este promotor no debe funcionar eficazmente en células de mamífero. El molde de ADN se eliminó después de la transcripción usando una DNasa, sin embargo siempre existe la preocupación de que la señal observada pudiera ser el resultado de contaminación de ADN. Para controlar esto, se inyectó una cantidad de ADN
 45 molde equivalente a la usada en la transcripción. Si la señal es debida a la contaminación de ADN, entonces esta muestra debería dar una señal. Sin embargo, no se observa señal de control de ADN.

También se encontró que la adición de un inhibidor de RNasa (denominado RNasin) protege el ARN de la degradación por nucleasas del suero, aumentando así la señal observada, debido a que la adición de RNasin aumentó la señal 20 veces a la dosis usada.

50

De lo anterior se sacan las siguientes conclusiones. La administración hidrodinámica de ARN desnudo produce alto nivel de transferencia de ARN en los hígados de ratones vivos. Además, el ADN con casquete y poliadenilado funciona mejor que el ARN con una señal de poliadenilación pero sin cola de poli A, aunque ambos ARN dieron una
 55

señal. La adición de un inhibidor de RNasa protegió el ARN de la degradación, produciendo una señal de luciferasa mayor. Finalmente, la señal observada con el ARN inyectado no es debida a contaminación del ADN.

C. Perfeccionamiento del sistema

5 Se inyectaron ARN que codifican proteína luciferasa en ratones vivos con 1) dosis altas o bajas de RNasin nativo o recombinante o 2) después del tratamiento con RNasa T1 que debería destruir el ARN y suprimir la señal (control negativo). Todas las muestras de ARN también contuvieron un ARN competidor sin poliadenilar sin casquete de forma que la cantidad total de ARN inyectado fue 80 microgramos. Los ADN de control que expresan la proteína luciferasa bajo el control de un promotor procariota también se inyectaron en reacciones de control indicadas. A las 3 y 6 horas los ratones se administraron con una inyección intraperitoneal de luciferina y se midió la luz emitida del ratón. Este experimento es, en gran medida, para verificar los resultados del primer experimento y para probar que los parámetros son importantes. En el momento de tiempo de seis horas, se sacrificó un ratón que se había inyectado con ARN y se extrajeron sus órganos para determinar qué órganos expresaban luciferasa.

15 Los resultados se resumen en la Tabla 2

Tabla 2

Ácido nucleico usado	micro-gramos de ARN o ADN	Número de ratones (N)	Formulación	Unidades relativas de luz (URL/5 min) 3 horas	Unidades relativas de luz (URL/5 min) 6 horas	Unidades relativas de luz (URL/5 min) 24 horas
ARN de poli A	35	1	240 unidades de RNasin (nativa)	$1,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	Antecedentes
ARN de poli A	50	1	240 unidades de RNasin (nativa)	$1,6 \times 10^6$	$5,4 \times 10^5$	Antecedentes
ARN de poli A	50	1	44 unidades de RNasin (nativa)	$5,5 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$	
ARN de poli A	10	1	240 unidades de RNasin (recombinante)	$7,7 \times 10^4$	$1,8 \times 10^5$	
ARN de poli A	50	2	3000 unidades de RNasa T1	Fondo	Fondo	
ADN molde	2	1	ninguna	Fondo	Fondo	

20 Los resultados anteriores demuestran que:

- La dosis de RNasin altera el nivel de expresión observado debido a que aumentar las dosis de RNasin conduce a niveles elevados de actividad de luciferasa.
- Tanto el RNasin nativo como el recombinante protegen al ARN.
- Si el ARN se destruye con RNasa, la señal se suprime, demostrando que el ARN es responsable de la señal (control negativo).
- Cuando una cantidad de ADN molde, equivalente a la usada en la transcripción, se inyecta sin tratamiento con DNasa, no se observa señal, demostrando que la señal no es debida a contaminación del ADN.
- El hígado es el único sitio de la expresión de luciferasa.

35 A partir de lo anterior se extraen las siguientes conclusiones. La dosis de RNasin afecta al nivel de expresión. Tanto el RNasin recombinante como el nativo protegen al ARN inyectado. No se observó señal cuando el ADN molde se inyectó o cuando el ARN se destruyó con RNasa, demostrando que la señal no es el resultado de la contaminación del ADN. Finalmente, el hígado es el único sitio de la expresión de luciferasa.

40 D. El ARN competidor potencia la actividad.

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

- 1) 400 unidades de RNasin + ARN competidor;
- 2) 40 unidades de RNasin sin ARN competidor;
- 3) 800 unidades de RNasin sin ARN competidor;

50

4) 1200 unidades de RNasin sin ARN competidor.

A las 3, 6 y 9 horas los ratones se administraron con una inyección intraperitoneal de luciferina y se midió la luz emitida del ratón.

5

Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3

	Micro-gramos de ARN competidor	Unidades de RNasin	Número de ratones (N)	Promedio (URL/2 min) 3 horas	Promedio (URL/2 min) 6 horas	Promedio (URL/2 min) 9 horas
URL	60	400	3	$7,6 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$
error estándar				$3,5 \times 10^4$	$4,2 \times 10^3$	$9,6 \times 10^2$
URL	Ninguno	400	3	$6,5 \times 10^3$	$4,2 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$
error estándar				$1,4 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$
URL	Ninguno	800	3	$6,2 \times 10^4$	$8,7 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$
error estándar				$3,1 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$3,7 \times 10^2$
URL	Ninguno	1200	3	$7,6 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$7,4 \times 10^3$
error estándar				$5,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$4,5 \times 10^3$

10 Los resultados anteriores demuestran que:

- La dosis de RNasin altera la actividad de luciferasa debido a que dosis crecientes de RNasin conducen a aumentar la actividad de luciferasa. La mayor dosis (1200 unidades de RNasin) dio la mayor actividad en todos los momentos probados.
- La adición de ARN competidor potenció la actividad de luciferasa medida, debido a que la presencia del ARN competidor potenció la actividad de luciferasa. Este efecto fue sinérgico con el efecto protector de RNasin.

15

20 A partir de los resultados anteriores se sacan las siguientes conclusiones. La adición de ARN competidor aumenta la señal de luciferasa. Además, dosis crecientes de RNasin conducen a niveles crecientes de actividad de luciferasa.

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

25 En eucariotas, la traducción de ARN en proteína se produce por dos mecanismos diferentes denominados traducción dependiente del casquete e independiente del casquete. La traducción independiente del casquete requiere una región no traducida de 5' llamada un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Varios virus de ARN, tales como el virus de la hepatitis C (HCV), virus de la poliomielitis y hepatitis A utilizan secuencias de IRES para llevar a cabo la traducción independiente del casquete. Los presentes inventores desarrollaron originalmente el método de transfección de ARN descrito aquí con la idea de que podría usarse para preparar un sistema de modelo de animal pequeño para estudiar terapéuticos anti-VHC. La transfección con ARN de IRES también podría usarse para estudios de mutagénesis diseñados para investigar los elementos de secuencia necesarios para la eficaz función de IRES.

30

1. Descripción del experimento y resultados:

35

El ARN del VHC luc tiene el IRES de VHC en el extremo 5' y el gen de luciferasa seguido de una cola de poli A. Se inyectaron 40 microgramos de VHC luc + 40 microgramos de ARN competidor + 20 microlitros de RNasin en la vena de la cola de los ratones. A las 3 y 6 horas los ratones se administraron con una inyección intraperitoneal de luciferina y se midió la luz emitida del ratón. Resultado: El IRES de VHC fue capaz de conducir la traducción de la fusión de ARN de luciferasa del VHC inyectado. La cuantificación de los resultados se resume en la Tabla 4.

40

Tabla 4

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

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

La proteína factor IX humano es una proteína de coagulación de la sangre que no se produce por algunos pacientes con hemofilia. Los niveles de esta proteína en suero pueden medirse fácilmente usando un inmunoensayo ligado a enzima (ELISA). Los presentes inventores eligen expresar esta proteína por dos motivos:

- 1) la hFIX es una proteína terapéuticamente relevante. Aunque la expresión transitoria de hFIX no es clínicamente relevante, se desearía expresar transitoriamente algunos otros tipos de proteínas terapéuticas que no requieren expresión crónica.
- 2) la hFIX es una proteína humana y así es capaz de provocar una respuesta inmunitaria en ratones.

Una aplicación de la inyección de ARN es en el desarrollo y prueba de vacunas. Una respuesta inmunitaria a hFIX tras la inyección de hFIX ARN demostraría la prueba de principio de uso de ARN como vacuna.

1. Descripción del experimento y resultados:

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

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

Dos grupos de 6 ratones recibieron inyecciones de:

- 1) 50 microgramos de ARN genómico de longitud completa del VHC con casquete denominado VHC 90 FL (que también contiene algo de ARN sin casquete) + 40 microgramos de ARN de hFIX con casquete y poliadenilado + 400 unidades de RNasin; o
- 2) un ARN genómico del VHC no infeccioso de longitud completa que tiene una mutación en el gen de replicasa que lo hace catalíticamente inactivo (denominado VHC 101 FL) + 40 microgramos de ARN de hFIX con casquete y poliadenilado + 400 unidades de RNasin.

Los moldes de transcripción para preparar los ARN de VHC se obtuvieron de Charles Rice y la Universidad de Washington. Seis horas después de la inyección los ratones se sangraron y se midieron los niveles de hFIX para normalizar para la eficiencia de inyección. Se espera que los ARN de VHC inyectado se degraden rápidamente. Cualquier ARN detectado después de algunos días es probable que sea ARN recientemente sintetizado durante la replicación viral. Se ha desarrollado un método de PCR cuantitativa en tiempo real para medir los niveles de ARN de VHC en los hígados de estos ratones. Si se produce la replicación del virus, entonces los niveles de ARN de VHC en los ratones inyectados con el VHC 90 FL serán superiores a los niveles en ratones inyectados con el VHC 101 FL cuando se mide semanas después de la inyección. También está siendo desarrollado un ensayo histológico con el fin de ensayar la síntesis de proteínas del VHC. Son posibles tres resultados positivos diferentes 1) El ARN entra en el hígado pero no se traduce y no se replica 2) el ARN entra en el hígado y se traduce, pero no se replica 3) el ARN entra en el hígado, se traduce y se replica. Los tres resultados son sistemas de modelo útiles. Si se produce 1, 2 ó 3, este sistema podría usarse para probar ribozimas dirigidas contra ARN de VHC (véase el experimento 9 más adelante). Si entonces se produce 2 ó 3, este sistema podría usarse para probar inhibidores de la traducción, replicación e infección del VHC.

La inyección de este ARN no produjo un ciclo de replicación viral para el VHC. Sin embargo, otro grupo ha usado un método similar para iniciar un ciclo de replicación de la hepatitis delta. Véase Chang J, Sigal LJ, Lerro A, Taylor J., J Virol, 75(7):3469-73 (2001).

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

Se han sintetizado químicamente ADNzimas que se dirigen al IRES de VHC. Los presentes inventores inyectaron hidrodinámicamente estas ribozimas en ratones y evaluaron su capacidad para reducir los niveles de ARN de VHC inyectado dentro del hígado. Se coinyectaron cinco nanomoles de ADNzima que se dirigen al IRES con 20 µg de un ARN que comprende el IRES de VHC seguido de la secuencia codificante de luciferasa de luciérnaga, seguido de 30 adenosinas. La secuencia del ADNzima fue 5'-GAGGTTTAGGAGGCTAGCTACAACGATCGTGCTCA-3' (SEC ID N°: 013). Los ratones que recibieron la ADNzima en combinación con el ARN diana emitieron 95 % menos de luz a las 6 horas que los ratones que recibieron el ARN diana solo. Conclusión: Los presentes inventores demostraron que esta ADNzima puede inhibir la traducción del IRES de VHC, supuestamente escindiendo la secuencia de ARN de IRES. También se probaron ribozimas sintéticas usando una metodología análoga y se encontró que eran ineficaces.

1. Este experimento es para hacer un transcurso de tiempo de la expresión de luciferasa después de una única inyección de ARN con casquete y poliadenilado. Si se cumple la siguiente condición, entonces los presentes inventores pueden usar un ajuste de decaimiento exponencial de primer orden (descrito por la Ecuación 1) de los

datos para calcular la tasa de degradación de la proteína expresada. Con el fin de ajustar estos datos a un decaimiento exponencial de primer orden simple, la semivida del ARNm debe ser significativamente inferior a la semivida de la proteína (al menos 5-10 veces menos). Si esta condición no se cumple, entonces puede usarse una relación matemática más compleja que tiene en cuenta la semivida del ARNm. Otra solución a este problema es reducir la semivida del ARNm preparándolo sin casquete u omitiendo el ARN competidor.

Si los presentes inventores definen la cantidad de proteína en un momento dado (o la señal de la proteína) como A, la cantidad de proteína (o señal) en el primer punto de tiempo como A₀, la constante de la tasa de decaimiento como k y el tiempo después de la primera medición como t, la ecuación sería de la forma:

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

1. Descripción del experimento:

Cuatro grupos de 6 ratones recibieron inyecciones de 20 microgramos de ARN de luciferasa poliadenilado con casquete + 60 microgramos de ARN competidor sin casquete + 800 unidades de RNasin. A las 3, 6, 9 ó 24 horas, los ratones se administraron con una inyección intraperitoneal de luciferina (1,5 microgramos/gramo de peso corporal) y se midió la luz emitida del ratón.

Los resultados se proporcionan en la siguiente tabla:

	Horas después	Unidades de luz	Patrón	Error estándar
1	3,000	530000,000	330000,000	150000,000
2	6,000	200000,000	88000,000	36000,000
3	9,000	110000,000	43000,000	18000,000
4	24,000	1900,000	1100,000	440,000

Las unidades relativas de luz se presentaron frente al tiempo y la curva resultante se ajustó a la Ecuación 1. Este análisis da una constante de la velocidad de degradación aparente de 0,297 hora⁻¹.

El método más común para medir una semivida de una proteína es el siguiente. En un enfoque, la proteína se purifica y algunas veces se marca (por ejemplo, con yodo radiactivo). La proteína purificada se inyecta y en tiempos diferentes el animal se muestrea y la cantidad de proteína restante en cualquier momento determinado se representa frente al tiempo y la curva se ajusta a una ecuación tal como la Ecuación 1. La ventaja del método de los presentes inventores es que no requiere la síntesis *in vitro* o purificación de la proteína.

J. Los presentes inventores han construido ARN que contienen regiones reguladoras del ARN de VHC que controlan la traducción de una proteína llamada luciferasa (denominada aquí ARN de VHC luc). Los presentes inventores también han construido plásmidos de expresión de ADN que expresan ARN similares una vez entran en las células (denominado aquí ADN de VHC luc). Véase la Figura 3 para los diagramas de estas construcciones.

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

Los presentes inventores han sintetizado oligonucleótidos sintéticos cortos de un tipo conocido como oligos de morfolino. Los presentes inventores mezclaron 1 nanomol de un oligo de morfolino con 10 microgramos de ARN de VHC luc o 1 microgramo de ADN de VHC luc. El oligo de morfolino se preparó por Gene Tools, LLC en Corvallis, Oregon y tiene la secuencia 5'-TCTTTGAGGTTTAGGATTCGTGCTC-3' (SEC ID N^o: 14). Esta mezcla se añade entonces a 1,8 mililitros de tampón y se inyecta bajo alta presión en las venas de la cola de ratones como se ha descrito en la solicitud previa. Como control, mezclas que no contienen el inhibidor se inyectan en otros ratones. En presencia de inhibidor, la luz emitida se reduce más del 90 %. Los presentes inventores concluyen de este hallazgo que la traducción del ARN inyectado o la traducción del ARN producido a partir del ADN inyectado se previene por el inhibidor por un mecanismo antisentido. En el caso del ARN inyectado, los presentes inventores pueden solo seguir esta inhibición durante aproximadamente 24 horas, debido a la estabilidad limitada del ARN en células. En el caso del ADN inyectado, los presentes inventores pueden monitorizar la traducción durante aproximadamente 8 días. La inhibición traduccional duró durante la duración completa del tiempo que los presentes inventores pudieron medir la traducción en este sistema.

K.

Experimento A

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

Grupo de prueba:

- 10 Co-inyectar inhibidor con ARN. Ambos van a las mismas células. La inhibición se expresa como actividad (brillante) en comparación con el grupo de control.

Experimento B

- 15 Mismo que el experimento A, excepto que los presentes inventores inyectan un ADN que codifica el ARN diana junto con el inhibidor. El ADN va al núcleo de los hepatocitos de ratón y se transcribe dando el ARN diana. Este ARN va al citoplasma de las células donde interacciona con el inhibidor.

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

El protocolo de cribado anterior en el que el inhibidor y ARN/ADN se coadministran ofrece ventajas importantes en términos de permitir que se separen cuestiones de la administración de fármaco de cuestiones de la eficacia del fármaco.

- 25 Es evidente de los resultados anteriores y la discusión que la invención objeto proporciona una forma viable de uso de agentes de iARN en organismos mamíferos no embrionarios, donde los métodos objeto y composiciones pueden emplearse para varias aplicaciones terapéuticas diferentes. Además, la presente aplicación proporciona un método mejorado de transferencia de un ácido nucleico a una célula diana. Específicamente, la presente aplicación
30 proporciona un método *in vivo* altamente eficaz para la transferencia de ácido nucleico desnudo que no emplea vectores virales y, por tanto, proporciona muchas ventajas con respecto a los métodos del estado de la técnica de transferencia de ácido nucleico. Como tal, la invención objeto y otra materia descrita en el presente documento representa una contribución significativa a la materia.

35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Board of Trustees of the Leland Stanford Junior University

- 40 <120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA LA INHIBICIÓN MEDIADA POR IARN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN MAMÍFEROS

<130> STAN-180WO

- 45 <150> 60/307.411
<151> 27-07-2001

<150> 60/360.664
<151> 27-02-2002

- 50 <160> 14

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

- 55 <210> 1
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

- 60 <220>
<223> oligonucleótido

<400> 1
ucgaaguacu cagcguaagu u 21

- 65 <210> 2
<211> 21

<212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido

 <400> 2
 cuuacgcuga guacuucgau u 21

 10 <210> 3
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 3
 20 cuuacgcuga guacuucgau u 21

 <210> 4
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 25

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 4
 30 uugaaugcga cucaugaagc u 21

 <210> 5
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 35

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 5
 40 agcuucauaa ggcgcaugcu u 21

 <210> 6
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 45

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 6
 50 uuucgaagua uuccgcuac g 21

 <210> 7
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 55

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 7
 60 cugugagauc uacggagccu guu 23

 <210> 8
 <211> 23
 65

ES 2 546 829 T3

<212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido

 <400> 8
 uugacacucu agaugccucg gac 23

 10 <210> 9
 <211> 33
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 9
 20 ggauuccaau ucagcgggag ccaccugaug aag 33

 <210> 10
 <211> 36
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 25

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 10
 30 uaaccuaagg uugagucgcu cucggugggc uaguuc 36

 <210> 11
 <211> 66
 <212> ARN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 40 <400> 11

ggucgaagua cucagcguaa gugaugucca cuuaaguggg uguuguuugu guuggguguu 60
uugguu 66

 <210> 12
 45 <211> 78
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> oligonucleótido

 <400> 12

gggauggacg auggccuuga ucuuguuuac cgucacaccc accacuggga gauacaagau 60
caaggccauc gucuuccu 78
 55

 <210> 13
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60

 <220>
 <223> oligonucleótido

ES 2 546 829 T3

<400> 13
gaggtttagg aggctagcta caacgatcgt gctca 35

5
<210> 14
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> oligonucleótido

<400> 14
tcittgaggt ttaggattcg tgctc 25

15

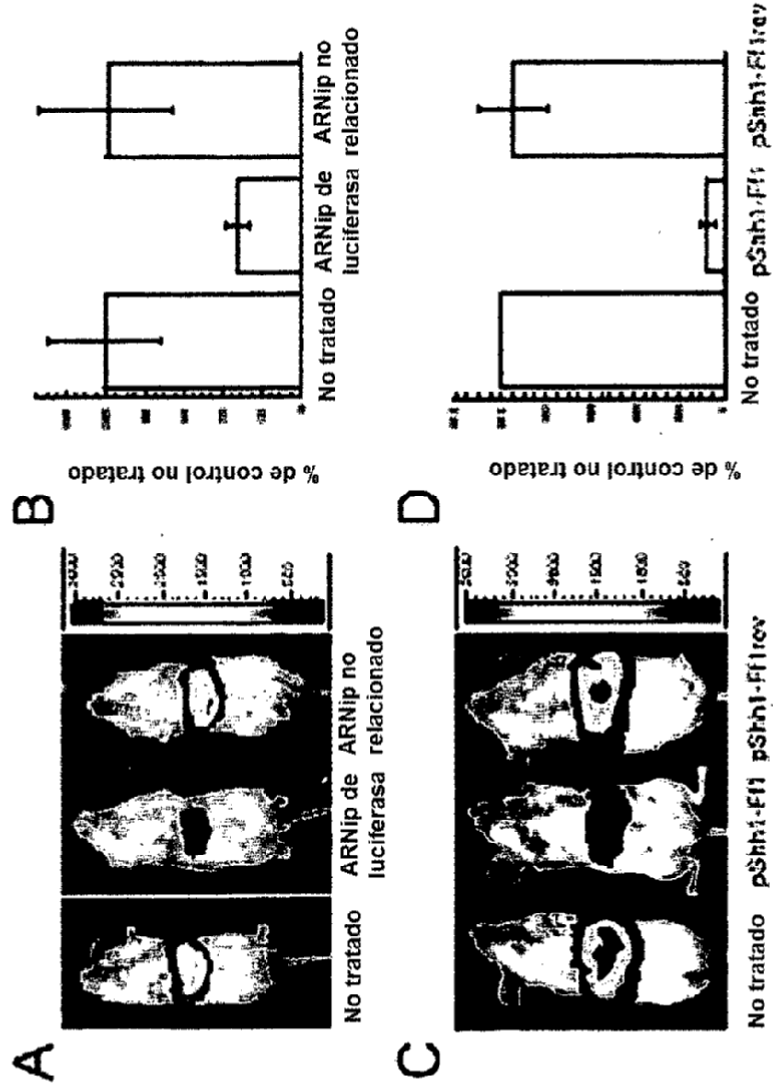
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento que comprende administrar la composición a un mamífero adulto para reducir la expresión de una secuencia diana en el hígado de dicho mamífero adulto, comprendiendo la composición un vehículo farmacéuticamente aceptable y:
- 10 un agente de iARN seleccionado de un ARNip o un ARNhp, en el que dichos ARNip o ARNhp son específicos para una secuencia diana presente en una célula hepática de dicho mamífero adulto y reducen la expresión de la secuencia diana y en donde el ARNip o el ARNhp tienen una longitud de entre 15 y 30 nucleótidos o tienen una estructura dúplex de 15 a 29 pares de bases de longitud; o un vector que comprende ADN que se transcribe *in vivo* en dichos ARNhp o ARNip.
- 15 2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho agente de iARN es un vector que comprende ADN que se transcribe *in vivo* en dichos ARNip o ARNhp.
3. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho agente de iARN es un ARNip o un ARNhp.
- 20 4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en el tratamiento de infección viral en el hígado de dicho mamífero adulto en donde la secuencia diana está presente en el hígado después de la infección viral del mismo.
5. La composición para su uso según la reivindicación 4, en donde la infección viral es una infección viral por ARN.
- 25 6. La composición para su uso según la reivindicación 4, en donde la infección viral es una infección viral por hepatitis.
7. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho agente de iARN es para administración a dicho mamífero adulto conjuntamente con un inhibidor de ARNasa.
- 30 8. La composición para su uso de la reivindicación 4, en donde la secuencia diana presente en la célula hepática en dicho mamífero adulto después de infección viral del mismo es una secuencia de ARN viral genómica.
9. La composición para su uso de la reivindicación 4, en donde la secuencia diana presente en la célula hepática en el mamífero adulto después de la infección del mismo es un transcrito codificado por un virus de ARN.
- 35 10. La composición para su uso de la reivindicación 1, en donde la secuencia del gen diana es endógena.

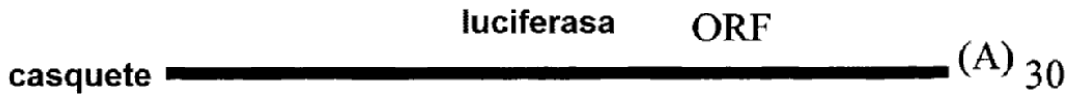
Figura 1:



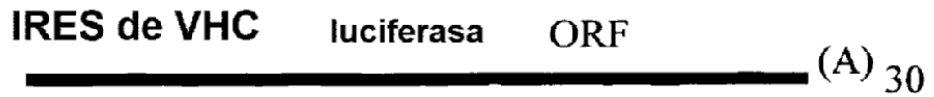
Figura 2



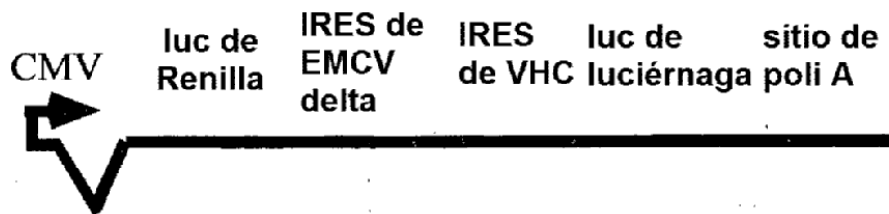
ARN de control SP6



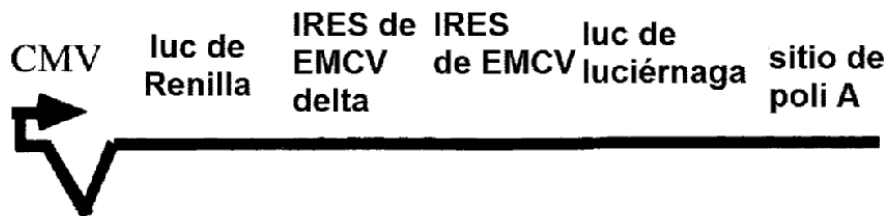
ARN ACCATG



ADN dual de pVHC luc



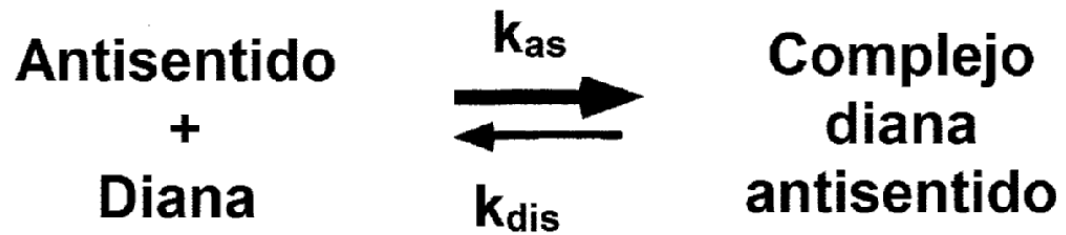
ADN dual de pEMCV Luc



ADN de pCMVGL3



Figura 3

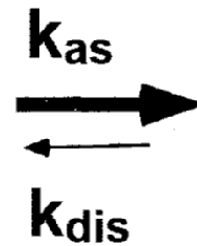


$$K = \frac{k_{as}}{k_{dis}}$$

k_{as} está controlada por difusión independiente en gran medida de la longitud

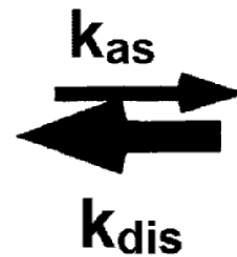
Oligo largo

No específico



Oligo corto

Ineficaz



Oligo óptimo

Correcto

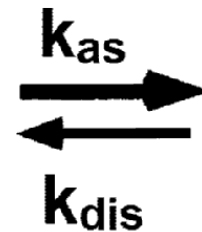


Figura 4

Figura 5A

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

Inhibición con morfolino 25-mero de la traducción de ARN ACCATG

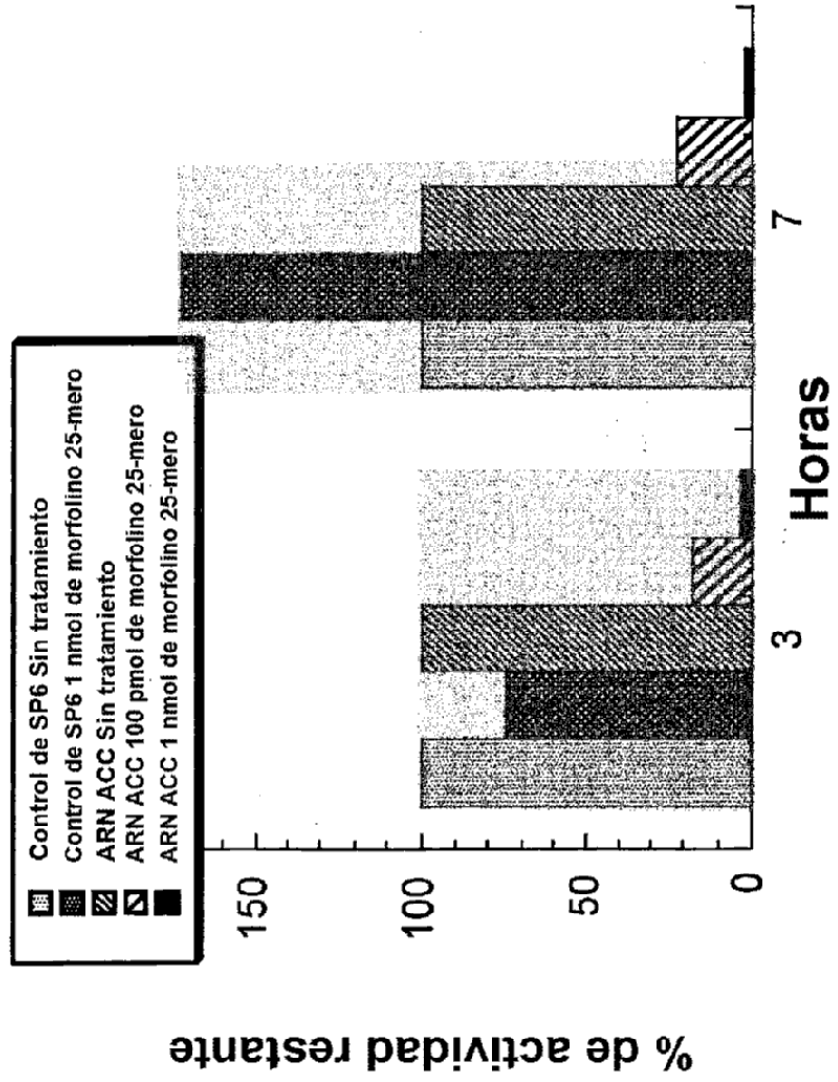


Figura 5B

Las ADNzimas Dz 335 y Dz 352, así como la molécula antisentido Psdesoxi, inhiben la traducción del ARN ACCATG (igual a ARN ACC) uniéndose al IRES de VHC

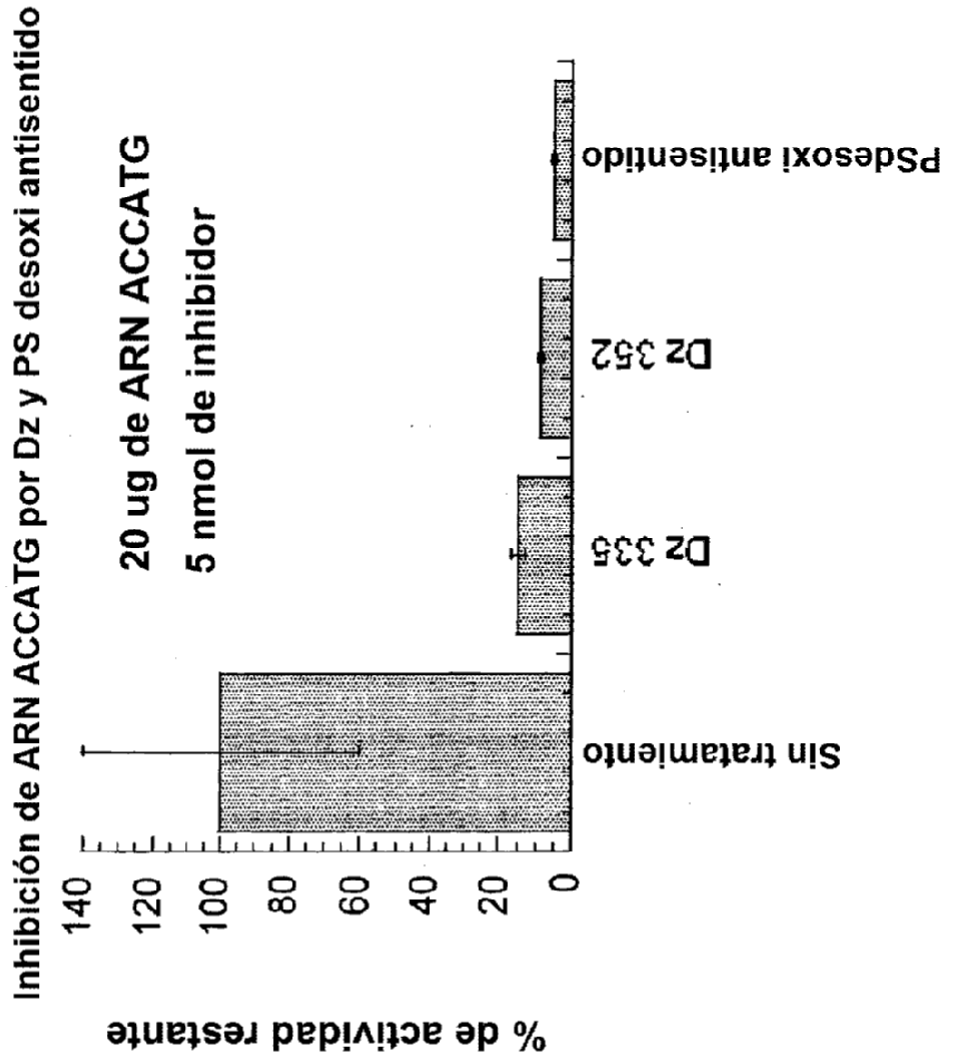


Figura 5C

La molécula antisentido morfolino 25-mero inhibe la traducción del ARN ACCATG, que contiene el IRES de VHC, pero no el ARN de control SP6, que no lo tiene.
Esta inhibición es dependiente de la dosis

Inhibición con morfolino 25-mero de la traducción de ARN ACCATG

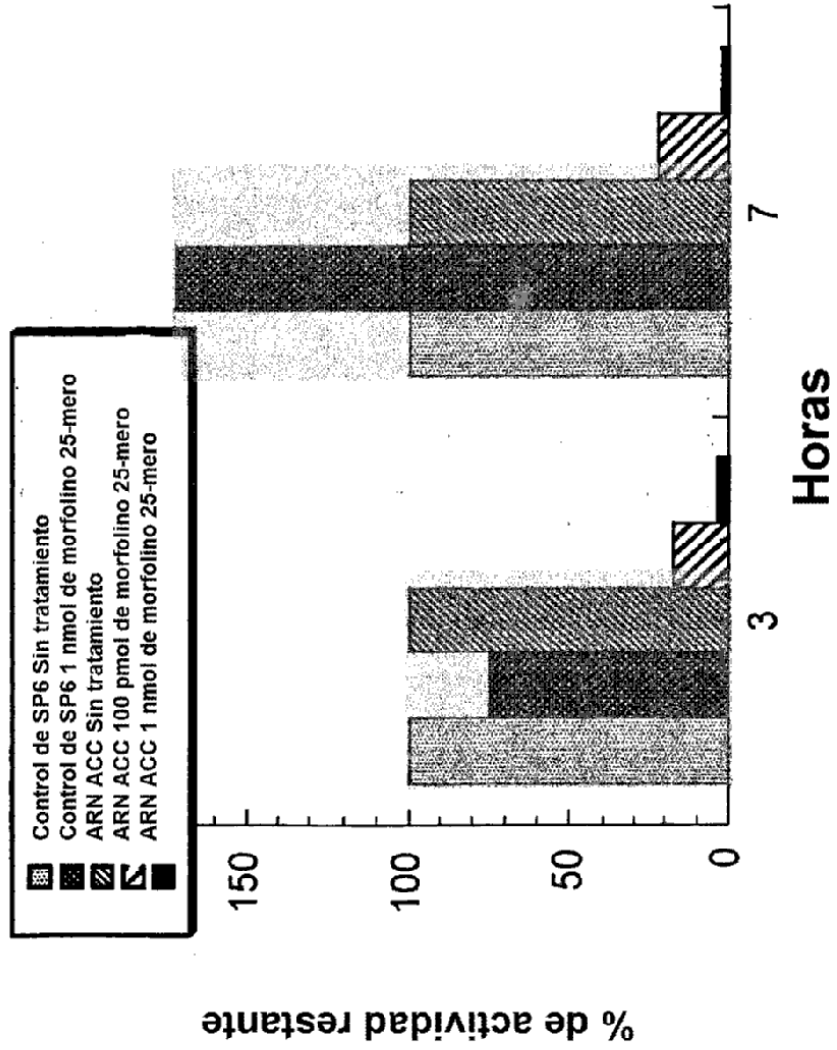


Figura 5D

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

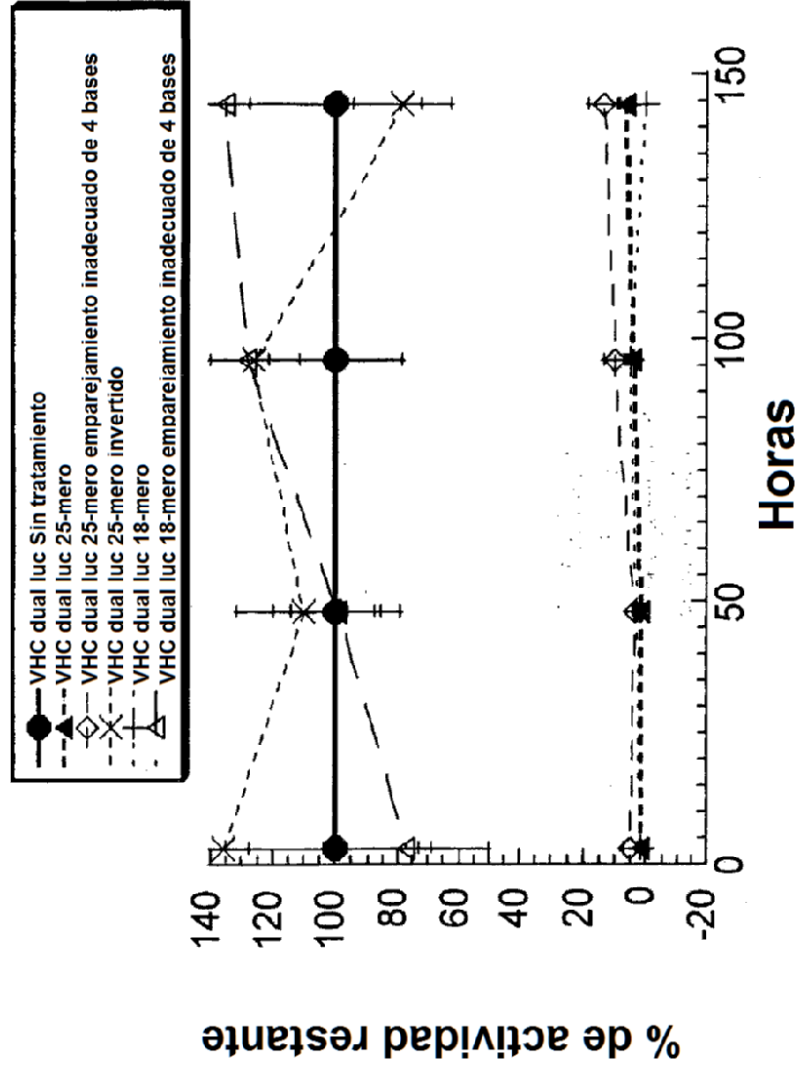


Figura 5E
 Los plásmidos EMCV dual luc y CMVGL3 no contienen un IRES de VHC y la traducción de la luciferasa no debería inhibirse por un morfolino antisentido. No lo hace. Indicando de nuevo que la inhibición observada con ARN ACCATG y VHC dual luc es específica

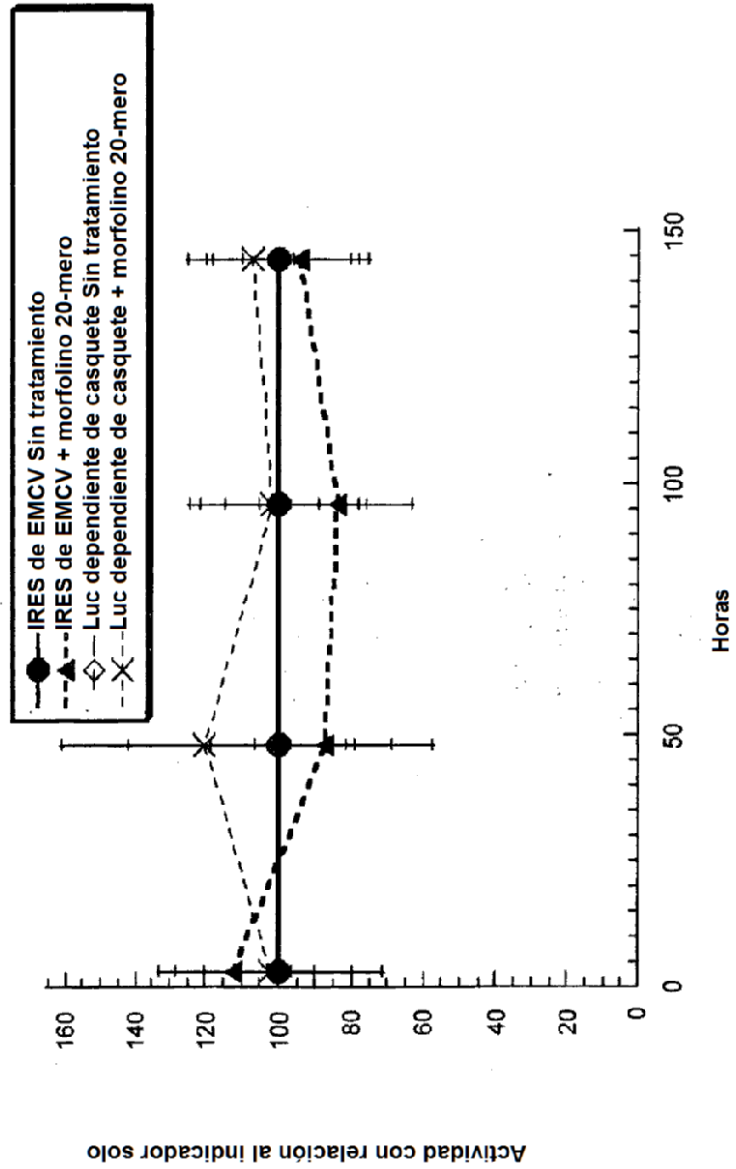


FIGURA 5F
La inhibición del VHC dual luc por el morfolino 20-mero es dependiente de la dosis entre 1 y 1000 picomoles por ratón, como es de esperar para un inhibidor antisentido

