

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 122**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2008 E 08756453 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2164967**

54 Título: **Reducción de toxicidad por interferencia de ARN desviada de su diana**

30 Prioridad:

31.05.2007 US 932468 P

21.03.2008 US 38685 P

25.03.2008 US 70622 P

28.04.2008 US 111025

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

23.10.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)**

IOWA CENTERS FOR ENTERPRISE 2600

UNIVERSITY CAPITOL CENTRE

IOWA CITY, 52242-5500, US

72 Inventor/es:

DAVIDSON, BEVERLY L.;

MAS MONTEYS, ALEJANDRO;

MCBRIDE, JODI L. y

BOUDREAU, RYAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 549 122 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

Reducción de toxicidad por interferencia de ARN desviada de su diana

5 Prioridad de invención

La presente solicitud de patente es una solicitud de continuación parcial de la solicitud de Estados Unidos Nº de serie 12/111.025 presentada el 28 de abril de 2008, que reivindica prioridad según 35 U.S.C. § 119(e) a la solicitud provisional de Estados Unidos Nº 60/914.309 presentada el 26 de abril de 2007. La presente solicitud de patente también reivindica prioridad según 35 U.S.C. § 119(e) a la solicitud provisional de Estados Unidos Nº 60/932.468 presentada el 31 de mayo de 2007, a la solicitud provisional de Estados Unidos Nº 61/038.685 presentada el 21 de marzo de 2008, y a la solicitud provisional de Estados Unidos Nº 61/070.622 presentada el 25 de marzo de 2008.

La presente solicitud reivindica el beneficio de todas las solicitudes enumeradas anteriormente.

15 Apoyo gubernamental

Esta invención se hizo con el apoyo gubernamental según NS-50210, HD044093, DK-54759 y NS-592372 otorgado por el National Institutes of Health. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

20 Antecedentes de la invención

El ARN bicatenario (ARNbc) puede inducir silenciamiento génico post-transcripcional específico de secuencia en muchos organismos mediante un proceso conocido como interferencia de ARN (iARN). Sin embargo, en células de mamífero, el ARNbc que es de 30 pares de bases o más largo puede inducir respuestas no específicas de secuencia que desencadenan una supresión de la síntesis de proteínas. La interferencia de la expresión génica por moléculas de iARN está ahora reconocida como una estrategia de origen natural para silenciar genes en las células de muchos organismos.

Las células pueden contener diversos ARNbc pequeños (-21-25 pb). Dos tipos de moléculas de ARN pequeño tiene un efecto post-transcripcional: (1) moléculas de ARNip que inducen la degradación del ARNm, y (2) miARN, también llamados microARN, que inducen inhibición transcripcional. Otros ARN pequeños funcionan a nivel transcripcional afectando al ADN y la metilación de histonas. Las moléculas de iARN pueden generarse de forma exógena (por ejemplo, moléculas de ARNip), e inducen silenciamiento génico transitorio. Como alternativa, pueden introducirse moléculas de iARN mediante un vector que expresa ARN horquilla corto (ARNhc) para mostrar silenciamiento génico persistente.

Stegmeier et al. (2005) muestran que ARNhc transcritos por polimerasa-II presentan silenciamiento eficaz de expresión génica cuando el ARNhc se incluye en un contexto de microARN (Stegmeier et al., 2005, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 102(37): 13212-13217).

Silva et al. (2005) presentan la construcción y validación de bibliotecas de expresión de ARNhc de segunda generación diseñadas usando un conocimiento aumentado de la bioquímica de interferencia de ARN (Silva et al., 2005, Nature Genetics 37(11): 1281-1288).

El documento WO 2008/134646 A se refiere a moléculas de iARN dirigidas contra una secuencia de ácido nucleico que codifica enfermedades por repetición de poliglutamina, y métodos para usar estas moléculas de iARN.

El documento WO 2005/081714 A2 proporciona células y animales, así como métodos para producir células y animales, que expresan al menos una molécula de ARN interferente para regular la expresión de un gen o familia de genes específicos.

Sumario de la invención

Se describe en este documento un vector lanzadera de miARN aislado que expresa un ARNip terapéutico con toxicidad limitada desviada de su diana. La inclusión de un ARNip que muestra toxicidad desviada de su diana en el contexto de un vector lanzadera de ARNhc dentro de los vectores lanzadera de miARN descritos en este documento limita la toxicidad desviada de su diana del ARNip. También se describe en este documento un vector lanzadera de miARN que expresa un ARNip terapéutico en el cerebro con toxicidad limitada desviada de su diana. Se describe en este documento un vector lanzadera de miARN que expresa un ARNip terapéutico en el cuerpo estriado con toxicidad limitada desviada de su diana. Descrito adicionalmente en este documento, el vector lanzadera de miARN expresa un ARNip terapéutico en el cerebro con toxicidad limitada desviada de su diana. La presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica un transcrito de miARN primario (pri-miARN) que consiste en, en orden de posición, una región flanqueante 5', una primera región de ARNip, una región de bucle, una segunda región de ARNip, y una región flanqueante 3', donde la región flanqueante 5' comprende: (a) una secuencia de unión 5' unida de forma contigua a la primera región de ARNip, donde la secuencia de unión 5' consiste en 5-7 nucleótidos, (b) una

secuencia de abultamiento 5' posicionada cadena arriba de la secuencia de unión 5' que consiste en 1-10 nucleótidos, y (c) una secuencia espaciadora 5' posicionada cadena arriba de la secuencia de abultamiento 5', donde la secuencia espaciadora 5' es UGGUACCGUU (SEC ID N° 180). En ciertas realizaciones, la primera región de ARNip es una región no de guía y la segunda región de ARNip es una región de guía, y en otras realizaciones la primera región de ARNip es una región de guía y la segunda región de ARNip es una región no de guía. Como se usa en este documento, la expresión "región de guía de ARNip" es una secuencia monocatenaria de ARN que es complementaria a una secuencia diana. Como se usa en este documento, la expresión "región no de guía de ARNip" es una secuencia monocatenaria de ARN que es complementaria a la "región de guía de ARNip". Por tanto, en las condiciones apropiadas, la región de guía de ARNip y la región no de guía de ARNip se asocian para formar un dúplex de ARN. Como se usa en este documento, todas las secuencias de ácido nucleico se enumeran, como es habitual, en una dirección 5' a 3'.

En ciertas realizaciones, la primera región de ARNip es de aproximadamente 20-30 nucleótidos de longitud, y es aproximadamente un 70-100% complementaria a la segunda región de ARNip, que también es de aproximadamente 20-30 nucleótidos de longitud.

La región flanqueante 5' contiene una secuencia de unión 5' unida de forma contigua a la primera región de ARNip (Fig. 20B y 20C). Como se usa en este documento, la expresión "sitio de unión" o una "secuencia de unión" es una corta secuencia de ácido nucleico de menos de 60 nucleótidos que conecta otras dos secuencias de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, el sitio de unión es de una longitud de cualquier número entero entre 4 y 50, inclusivos. La secuencia de unión 5' consiste en 5-7 nucleótidos (por ejemplo, consiste en 6 nucleótidos). En ciertas realizaciones, la secuencia de unión 5' codifica GUGASSS, donde S es un nucleótido G o C (es decir, la secuencia de unión 5' codifica UGACCC, UGACCG, UGACGC, UGAGCC, UGACGG, UGAGGC, UGAGCG, o UGAGGG). En ciertas realizaciones, la secuencia de unión 5' codifica GUGAGCG.

La región flanqueante 5' comprende adicionalmente una secuencia de abultamiento 5' posicionada cadena arriba de la secuencia de unión 5'. Como se usa en este documento, la expresión "secuencia de abultamiento" es una región de ácido nucleico que es no complementaria al ácido nucleico opuesto al mismo en un dúplex. Por ejemplo, un dúplex contendrá una región de ácidos nucleicos complementarios, después una región de ácidos nucleicos no complementarios, seguida por una segunda región de ácidos nucleicos complementarios. Las regiones de ácidos nucleicos complementarios se unirán entre sí, mientras que la región no complementaria central no se unirá, formando de ese modo un "abultamiento". En ciertas realizaciones, las dos hebras de ácido nucleico posicionada entre las dos regiones complementarias serán de diferentes longitudes, formando de ese modo un "abultamiento". La secuencia de abultamiento 5' consiste en aproximadamente 1-10 nucleótidos. En ciertas realizaciones, la secuencia de abultamiento 5' codifica UAAACUCGA. En ciertas realizaciones, la secuencia de abultamiento 5' tiene un 0-50% de complementariedad a la secuencia de abultamiento 3'. El sitio de restricción XhoI es CTCGAG (con "T" siendo "U" en forma de ARN en esta y todas las demás secuencias enumeradas en este documento).

La región flanqueante 5' contiene adicionalmente una secuencia espaciadora 5' posicionada cadena arriba de la secuencia de abultamiento 5'. En ciertas realizaciones, la secuencia espaciadora 5' consiste en 9-12 nucleótidos, tal como 10-12 nucleótidos. En ciertas realizaciones, la secuencia espaciadora 5' tiene un 60-100% de complementariedad con una secuencia espaciadora 3'. La secuencia de abultamiento 5' comprende un sitio de clonación, tal como un sitio XhoI. En ciertas realizaciones, la secuencia espaciadora 5' es UGGUACCGUU (SEC ID N°180).

En ciertas realizaciones, la región flanqueante 5' comprende adicionalmente una secuencia cadena arriba 5' posicionada cadena arriba de la secuencia espaciadora 5'. En ciertas realizaciones, la secuencia cadena arriba 5' es de aproximadamente 5-5000 nucleótidos de longitud, tal como 30-2000 nucleótidos de longitud.

En ciertas realizaciones, la región flanqueante 5' comprende una secuencia de unión 3' unida de forma contigua a la segunda región de ARNip (Fig. 20D y 20E). En ciertas realizaciones, el sitio de unión es de una longitud de cualquier número entero entre 4 y 50, inclusivos. En ciertas realizaciones, la secuencia de unión 3' consiste en 5-7 nucleótidos (por ejemplo, consiste en 6 nucleótidos). En ciertas realizaciones, la secuencia de unión 3' es al menos aproximadamente un 85% complementaria a una secuencia de unión 5'. En ciertas realizaciones, la secuencia de unión 3' codifica CGGYUAC, donde Y es C o U. En ciertas realizaciones, la secuencia de unión 3' codifica CGCCUAC.

En ciertas realizaciones, la región flanqueante 3' comprende adicionalmente una secuencia de abultamiento 3' posicionada cadena abajo de la secuencia de unión 3'. En ciertas realizaciones, la secuencia de abultamiento 3' comprende un sitio de clonación, tal como un sitio SpeI/XbaI o un sitio SpeI. El sitio SpeI/XbaI está codificado por CTCAGA, y el sitio SpeI está codificado por CTCAGT. En ciertas realizaciones, la secuencia de abultamiento 3' consiste en aproximadamente 1-15 nucleótidos (tal como 2-15 nucleótidos o 1-10 nucleótidos). En ciertas realizaciones, la secuencia de abultamiento 3' codifica UAG. En ciertas realizaciones, la secuencia de abultamiento 5' es complementaria a la secuencia de abultamiento 3' en solamente un nucleótido en cada extremo de la secuencia.

5 En ciertas realizaciones, la región flanqueante 3' contiene adicionalmente una secuencia espaciadora 3' posicionada cadena abajo desde la secuencia de abultamiento 3'. En ciertas realizaciones, la secuencia espaciadora 3' consiste en 9-12 nucleótidos, tal como 10-12 nucleótidos. En ciertas realizaciones, la secuencia espaciadora 3' es AGCGGCCGCCA (SEC ID N°181). En ciertas realizaciones, la secuencia espaciadora 3' es al menos aproximadamente un 70% complementaria a una secuencia espaciadora 5'.

10 En ciertas realizaciones, la región flanqueante 3' contiene adicionalmente una secuencia cadena abajo 3' posicionada cadena abajo desde la secuencia espaciadora 3'. En ciertas realizaciones, una secuencia cadena arriba 5' no aparea significativamente con la secuencia cadena abajo 3'. Como se usa en este documento, la expresión "no aparea significativamente con" significa que las dos hebras son menos de un 20% homólogas. En ciertas realizaciones, la secuencia cadena abajo 3' es de aproximadamente 5-5000 nucleótidos de longitud, tal como 30-2000 nucleótidos de longitud.

15 En ciertas realizaciones, la región de bucle es de 4-20 nucleótidos de longitud, tal como 15-19 nucleótidos de longitud. Del 0-50% de la región de bucle puede ser complementaria a otra parte de la región de bucle. Como se usa en este documento, la expresión "región de bucle" es una secuencia que une dos hebras complementarias de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, 1-3 nucleótidos de la región de bucle están inmediatamente contiguos a las hebras complementarias del ácido nucleico y pueden ser complementarios a los últimos 1-3 nucleótidos de la región de bucle. Por ejemplo, los primeros dos ácidos nucleicos en la región de bucle pueden ser complementarios a los últimos dos nucleótidos de la región de bucle. En ciertas realizaciones, la región de bucle es de 17 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, la región de bucle codifica CUNNNNNNNNNNNNNNNGG (SEC ID N° 182) o CCNNNNNNNNNNNNNNNGG (SEC ID N° 183). En ciertas realizaciones, la región de bucle codifica CUGUGAAGCCACAGAUGGG (SEC ID N° 184) o CCGUGAAGCCACAGAUGGG (SEC ID N°185).

25 La presente invención proporciona adicionalmente un ARN codificado por el ácido nucleico descrito en este documento.

30 La presente invención proporciona adicionalmente un casete de expresión que contiene un promotor unido de forma contigua al ácido nucleico descrito en este documento. En ciertas realizaciones, el promotor es un promotor polII o polIII, tal como un promotor U6 (por ejemplo, un promotor U6 de ratón). En ciertas realizaciones, el casete de expresión contiene adicionalmente un gen marcador. En ciertas realizaciones, el promotor es un promotor polIII. En ciertas realizaciones, el promotor es un promotor específico de tejido. En ciertas realizaciones, el promotor es un promotor inducible. En ciertas realizaciones, el promotor es un promotor polIII.

35 La presente invención proporciona un vector que contiene un casete de expresión descrito en este documento. En ciertas realizaciones, el vector es un vector de virus adenoasociado (AAV).

40 Se describe en este documento un animal no humano que comprende el ácido nucleico, el casete de expresión, o el vector.

También se describe en este documento una composición que comprende shHD(2.1), shHD(2.1b), sh1913, shGFP, miSCA1, shSCA1, miJNK, miHTT, miHD2.4, miHD2.4.2, miHD8.2, miHD8.2.2, miHD8.2.3, miSCA1-2225 o miSCA1-1399.

45 La presente invención proporciona un casete de expresión que codifica shHD(2.1), shHD(2.1b), sh1913, shGFP, miSCA1, shSCA1, miJNK, miHTT, miHD2.4, miHD2.4.2, miHD8.2, miHD8.2.2, miHD8.2.3, miSCA1-2225 o miSCA1-1399. En ciertas realizaciones, el casete de expresión contiene adicionalmente un gen marcador.

50 La presente invención proporciona un vector que comprende un casete de expresión que codifica shHD(2.1), shHD(2.1b), sh1913, shGFP, miSCA1, shSCA1, miJNK, miHTT, miHD2.4, miHD2.4.2, miHD8.2, miHD8.2.2, miHD8.2.3, miSCA1-2225 o miSCA1-1399.

55 También se describe en este documento un animal no humano que comprende shHD(2.1), shHD(2.1b), sh1913, shGFP, miSCA1, shSCA1, miJNK, miHTT, miHD2.4, miHD2.4.2, miHD8.2, miHD8.2.2, miHD8.2.3, miSCA1-2225 o miSCA1-1399, o un casete de expresión o vector que codifica estos ARNhc o miARN.

Se muestra en este documento un método para inducir interferencia de ARN administrando a un sujeto un ácido nucleico, un casete de expresión, un vector, o una composición descrita en este documento.

60 La presente invención proporciona un vector que contiene un promotor U6 unido de forma funcional a un ácido nucleico que codifica un miARN. Los sitios de inicio de la transcripción predichos de las construcciones de la presente invención son diferentes de los usados por los investigadores en el pasado. En ciertas realizaciones de la presente invención, el U6miARN tiene un extremo 5' prolongado. Si se trunca el extremo 5' para parecerse a la estrategia previa basada en CMV, la eficacia de silenciamiento se reduce severamente. La presente invención también proporciona secuencias flanqueantes mejoradas que muestran eficacia mejorada sobre las secuencias flanqueantes naturales de miR-30. El uso de la presente estrategia de miARN parece aliviar la toxicidad asociada

con los enfoques tradicionales de ARNhc. La estrategia de miARN no genera generalmente cantidades excesivas de iARN como lo hace en los enfoques de U6ARNhc.

Como se usa en este documento la expresión "secuencia de tronco" es una secuencia que es complementaria a otra secuencia en la misma molécula, donde las dos hebras complementarias hibridan para formar un dúplex (por ejemplo, la primera y segunda regiones de ARNip). El dúplex que se forma puede ser completamente complementario, o puede ser menos que completamente complementario, tal como un 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 75%, o 70% complementario entre sí. Adicionalmente, en ciertas realizaciones, una hebra puede contener más nucleótidos que la otra hebra, permitiendo la formación de un bucle lateral.

En ciertas realizaciones, una primera región de ARNip consiste en 5'-AAAAGAACUUUCAGCUACCAAG-3' (SEC ID N° 186) y la segunda región de ARNip consiste en 5'-UUUGGUAGCUGAAAGUUCUUUC-3' (SEC ID N° 187) (véase la Fig. 16, miHD(2.1)).

En ciertas realizaciones, una primera región de ARNip consiste en 5'-CAGAAAGAACUUUCAGCUACCG-3'(SEC ID N° 188) y una segunda región de ARNip consiste en 5'-UGGUAGCUGAAAGUUCUUUCU-3'(SEC ID N° 189) (véase la Fig. 16, miHD(2.1b)).

En ciertas realizaciones, una primera región de ARNip consiste en 5'-CAGCCCAGGUCAGCGUUGAAGU-3' (SEC ID N° 190) y una segunda región de ARNip consiste en 5'-ACUUCAACGCUGACCUGGGCUU-3' (SEC ID N° 191) (véase la Fig. 16, mi1913).

En ciertas realizaciones, una primera región de ARNip consiste en 5'-CAGCACAAGCUGGAGUACAAUU-3' (SEC ID N° 192) y una segunda región de ARNip consiste en 5'-AGUUGUACUCCAGCUUGUGCUU-3' (SEC ID N° 193) (véase la Fig. 16, miGFP).

En ciertas realizaciones, una primera región de ARNip consiste en 5'-CAGCACAAGCUGGAGUACAAUU-3' (SEC ID N° 194) y una segunda región de ARNip consiste en 5'-AGUUGUACUCCAGCUUGUGCUU-3' (SEC ID N° 195) (véase la Fig. 16, variante mi1913-miR30).

En ciertas realizaciones, una primera región de ARNip consiste en 5'-CGACCGUGUGAAUCAUUGUUUA-3' (SEC ID N° 196) y una segunda región de ARNip consiste en 5'-UAGACAAUGAUUCACACGGUCA-3' (SEC ID N° 197) (véase la Fig. 19, miHD2.4).

En ciertas realizaciones, una primera región de ARNip consiste en 5'-CACCGUGUGAAUCAUUGUCUAA-3' (SEC ID N° 198) y una segunda región de ARNip consiste en 5'-CAUUGAGACAAUGAUUCACACGGUA-3' (SEC ID N° 199) (véase la Fig. 19, miHD2.4.2).

En ciertas realizaciones, una primera región de ARNip consiste en 5'-CAGCAGCUUGUCCAGGUUUAUG-3' (SEC ID N° 200) y una segunda región de ARNip consiste en 5'-UAUAAACCUGGACAAGCUGCUA-3' (SEC ID N° 201) (véase la Fig. 19, miHD8.2).

En ciertas realizaciones, una primera región de ARNip consiste en 5'-CAGAGCAGCUUGUCCAGGUUUA-3' (SEC ID N° 202) y una segunda región de ARNip consiste en 5'-UAAACCUGGACAAGCUGCUCUA-3' (SEC ID N° 203) (véase la Fig. 19, miHD8.2.2).

En ciertas realizaciones, una primera región de ARNip consiste en 5'-AAGAGCAGCUUGUCCAGGUUUA-3' (SEC ID N° 204) y una segunda región de ARNip consiste en 5'-UAAACCUGGACAAGCUGCUCUC-3' (SEC ID N° 205) (véase la Fig. 19, miHD8.2.3).

En ciertas realizaciones, una primera región de ARNip consiste en 5'-CGGCGAACUGAAGUUUCCAGAA-3' (SEC ID N° 206) y una segunda región de ARNip consiste en 5'-UUCUGGAAACUUCAGUUCGCCA-3' (SEC ID N° 207) (véase la Fig. 19, miSCA1-2225).

En ciertas realizaciones, una primera región de ARNip consiste en 5'-CGACCGUGUGAAUCAUUGUUUACCGGCCAGCAGCAAGCAAUCAU-3' (SEC ID N° 208) y una segunda región de ARNip consiste en 5'-GUGAUUGCUUGCUGCUGGCCGA-3' (SEC ID N° 209) (véase la Fig. 19, miSCA1-1399).

En ciertas realizaciones, el ácido nucleico de la invención no codifica una secuencia que consiste en la SEC ID N° 219, SEC ID N° 220, SEC ID N° 221 o SEC ID N° 222.

La presente invención también proporciona vectores que contienen los casetes de expresión descritos en este documento. Ejemplos de vectores apropiados incluyen vectores adenovirales, lentivirales, virales adenoasociados (AAV), poliovirales, del virus del herpes simple (HSV), o virales basados en Maloney murino. En una realización, el

vector es un vector de virus adenoasociado. Estos casetes y vectores pueden estar contenidos en una célula, tal como una célula de mamífero. Un mamífero no humano puede contener el casete o vector.

5 Se muestran en este documento las células (tal como una célula de mamífero) que contienen las moléculas de ácido nucleico, los casetes de expresión o vectores descritos en este documento. Un mamífero no humano que contiene las moléculas de ácido nucleico, casetes de expresión o vectores descritos en este documento también se muestra en este documento.

10 La presente invención proporciona un ácido nucleico, un casete de expresión, un vector, o una composición descrita en este documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

15 La presente invención proporciona una molécula de iARN aislada que tiene un microARN que tiene un saliente en el extremo 3'. En ciertas realizaciones, el saliente es una repetición de 2 a 5 nucleótidos. En ciertas realizaciones, el saliente es una secuencia UU, UUU, UUUU CUU, CUUU o CUUUU. En ciertas realizaciones, el microARN es un microARN de origen natural. En ciertas realizaciones, el microARN es un microARN artificial. En ciertas realizaciones, la molécula de iARN produce un nivel disminuido de toxicidad desviada de su diana.

20 La presente invención proporciona un ácido nucleico, un casete de expresión o un vector descrito en este documento para su uso en terapia que produce interferencia de ARN de baja toxicidad. En ciertas realizaciones, el casete de expresión contiene un promotor polII.

25 También se muestra en este documento un método para inducir interferencia de ARN de baja toxicidad administrando a un sujeto un casete de expresión que codifica un promotor polIII unido de forma funcional a un ácido nucleico que codifica un miARN. En ciertas realizaciones, el miARN comprende un saliente 5' ó 3' de 2 ó 3 nucleótidos. En ciertas realizaciones, el miARN comprende un saliente 3' de 2 nucleótidos. En ciertas realizaciones, el miARN es un miARN artificial.

30 Se muestra en este documento un método para tratar a un sujeto con una enfermedad neurodegenerativa administrando al sujeto un ácido nucleico, un casete de expresión, un vector, o una composición descrita en este documento para tratar la enfermedad neurodegenerativa. En ciertas realizaciones, la enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad por repetición de trinucleótidos. En ciertas realizaciones, la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Huntington o ataxia espinocerebelosa.

35 La presente invención proporciona la supresión de la acumulación de una proteína codificada por el gen de poliglutamina (tal como huntingtina o ataxina-1) en una célula introduciendo una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un ácido ribonucleico (ARN)) descrita en este documento en la célula en una cantidad suficiente para suprimir la acumulación de huntingtina o ataxina-1 en la célula. En ciertas realizaciones, la acumulación de huntingtina o ataxina-1 se suprime en al menos un 10%. En ciertas realizaciones, la acumulación de huntingtina o ataxina-1 se suprime en al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 95%, o 99%. En ciertas realizaciones, la supresión de la acumulación de la proteína es en una cantidad suficiente para causar un efecto terapéutico, por ejemplo, para reducir la formación de ovillos.

40

45 La presente invención proporciona la prevención de efectos citotóxicos de huntingtina o ataxina-1 mutante en una célula introduciendo una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un ácido ribonucleico (ARN)) descrita en este documento en la célula en una cantidad suficiente para suprimir la acumulación de huntingtina o ataxina-1. En ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico previene los efectos citotóxicos de huntingtina o ataxina-1, por ejemplo, en una célula neuronal.

50 La presente invención proporciona inhibición de la expresión de un gen de huntingtina o ataxina-1 en una célula introduciendo una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un ácido ribonucleico (ARN)) descrita en este documento en la célula en una cantidad suficiente para inhibir la expresión de la huntingtina o ataxina-1, y donde el ARN inhibe la expresión del gen de huntingtina o ataxina-1. En ciertas realizaciones, la huntingtina o ataxina-1 se inhibe en al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 95%, o 99%.

55 La presente invención proporciona inhibición de la expresión de un gen de huntingtina o ataxina-1 en un mamífero (por ejemplo, un ser humano o un mamífero no humano) mediante (a) proporcionando un mamífero que contiene una célula neuronal, donde la célula neuronal contiene el gen de huntingtina o ataxina-1 y la célula neuronal es susceptible a interferencia de ARN, y el gen de huntingtina o ataxina-1 se expresa en la célula neuronal; y (b) poniendo en contacto el mamífero con un ácido ribonucleico (ARN) o un vector descrito en este documento, inhibiendo de ese modo la expresión del gen de huntingtina o ataxina-1. En ciertas realizaciones, la acumulación de huntingtina o ataxina-1 se suprime en al menos un 10%. En ciertas realizaciones, la huntingtina o ataxina-1 se inhibe en al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 95%, o 99%. En ciertas realizaciones, la célula está localizada *in vivo* en un mamífero.

60

65 La presente invención proporciona un vector viral que comprende un promotor y un microARN (miARN) lanzadera que contiene un ARNip específico incluido para una secuencia diana. En ciertas realizaciones, el promotor es un

promotor inducible. En ciertas realizaciones, el vector es un vector adenoviral, lentiviral, viral adenoasociado (AAV), polioviral, HAV, o viral basado en Maloney murino. En ciertas realizaciones, la secuencia diana es una secuencia asociada con una afección susceptible a terapia con ARNip, tal como una enfermedad neurodegenerativa. Un ejemplo de enfermedades neurodegenerativas es una enfermedad por repetición de trinucleótido, tal como una enfermedad asociada con repeticiones de poliglutamina. Estas enfermedades incluyen enfermedad de Huntington y las ataxias espinocerebelosas (SCA). Ejemplos de enfermedades SCA son SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, o SCA17. La secuencia diana, en ciertas realizaciones, es una secuencia que codifica ataxina-1 o huntingtina.

La presente invención proporciona prevención de efectos citotóxicos de enfermedad neurodegenerativa en un mamífero que lo necesite, introduciendo el vector que codifica un miARN descrito en este documento en una célula en una cantidad suficiente para suprimir la acumulación de una proteína asociada con la enfermedad neurodegenerativa, y donde el ARN previene los efectos citotóxicos de la enfermedad neurodegenerativa.

La presente invención también proporciona inhibición de la expresión de una proteína asociada con una enfermedad neurodegenerativa en un mamífero que lo necesite, introduciendo el vector que codifica un miARN descrito en este documento en una célula en una cantidad suficiente para inhibir la expresión de la proteína asociada con la enfermedad neurodegenerativa, donde el ARN inhibe la expresión de la proteína asociada con la enfermedad neurodegenerativa. La proteína asociada con la enfermedad neurodegenerativa se inhibe en al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 95%, o 99%.

Esta invención se refiere a un ácido nucleico, un casete de expresión o un vector descrito en este documento útil para modular la expresión del gen de la enfermedad de Huntington (también mencionado como huntingtina, htt, o HD) usando moléculas de ácido nucleico interferente corto (ARNip). Esta invención también se refiere a compuestos, composiciones, y métodos útiles para modular la expresión y actividad de otros genes implicados en vías de la expresión y/o actividad del gen HD por interferencia de ARN (iARN) usando moléculas de ácido nucleico pequeñas. En particular, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico pequeñas, tales como moléculas de ácido nucleico interferente corto (NAip), ARN interferente corto (ARNip), ARN bicatenario (ARNbc), microARN (miARN), y ARN horquilla corto (ARNhc) y métodos usados para modular la expresión de genes HD. Una molécula de ARNip de la presente invención puede, por ejemplo, sintetizarse químicamente, expresarse a partir de un vector o sintetizarse enzimáticamente.

Como se usa en este documento, cuando una reivindicación indica un ARN "correspondiente a" se entiende que el ARN tiene la misma secuencia que el ADN, excepto que el uracilo está sustituido por timina.

En ciertas realizaciones de la presente invención, los alelos del gen diana pueden diferir en siete o menos nucleótidos (por ejemplo, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 nucleótido). Por ejemplo, los alelos pueden diferir en solamente un nucleótido. Ejemplos de transcritos génicos diana incluyen transcritos que codifican una beta-glucuronidasa, TirosinaA, Ataxina-3, Tau, o huntingtina. Los genes y productos génicos diana (es decir, un transcrito o proteína) pueden ser de diferentes especies de organismos, tales como un alelo de ratón o un alelo humano de un gen diana.

Se muestra en este documento un método para realizar el silenciamiento génico en un mamífero o célula de mamífero administrando al mamífero una molécula aislada de miARN o ARNhc, donde el miARN o ARNhc silencian solamente uno, o ambos, alelos del gen diana (por ejemplo, los alelos de tipo silvestre y mutante del gen HD) en el mamífero o célula de mamífero. En un ejemplo, el gen es un gen de beta-glucuronidasa. Los alelos pueden ser alelos específicos murinos y específicos humanos de beta-glucuronidasa. Ejemplos de transcritos génicos incluyen un transcrito de ARN complementario a TirosinaA, Ataxina-3, huntingtina o Tau. El gen diana puede ser un gen asociado con una afección susceptible a terapia con ARNip. Por ejemplo, la afección susceptible a terapia con ARNip podría ser un trastorno neurológico incapacitante.

"Enfermedad neurológica" y "trastorno neurológico" se refieren a afecciones tanto hereditarias como esporádicas que se caracterizan por disfunción del sistema nervioso, y que pueden estar asociadas con atrofia de las estructuras del sistema nervioso central o periférico afectado, o pérdida de función sin atrofia. Una enfermedad o trastorno neurológico que provoca atrofia se llama comúnmente una "enfermedad neurodegenerativa" o "trastorno neurodegenerativo". Las enfermedades y trastornos neurodegenerativos incluyen, aunque sin limitación, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), hemiplejia espástica hereditaria, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular espinal, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, y enfermedades neurodegenerativas por expansión de repeticiones, por ejemplo, enfermedades asociadas con expansiones de repeticiones de trinucleótido tales como enfermedades por repetición de poliglutamina (poliQ), por ejemplo, enfermedad de Huntington (HD), ataxia espinocerebelosa (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, y SCA17), atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA), atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana (DRPLA). Un ejemplo de un trastorno neurológico incapacitante que no parece provocar atrofia es distonía DYT1. El gen de interés puede codificar un ligando para una quimioquina implicada en la migración de una célula cancerosa, o un receptor de quimioquina.

Se describe en este documento un método para silenciar sustancialmente un gen diana de interés o alelo diana para el gen de interés para proporcionar un efecto terapéutico. Como se usa en este documento la expresión "silenciar sustancialmente" o "silenciado sustancialmente" se refiere a disminuir, reducir, o inhibir la expresión del gen diana o

alelo diana en al menos aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% a 100%. Como se usa en este documento, la expresión "efecto terapéutico" se refiere a un cambio en las anomalías asociadas de la patología, incluyendo carencias patológicas y del comportamiento; un cambio en el tiempo hasta la progresión de la patología; una reducción, disminución, o alteración de un síntoma de la enfermedad; o una mejora en la calidad de vida de la persona afectada con la enfermedad. Los efectos terapéuticos pueden medirse de forma cuantitativa por un médico o de forma cualitativa por un paciente afectado con la patología abordada por el ARNip. En ciertas realizaciones, donde tanto el alelo mutante como de tipo silvestre están sustancialmente silenciados, la expresión efecto terapéutico define una condición en que el silenciamiento de la expresión del alelo de tipo silvestre no tiene un efecto nocivo o dañino sobre las funciones normales de modo que el paciente no tendría un efecto terapéutico.

En una realización, la presente invención proporciona adicionalmente silenciamiento sustancial de ambos alelos (por ejemplo, los alelos tanto mutante como de tipo silvestre) de un gen diana. En ciertas realizaciones, abordar ambos alelos de un gen diana de interés puede conferir un efecto terapéutico permitiendo un cierto nivel de expresión continuada del alelo de tipo silvestre inhibiendo al mismo tiempo la expresión del alelo mutante (por ejemplo, asociado a enfermedad) a un nivel que proporciona un efecto terapéutico. Por ejemplo, puede conseguirse un efecto terapéutico confiriendo a la célula la capacidad de expresar ARNip como un casete de expresión, donde el casete de expresión contiene un ácido nucleico que codifica una molécula de ARN interferente pequeño (ARNip) dirigido contra ambos alelos, y donde la expresión de los alelos diana se silencia a un nivel que inhibe, reduce, o previene el aumento nocivo de función conferida por el alelo mutante, pero que aún permite la expresión adecuada del alelo de tipo silvestre a un nivel que mantiene la función del alelo de tipo silvestre. Ejemplos de dichos alelos de tipo silvestre y mutante incluyen sin limitación los asociados con enfermedades por poliglutamina tales como enfermedad de Huntington.

En una realización, la presente invención proporciona adicionalmente silenciamiento sustancial de un alelo diana permitiendo al mismo tiempo la expresión de un alelo de tipo silvestre confiriendo a la célula la capacidad de expresar ARNip como un casete de expresión, donde el casete de expresión contiene un ácido nucleico que codifica una molécula de ARN interferente pequeño (ARNip) dirigido contra un alelo diana, donde la expresión del alelo diana está sustancialmente silenciada pero donde la expresión del alelo de tipo silvestre no está sustancialmente silenciada.

En una realización, la presente invención proporciona el tratamiento de una enfermedad hereditaria dominante de un modo específico de alelo mediante la administración a un paciente que lo necesite de un casete de expresión, donde el casete de expresión contiene un ácido nucleico que codifica una molécula de ARN interferente pequeño (ARNip) dirigido contra un alelo diana, donde la expresión a partir del alelo diana está sustancialmente silenciada pero donde la expresión del alelo de tipo silvestre no está sustancialmente silenciada.

En una realización, la presente invención proporciona el tratamiento de una enfermedad hereditaria dominante mediante la administración a un paciente que lo necesite de un casete de expresión, donde el casete de expresión contiene un ácido nucleico que codifica una molécula de ARN interferente pequeño (ARNip) dirigido contra el alelo mutante y también el alelo de tipo silvestre del gen diana, donde la expresión del alelo mutante está sustancialmente silenciada a un nivel que aún permite la expresión a partir del alelo de tipo silvestre para mantener su función en el paciente.

En una realización, la presente invención proporciona la realización de silenciamiento génico en un mamífero administrando al mamífero un vector que contiene un casete de expresión, donde el casete de expresión contiene un ácido nucleico que codifica al menos una hebra de una molécula de ARN interferente pequeño (ARNip) dirigido contra un gen de interés, donde el ARNip silencia uno o ambos alelos del gen.

Se muestra en este documento un método para seleccionar dúplex de ARNip específicos de alelo, que implica poner en contacto una célula que contiene un alelo mutante predeterminado con un ARNip con una secuencia conocida, poner en contacto una célula que contiene un alelo de tipo silvestre con un ARNip con una secuencia conocida, y determinar si el alelo mutante está sustancialmente silenciado mientras que el alelo de tipo silvestre retiene una actividad sustancialmente normal.

Se muestra en este documento un método para seleccionar dúplex de ARNip específicos, que implica poner en contacto una célula que contiene tanto un alelo mutante predeterminado como un alelo de tipo silvestre predeterminado con un ARNip con una secuencia conocida, y determinar si el alelo mutante está sustancialmente silenciado a un nivel que permite que el alelo de tipo silvestre retenga una actividad sustancialmente normal.

Se muestra en este documento un método para seleccionar dúplex de ARNip específicos de alelo que implica poner en contacto una célula que contiene un alelo mutante predeterminado y un alelo de tipo silvestre con un ARNip con una secuencia conocida, y determinar si el alelo mutante está sustancialmente silenciado mientras que el alelo de tipo silvestre retiene una actividad sustancialmente normal.

Se muestra en este documento un método para determinar la función de un alelo poniendo en contacto una célula que contiene un alelo predeterminado con un ARNip con una secuencia conocida, y determinar si la función del alelo está sustancialmente modificada.

5 Se describe en este documento un método para determinar la función de un alelo poniendo en contacto una célula que contiene un alelo mutante predeterminado y un alelo de tipo silvestre con ARNip con una secuencia conocida, y determinar si la función del alelo está sustancialmente modificada mientras que el alelo de tipo silvestre retiene una función sustancialmente normal.

10 En una realización, la invención proporciona un ácido nucleico, casete de expresión o vector descrito en este documento para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Huntington en un sujeto u organismo que comprende poner en contacto al sujeto u organismo con un ARNip de la invención en condiciones adecuadas para modular la expresión del gen HD en el sujeto u organismo mediante lo cual puede conseguirse el tratamiento o prevención de la enfermedad de Huntington. En una realización, el gen HD diana comprende un alelo HD mutante (por ejemplo, un alelo que comprende una expansión de la repetición de trinucleótido (CAG)). En una realización, el gen HD diana comprende ambos alelos HD (por ejemplo, un alelo que comprende una expansión de repetición de trinucleótido (CAG) y un alelo de tipo silvestre). La molécula de ARNip de la invención puede expresarse a partir de vectores como se describe en este documento o ser conocida de otro modo en la técnica para abordar tejidos o células apropiadas en el sujeto u organismo.

20 En una realización, la invención proporciona un ácido nucleico, casete de expresión o vector descrito en este documento para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Huntington en un sujeto u organismo que comprende poner en contacto al sujeto u organismo con una molécula de ARNip de la invención mediante administración local a los tejidos o células relevantes, tales como células y tejidos cerebrales (por ejemplo, ganglios basales, cuerpo estriado, o corteza), por ejemplo, mediante administración de vectores o casetes de expresión de la invención que proporcionan moléculas de ARNip de la invención a las células relevantes (por ejemplo, ganglios basales, cuerpo estriado, o corteza). En una realización, el ARNip, vector, o casete de expresión se administra al sujeto u organismo por suministro estereotáctico o suministro potenciado por convección al cerebro. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.720.720 proporciona métodos y dispositivos útiles para el suministro estereotáctico o suministro potenciado por convección de reactivos al cerebro. Dichos métodos y dispositivos pueden usarse fácilmente para el suministro de ARNip, vectores, o casetes de expresión de la invención a un sujeto u organismo, y las solicitudes de patente de Estados Unidos N° 2002/0141980; 2002/0114780; y 2002/0187127 proporcionan todas los métodos y dispositivos útiles para el suministro estereotáctico y el suministro potenciado por convección de reactivos que pueden adaptarse fácilmente para el suministro de ARNip, vectores, o casetes de expresión de la invención a un sujeto u organismo. Los dispositivos particulares que pueden ser útiles en el suministro de ARNip, vectores, o casetes de expresión de la invención a un sujeto u organismo se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 2004/0162255, que se incorpora por referencia en este documento en su totalidad. La molécula de ARNip de la invención puede expresarse a partir de vectores como se describe en este documento o ser conocida de otro modo en la técnica para abordar tejidos o células apropiadas en el sujeto u organismo.

40 Los métodos de suministro de vectores virales incluyen, aunque sin limitación, las vías intraarterial, intramuscular, intravenosa, intranasal y oral. Generalmente, pueden introducirse viriones AAV en células del SNC usando técnicas de transducción *in vivo* o *in vitro*. Si se transducen *in vitro*, la célula destinataria deseada se retirará del sujeto, se transducirá con los viriones AAV y se reintroducirá en el sujeto. Como alternativa, pueden usarse células singénicas o xenogénicas donde esas células no generarán una respuesta inmune inapropiada en el sujeto.

50 Se han descritos métodos adecuados para el suministro e introducción de células transducidas en un sujeto. Por ejemplo, las células pueden transducirse *in vitro* mediante la combinación de viriones AAV recombinantes con células del SNC, por ejemplo, en medios apropiados, y selección de aquellas células que albergan el ADN de interés que pueden explorarse usando técnicas convencionales tales como transferencias de Southern y/o PCR, o usando marcadores de selección. Las células transducidas después pueden formularse en composiciones farmacéuticas, descritas más completamente a continuación, y la composición puede introducirse en el sujeto por diversas técnicas, tales como por injerto, inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea e intraperitoneal.

55 En una realización, para suministro *in vivo*, los viriones AAV se formulan en composiciones farmacéuticas y generalmente se administrarán por vía parenteral, por ejemplo, por inyección intramuscular directamente en el músculo esquelético o cardíaco o por inyección en el SNC.

60 En una realización, los vectores virales de la invención se suministran al SNC mediante sistemas de suministro potenciados por convección (CED) que pueden suministrar de forma eficaz los vectores virales, por ejemplo, AAV, sobre grandes regiones del cerebro de un sujeto (por ejemplo, cuerpo estriado y/o corteza). Como se describe en detalle y se ejemplifica a continuación, estos métodos son adecuados para una diversidad de vectores virales, por ejemplo vectores AAV que portan genes terapéuticos (por ejemplo, ARNip).

65 Cualquier dispositivo de suministro potenciado por convección puede ser apropiado para el suministro de vectores virales. En una realización, el dispositivo es una bomba osmótica o una bomba de infusión. Tanto las bombas

osmóticas como de infusión están disponibles en el mercado en una diversidad de proveedores, por ejemplo, Alzet Corporation, Hamilton Corporation, Aiza, Inc., Palo Alto, Calif.). Típicamente, un vector viral se suministra mediante dispositivos CED del siguiente modo. Se inserta un catéter, cánula u otro dispositivo de inyección en el tejido del SNC en el sujeto elegido. En vista de los contenidos de este documento, un especialista en la técnica podría determinar fácilmente el área general del SNC que es una diana apropiada. Por ejemplo, cuando se suministra un vector AAV que codifica un gen terapéutico para tratar HD, el cuerpo estriado es un área adecuada del cerebro a abordar. Están disponibles mapas estereotácticos y dispositivos de posicionamiento, por ejemplo, en ASI Instruments, Warren, Mich. El posicionamiento también puede realizarse usando mapas anatómicos obtenidos por TC y/o imágenes IRM del cerebro del sujeto para ayudar a guiar el dispositivo de inyección hasta la diana elegida. Además, como los métodos descritos en este documento pueden ponerse en práctica de modo que áreas relativamente grandes del cerebro capten los vectores virales, se necesitan menos cánulas de infusión. Como hay complicaciones quirúrgicas relacionadas con la cantidad de penetraciones, los métodos descritos en este documento también sirven para reducir los efectos secundarios observados con técnicas convencionales de suministro.

En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenderán suficiente material genético para producir una cantidad terapéuticamente eficaz del ARNip de interés, es decir, una cantidad suficiente para reducir o mejorar los síntomas de la patología en cuestión o una cantidad suficiente para conferir el beneficio deseado. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos excipientes incluyen cualquier agente farmacéutico que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición, y que pueden administrarse sin toxicidad excesiva. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque sin limitación, sorbitol, Tween80, y líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden incluirse en los mismos, por ejemplo, sales ácidas minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos, y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y similares. Adicionalmente, pueden estar presentes en dichos vehículos sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH, y similares. Está disponible un análisis minucioso de los excipientes farmacéuticamente aceptables en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Como es evidente para los especialistas en la técnica en vista de los contenidos de esta memoria descriptiva, una cantidad eficaz de vector viral que debe añadirse puede determinarse empíricamente. La administración puede realizarse en una dosis, de forma continua o intermitente durante el curso del tratamiento. Los métodos para determinar el medio y dosificaciones más eficaces de administración son bien conocidos para los especialistas en la técnica y variarán con el vector viral, la composición de la terapia, las células diana, y el sujeto que se esté tratando. Pueden realizarse administraciones únicas y múltiples seleccionándose el nivel y patrón de dosis por el médico que esté tratando.

Debe entenderse que podría expresarse más de un transgén por el vector viral suministrado. Como alternativa, también pueden suministrarse vectores diferentes, expresando, cada uno, uno o más transgenes diferentes, al SNC como se describe en este documento. Además, también se entiende que los vectores virales suministrados por los métodos de la presente invención pueden combinarse con otras composiciones y terapias adecuadas.

La presente invención proporciona adicionalmente un miARN o ARNhc, un casete de expresión y/o un vector como se describe en este documento para su uso en tratamiento y diagnóstico médico.

La presente invención proporciona el uso de un miARN o ARNhc, un casete de expresión y/o un vector como se describe en este documento para preparar un medicamento útil para tratar una afección susceptible a iARN en un animal, por ejemplo, útil para tratar la enfermedad de Huntington.

La presente invención también proporciona un ácido nucleico, casete de expresión, vector, o composición de la invención para su uso en terapia.

La presente invención también proporciona un ácido nucleico, casete de expresión, vector, o composición de la invención para el tratamiento, por ejemplo, para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico, de una enfermedad neurodegenerativa.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa secuencias que contienen mir-30 humano modificado específicas para varios genes de interés. Mir-30 (SEC ID N° 1), miSCA1 (SEC ID N° 2), shSCA1 (SEC ID N° 3), miJNK (SEC ID N° 4), y miHTT (SEC ID N° 5).

Figura 2. Se clonó el gen diana (en este caso Ataxina-1, también llamado SCA1), y también se generó el miARN de SCA1.

Figura 3. Se generaron construcciones diana de iARN artificiales en ambas direcciones.

Figuras 4A-4C. Una preferencia de hebra dispar contradice comparaciones de ARNhc y miARN artificiales. (Fig. 4A) Transferencia de northern de transcrito pequeño realizada a las 48 h después de transfección de plásmidos de expresión de iARN HD2.1 en células HEK293 muestra producción mejorada de ARN antisentido procesado

(AS) a partir de las variantes 1 y 2 de miARN artificial dirigido por CMV (miV1, miV2) respecto al shHD2.1 de primera generación dirigido por U6. Pre- indica el tronco-bucle precursor. (Fig. 4B) Análisis de Q-PCR para niveles endógenos de ARNm de HD realizado 48 h después de la transfección de plásmidos de expresión de iARN HD2.1 en células HEK293. Los resultados se normalizaron a los niveles de ARNm de GAPDH y se muestran como la media \pm D.T.M. respecto a muestras tratadas de forma simulada ($n = 3$, $* = P < 0,05$). (Fig. 4C) La preferencia de hebra de vectores de iARN HD2.1 dirigidos por U6. La preferencia de hebra se evaluó midiendo la actividad luciferasa a partir de indicadores que contenían secuencias diana con sentido (pretendido; se une a antisentido de iARN) o antisentido (no pretendido; se une a con sentido de iARN) en la 3'UTR (Fig. 18C). Se co-transfectaron plásmidos indicadores de iARN y de expresión de iARN en células HEK293, y se realizaron ensayos de luciferasa Dual-Glo® a las 24 h. Los resultados se muestran como la media \pm D.T.M. ($n = 4$) respecto a controles tratados de forma simulada y demuestran que shHD2.1 carga de forma preferente la hebra de ARNip no pretendida mientras que miHD2.1 carga de forma más frecuente la hebra pretendida.

Figura 5. Diseño de moléculas de ARNhc de segunda generación.

Figuras 6A-6C. A. Se generaron variantes de ARNhc para evaluar los efectos de modificaciones 5' o 3'. B. Se observó procesamiento por transferencia de northern de transcrito pequeño 48 h después de transfección de plásmidos de expresión de ARNhc. C. Silenciamiento de diana de luciferasa artificial co-transfectada 24 h después de la transfección.

Figuras 7A-7B. A. Transferencia de northern de transcrito pequeño realizada 48 h después de transfección de iARN de eGFP en células 293. Sonda: oligonucleótido con sentido de eGFP. B. iARN de eGFP frente a diana(6:1) siChk2-eGFP. Se realizó ensayo de luciferasa Dual-Glo® 24 h después de transfección de plásmidos de iARN:diana en células 293. Se muestra respecto a iARN simulado.

Figura 8. Comparación de moléculas de ARNhc de 2ª generación y moléculas de miARN.

Figuras 9A y 9B. Resultados de estudios sobre la seguridad de vectores de iARN. La Fig. 9A muestra un Estudio de Seguridad con Adiciones, y la Fig. 9B muestra un estudio de silenciamiento génico.

Figuras 10A-10D. A. La diferenciación de células C2C12 induce miR-1 y expresión de MHC. B. Vector usado para comparar estrategias de iARN. C. Se co-transfectaron iARN e indicador de luciferasa siCheck2 miR-1 en células C2C12 que después se diferenciaron durante 72 h y se realizó ensayo de luciferasa dual. Los resultados se muestran respecto al siCheck2 en solitario. D. Se transfectaron plásmidos de iARN y las células se diferenciaron durante 72 h. Las células tratadas con ARNhc mostraron viabilidad celular disminuida observada por fluorescencia y se cuantificó por ensayo MTS.

Figura 11. Seguridad *in vivo* de vectores de iARN en músculo. Se co-electroporaron plásmidos de miIndicador y GFP:U6.iARN (ARNhc:izquierda o miARN:derecha) en el tibialis anterior de los animales. Se examinaron las imágenes IVIS para luciferasa de Luciérnaga o Renilla y GFP.

Figuras 12A-12B. A. Se electroporaron miIndicadores siCheck2 (que contenían un sitio diana de miARN perfecto localizado en la 3'UTR de luciferasa de Luciérnaga) en el músculo tibialis anterior. Se realizaron imágenes IVIS 48 h después para medir la cantidad de actividad luciferasa de Luciérnaga. Los resultados confirman el uso de miIndicadores *in vivo*. Se usó el indicador miR-1 siCheck2 en posteriores experimentos. B. Se co-electroporaron plásmidos de expresión indicadores de pGFP:U6.iARN y siCheck2 miR-1 a dosis variables (Lo = 1 μ g de iARN:1 μ g de miIndicador y Hi = 10 μ g de iARN:1 μ g de miIndicador) en el músculo tibialis anterior. Se suministraron ARNhc en la pata izquierda y los miARN en la pata derecha. Se realizaron imágenes IVIS en diversos momentos puntuales para medir la actividad luciferasa de Luciérnaga.

Figuras 13A-13B. Se realizó Q-PCR para HD de ratón (Fig. 13A) y CD11b (Fig. 13B). También se prepararon transferencia de northern para iARN. Los resultados de Q-PCR se normalizaron a los niveles de mARN de GAPDH y se muestran respecto al cuerpo estriado no inyectado. La expresión de alto nivel a partir del ARNhc probablemente explica la toxicidad observada.

Figura 14. Estrategia de clonación lanzadera de miARN.

Figura 15. Generación de moléculas de miARN (el miARN ejemplar a la izquierda de la figura es la SEC ID N° 6).

Figura 16. En esta figura se representan secuencias de vector. Los sitios de inicio de la transcripción están en negrita y subrayados. Las enzimas de restricción usadas en el proceso de clonación están indicadas. Las secuencias subrayadas con "oligos" representan la parte de hibridación. Las estructuras predichas de miARN y ARNhc se basan en análisis mFOLD. Las flechas indican los sitios de escisión principales Drosha (izquierda) y Dicer (derecha).

Figura 17. Estructura básica de miARN de mi-Variante 2. **Secuencia flanqueante 5'** (texto en negrita), *secuencia de ARNip* (cursiva), Bucle (texto normal), y **secuencia flanqueante 3'** (negrita cursiva).

Figuras 18A-18E. Optimización de la lanzadera miR-30 humana. (Fig. 18A) Estructuras generales de ARNhc y miARN artificiales (Ns corresponde a la región dúplex de ARNip siendo con sentido y antisentido 5' y 3' respectivamente). Aquí, las secuencias antisentido se diseñan para abordar los transcritos de SCA1, HD o GFP. Las almohadillas indican los sitios de escisión conocidos principales de Drosha y Dicer de miR-30 humano. Los sitios de procesamiento de muchos ARNhc son desconocidos y varían en base a la presencia de secuencias flanqueantes cortas. *, la secuencia recuadrada es con fines de orientación en el panel. (Fig. 18B) Se generaron variantes de miARN artificiales alterando las secuencias flanqueantes adyacentes, y se muestran partes de las estructuras mFOLD predichas dentro de la base de tronco. La inestabilidad (es decir, naturaleza monocatenaria) dentro de la región sombreada en gris promueve la unión y escisión de Drosha. Estas variantes contienen secuencias y estructuras idénticas de iARN en regiones por encima del recuadro sombreado en gris. (Fig. 18C) Dibujo que representa indicadores de iARN, generados por inserción de secuencias diana en la 3' UTR de luciferasa de Renilla. Los plásmidos indicadores también contienen un casete de expresión de luciferasa de

Luciérnaga para la normalización. (Fig. 18D) Actividad de silenciamiento de variantes de miR-30. Se co-transfectaron variantes artificiales de miSCA1 y plásmidos de expresión indicadores de iARN en células HEK293, y se realizaron ensayos de luciferasa Dual-Glo® después de 24 h. Se muestran los resultados de dos experimentos independientes (cada uno $n = 3$) respecto a controles tratados de forma simulada (es decir, promotor solamente) y demuestran que la variante 2 (miV2) es el miARN artificial más eficaz (incluso más eficaz que miR-30 humano, $* = P < 0,01$). (Fig. 18E) Se realizó transferencia de northern de transcrito pequeño a las 48 h después de la transfección de plásmidos de expresión de variante de miARN en células HEK293. Los resultados muestran que miV2 produce ARN antisentido más maduro (SCA1 AS) en comparación con las otras variantes de miARN artificiales incluyendo la lanzadera miR-30 natural.

La Figura 19 proporciona secuencias adicionales de miARN que se usaron para abordar HD o SCA1. Estas son las estructuras de tronco-bucle de ARN predichas que contienen las secuencias de iARN activas. La hebra antisentido activa de la secuencia de ARNip incluida está subrayada.

Las Figuras 20A-20F proporcionan una ilustración de lanzaderas de miARN de la presente invención. La Fig. 20A representa un transcrito primario de miARN (pri-miARN) con los segmentos mostrados en configuración 5' a 3'. Las Fig. 20B y 20C representan en detalle adicional regiones flanqueantes 5' alternativas con los segmentos mostrados en configuración 5' a 3' (región gris claro con texto en cursiva mostrado en la Fig. 20A se amplía en las Fig. 20B y 20C). Las Fig. 20D y 20E representan en detalle adicional regiones flanqueantes 3' alternativas con los segmentos mostrados en configuración 5' a 3' (región gris oscuro con texto en negrita mostrado en la Fig. 20A está ampliada en las Fig. 20D y 20E). La Fig. 20F proporciona una molécula de miARN artificial ejemplar.

Figuras 21A-21D. La eficacia de procesamiento y silenciamiento de ARNhc es dependiente de saliente. (Fig. 21A) Diagramas que representan los diversos salientes 5' y 3' ensayados en troncos-bucles de ARNhc idénticos. (Fig. 21B) Se transfectaron plásmidos que expresan las variantes de ARNhc en células HEK293, y se realizó transferencia de northern de transcrito pequeño [que son secuencias antisentido (AS) o con sentido (S)] con análisis de densitometría (valores debajo de las manchas) 48 h después para evaluar la eficacia de procesamiento de ARNhc ($n = 3$). Los resultados muestran que variantes del saliente 5' producen menos ARN precursores (Pre-) y antisentido (AS) en comparación con los ARNhc optimizados con salientes 3' U₂₋₄ derivados de la terminación de transcripción Pol-III. Se observó carga de hebra apropiada para cada variante de ARNhc (es decir, AS:Pre- \rightarrow S:Pre-). (Fig.21C y Fig.21D). Se evaluó el silenciamiento de hebras diana pretendidas (gráfico de barras de la izquierda Fig. 21C) o no pretendidas (gráfico de barras de la derecha Fig. 21D) por co-transfección de plásmidos de expresión de la variante de ARNhc y de indicador de luciferasa de iARN en células HEK293, y se realizaron ensayos de luciferasa Dual Glo® a las 24 h. Los resultados se muestran como la D.T. de la media ($n = 3$) respecto a controles tratados de forma simulada y confirman que salientes sub-óptimos disminuyen la eficacia de silenciamiento. De forma notable, cada ARNhc silencia de forma preferente la diana pretendida (transfectada a 1:20 de iARN:Diana) respecto a la diana no pretendida (transfectada a 3:1 de iARN:Diana).

Figuras 22A-22B. Diseño de ARNhc y horquillas de miARN artificial comparables. Diagrama que representa el diseño de horquillas para un esquema de comparación equitativo. Se muestran los sitios de escisión relevantes mapeados por 3'-RACE (Fig. 27). Se diseñaron vectores que contenían ARNip que abordan transcritos de SCA1, GFP o HD (Ns). Las secuencias de tronco y bucle están conservadas. El "*" en la Fig. 22A indica que el miARN correspondiente se modificó para justificar las necesidades de ARNhc. La transcripción del promotor mU6 empieza en G (indicado por una flecha en la Fig. 22B) y termina dejando un saliente 3'-U₂₋₄ (la Fig. 22B muestra 3'-U₂), que es óptimo para el reconocimiento por la maquinaria de iARN cadena abajo. Los sitios de corte de Dicer están indicados con barras oscuras cerca de las regiones de bucle, y el sitio de corte de Drosha está indicado por barras más claras en la Fig. 22A.

Figuras 23A-23C. Vectores comparables basados en ARNhc y miARN muestran desvío de hebra apropiado. (Fig. 23A-C) Desvío de hebra de vectores de iARN para SCA1, GFP, y HD respectivamente. El desvío de hebra se evaluó usando indicadores de luciferasa que contenían secuencias diana con sentido (pretendidas) o antisentido (no pretendidas). Se co-transfectaron plásmidos de expresión de indicador de luciferasa de iARN y de iARN en células HEK293, y se realizaron ensayos de luciferasa Dual Glo® a las 24 h. Se muestran resultados de experimentos duplicados (cada uno $n = 3$) como la media \pm D.T.M. respecto a controles tratados de forma simulada y demuestran que los vectores de miARN artificial y ARNhc muestran desvío de hebra apropiado.

Figuras 24A-24E. Los ARNhc son más potentes que los miARN artificiales *in vitro*. (Fig. 24A) Se co-transfectaron plásmidos de iARN e indicadores de luciferasa de iARN en células HEK293 para evaluar el silenciamiento génico. Se realizaron ensayos de luciferasa Dual Glo® a las 24 h y los resultados, mostrados como media \pm D.T.M. respecto a controles tratados de forma simulada, se compilaron a partir de varios experimentos (4 GFP, 4 SCA1 y 2 HD; cada uno $n = 3$). La dosis se indica como iARN:Diana. $P < 0,001$ y $P < 0,05$ para dosis 1:1 y 3:2 respectivamente. (Fig. 24B, 24C) Se transfectaron plásmidos que expresan iARN que aborda SCA1 o HD endógeno en células HEK293, y se realizó análisis de Q-PCR a las 48 h para medir la reducción de transcritos endógenos. Los niveles de ARNm de SCA1 y HD se normalizaron a GAPDH o ARNr 18S y se muestran como la media \pm D.T.M. ($n \geq 2:3$, $* = P < 0,05$, $*** = P < 0,001$) respecto a controles tratados de forma simulada. (Fig. 24D) Se co-transfectaron plásmidos de expresión de iARN de GFP y de eGFP en células HEK293, y se evaluaron los niveles de fluorescencia 48 h después. Los resultados se muestran como la media \pm D.T.M. ($n = 4$, $* * = P < 0,01$) respecto a controles tratados con iARN de SCA1. (Fig. 24E) Se transfectaron plásmidos de expresión de ARNip y miARN artificial en células HEK293, y se realizó transferencia de northern de transcrito pequeño a las 48 h para evaluar la expresión y procesamiento de iARN (Pre- = precursor, AS = ARN antisentido). Los resultados muestran que los ARNhc producen más de 4 veces ARN antisentido maduro, respecto a los

miARN artificiales, independiente de la secuencia diana de iARN. Estos resultados son coherentes entre transferencias triplicadas para cada par de vectores de iARN.

Figuras 25A-25B. Los ARNhc son más potentes que los miARN artificiales *in vivo*. Se comparó la eficacia de silenciamiento génico *in vivo* por co-electroporación de plásmidos de iARN de SCA1 e indicadores de luciferasa de iARN en músculos tibialis anterior de ratones de 6-8 semanas de edad. Las dosis baja y elevada son proporciones de 1:1 y 10:1 (iARN:Diana) respectivamente. Se midió la actividad luciferasa de *Renilla in vivo* usando imágenes de bioluminiscencia después de 8 días. Se muestran imágenes representativas de "mapa indicador" (Fig. 25A) junto con análisis cuantitativo (Fig. 25B) representado como la media \pm D.T.M. ($n = 4$; $P < 0,05$ dentro de cada dosis). También se observaron tendencias de silenciamiento similares a los 4 días después del tratamiento (datos no mostrados).

Figuras 26A-26B. (Fig. 26A) Se transfectaron vectores de miARN artificiales dirigidos por CMV o U6 que abordan SCA1 en células HEK293, y se realizó transferencia de northern de transcrito pequeño a las 48 h para evaluar la expresión y procesamiento de iARN (AS = ARNip antisentido). (Fig. 26B) Se co-transfectaron plásmidos de iARN e indicadores de luciferasa de iARN en células HEK293 para evaluar el silenciamiento génico. Se realizaron ensayos de luciferasa Dual Glo® a las 24 h y los resultados, mostrados como la media \pm D.T.M. respecto a controles tratados de forma simulada, se compilaron de varios experimentos (3 SCA1, 3 GFP; cada uno $n = 3$). La dosis se indica como iARN:Diana y $P < 0,01$ dentro de cada dosis.

Figura 27. Mapeo de sitios de escisión para vectores correspondientes de ARNhc y miARN artificial. Se transfectaron células HEK293 con plásmidos de expresión de shSCA1 o miSCA1 y se realizó 3'-RACE sobre el ARN recogido 48 h después para identificar los extremos 3' de los ARN pequeños de SCA1 antisentido (AS) o con sentido (S) derivados de estos vectores. Para cada vector, se muestran 10-12 secuencias analizadas por hebra. De forma notable, cada secuencia representada está presente en muestras tratadas tanto con shSCA1 como con miSCA1, y se compartieron las especies más prevalentes (recuadro gris sombreado). Los nucleótidos en letra minúscula indican bases que eran ambiguas debido al uso de un cebador oligo-dT anclado durante la síntesis de ADNc de primera hebra. La Fig. 27 incluye las SEC ID N° 84-135.

Figura 28. Estrategia de clonación de miARN artificial. Se diseñaron oligonucleótidos solapantes de ADN para generar un tronco-bucle básico de miR-30 que contenía secuencias con sentido y antisentido de ARNip junto con los elementos necesarios dentro del tronco-base que se sabe que dirige la escisión eficaz por Drosha. Los oligonucleótidos se hibridan y prolongan con ADN polimerasa para generar el ADNbc que codifica el miARN artificial flanqueado por sitios para enzimas de restricción. Este casete se digiere y clona para vectores de expresión que proporcionan secuencias flanqueantes adicionales que pueden influir en la eficacia de procesamiento. "Term." se refiere al terminador de transcripción (por ejemplo, señal poliA o 6T para promotores CMV y U6 (mostrados como flecha) respectivamente).

Figura 29. Comparación de un ARNhc ejemplar (SEC ID N° 136) y miARN (SEC ID N° 137) que producen una molécula equivalente de ARNip (SEC ID N° 138-139).

Figuras 30A-30E. La Fig. 30A muestra que shSCA1 disminuye significativamente la función de miGFP. La Fig. 30B muestra que miSCA1 mostraba eficacia de silenciamiento similar como una dosis baja de shSCA1 cuando aborda el indicador de luciferasa de iARN de SCA1. Las Fig. 30C, 30D muestran experimentos recíprocos donde se evaluó el efecto de competidores de iARN de GFP (shGFP o miGFP) sobre la actividad de miSCA1 en paralelo con la eficacia de iARN de GFP. La Fig. 30E muestra que la biogénesis de miGFP estaba gravemente alterada en presencia de vectores de expresión de shSCA1 a dosis bajas y altas.

Figuras 31A-31E. Las Fig. 31A, 31B, muestran la medición de la actividad de un indicador de luciferasa para la función miR-1 en células C2C12 no diferenciadas y diferenciadas. La Fig. 31C muestra mediciones de la elongación de células C2C12 diferenciadas después de transfección con plásmidos de expresión de ARNhc o miARN artificial que co-expresan hrGFP dirigido por CMV. La Fig. 31D muestra las longitudes relativas de células MHC+GFP+. La Fig. 31E muestra que el proceso de elongación se reducía significativamente en células C2C12 transfectadas con plásmidos que expresan shSCA1, pero no aquellos que expresaban miSCA1.

Figura 32. Se evaluó la supervivencia de células C2C12 transfectadas con iARN controlando la co-expresión de hrGFP por microscopía de fluorescencia en el tiempo.

Figura 33. Esta figura muestra la generación de AAV serotipo 2/1 que expresa shSCA1 o miSCA1 dirigido por U6.

Figura 34. ARNhc que abordan secuencias a través del gen de huntingtina. Las secuencias de ARNhc se nombran para el exón abordado. Por ejemplo, sh1:10 aborda el exón 1, y era el 10° ARNhc diseñado. Los números intermedios (por ejemplo, sh1.5) abordan secuencias entre 1.4 y 1.8, pero eran específicos para secuencias humanas solamente. La funcionalidad se determinó por QPCR y dot blot de proteínas realizado 48 h después de la transfección en células HEK293. Se eligieron tres secuencias principales (***negrita cursiva***) para análisis *in vivo* en ratones CAG140 Knock in en base al silenciamiento génico coherente y diferencial en selecciones de cultivo celular. Se identificó sh2.1 durante una selección previa y demostró ser eficaz en un modelo de ratón de HD. Aborda solamente huntingtina humana.

Figuras 35A-35C. Selección *in vitro* de ARNhc que abordan transcritos de HD humana y HDh de ratón. (Fig. 35A) se generaron treinta y cinco ARNhc (barras encima del dibujo) que abordan secuencias conservadas (Fig. 34) que abarcan los ARNm de enfermedad de Huntington (HD) y el homólogo de enfermedad de Huntington en ratón (HDh) con consideración por las secuencias que promueven la carga apropiada de las hebras antisentido en el RISC. Se transfectaron plásmidos que expresan ARNhc dirigidos por U6 en células HEK293 y se evaluó el silenciamiento génico de HD por QPCR y análisis dot blot de proteínas 48 h después de la transfección. (Fig. 35B) Se eligieron tres ARNhc candidatos que abordan secuencias en los exones 2 (sh2.4, SEC ID N° 17), 8

(sh8.2, SEC ID N° 176) y 30 (sh30.1, SEC ID N° 177) para estudio adicional. (Fig. 35C) Se transfectaron plásmidos de expresión de ARNhc en células C2C12 de ratón, y se evaluaron los niveles endógenos de proteína huntingtina por análisis de transferencia de western 48 h después de la transfección. Los controles discordantes (mis) contienen cambios de 4 pares de bases que vuelven a los ARNhc ineficaces. La beta-catenina sirve como control de carga.

Figuras 36A-36D. Los ARNhc de HD causan toxicidad del cuerpo estriado específica de secuencia en ratones. La Fig. 36A es un diagrama de los vectores virales AAV2/1 recombinantes que contienen casetes de expresión de ARNhc y hrGFP. La Fig. 36B muestra fotomicrografías que representan la distribución rostral-a-caudal de células hrGFP positivas en cerebro de ratón después de inyección directa del virus en el cuerpo estriado. Barra de escala = 500 μ m. (36C) El análisis de QPCR que mide los niveles de ARNm de HDh en cuerpo estriado de ratón tratado con ARNhc muestra eficacia de silenciamiento similares entre sh2.4, sh8.2 y sh30.1. Se inyectó a los ratones en el cuerpo estriado con AAVsh2.4-GFP, AAVsh8.2-GFP, AAVsh30.1-GFP o AAV-GFP y se recogió el ARN 4 meses después. La inmunohistoquímica reveló que sh2.4 y sh30.1 inducen toxicidad en el cuerpo estriado, y se realizaron análisis histológicos sobre cerebros recogidos a los 4 meses después del tratamiento. Se muestran fotomicrografías representativas para tinción inmunohistoquímica de neuronas DARPP-32-positivas (*panel superior*, barra de escala = 500 μ m) y microglía Ibal-positiva (*panel inferior*, barra de escala = 100 μ m) para cada grupo de tratamiento.

Figura 37. Las células GFP positivas se co-localizan con neuronas en el cuerpo estriado. Tinción inmunofluorescente de células GFP positivas (autofluorescencia) en todo el cuerpo estriado co-marcado con RIP (*panel superior*, marcador de oligodendrocitos), GFAP (*panel central*, marcador de astrocitos) o NeuN (*panel inferior*, marcador neuronal). Barra de escala = 20 μ m para cada fotomicrografía.

Figuras 38A-38B. El sh8.2 no tóxico genera niveles inferiores de ARN antisentido procesado. (Fig. 38A) Se realizó transferencia de northern de transcrito pequeño para evaluar los niveles de ARN antisentido presentes en el cuerpo estriado de ratón tratado con el AAVARNhc-GFP indicado. Carriles de la izquierda: 2 muestras tisulares de cuerpo estriado tratadas por separado. Carriles centrales y de la derecha: controles positivos cargados como patrones [diluciones de factor 10 para las hebras con sentido (centro) o antisentido (derecha)]. (Fig. 38B) Se usó análisis de densitometría para cuantificar los niveles relativos de ARN antisentido (AS) de HD. Las señales se cuantificaron usando el software Image J y la expresión se muestra como femtomoles/microgramo de ARN total.

Figuras 39A-39D. Los miARN artificiales mitigan la toxicidad en el cuerpo estriado en ratones. Se realizaron análisis de QPCR para medir los niveles de ARNm de HDh de ratón (Fig. 39A) y CD11b (Fig. 39B) en cuerpo estriado inyectado con AAV-iARN recogido 4 meses después del tratamiento (NS = no significativo). Los resultados, mostrados respecto a cuerpo estriado no inyectado, demuestran que mi2.4 silencia transcritos de HD de forma tan eficaz como sh2.4, pero evita la inducción de CD11b, un marcador para la activación microglial. (Fig. 39C) El análisis de transferencia de northern de transcrito pequeño para ARN antisentido (AS) de HD2.4 maduro presente en lisados de cuerpo estriado tratado con AAV-iARN revela una sólida disparidad entre los niveles generados a partir de vectores sh2.4 y mi2.4. Se muestra tinción con bromuro de etidio (EtBr) como control de carga. (Fig. 39D) Los análisis histológicos demuestran el perfil de seguridad mejorado de mi2.4. Se inyectó a los ratones los virus AAV-iARN-GFP indicados en el cuerpo estriado y se realizaron análisis histológicos sobre cerebros recogidos a los 4 meses después del tratamiento. Se muestran fotomicrografías que representan hrGFP (*panel superior*) y tinción inmunohistoquímica de neuronas DARPP-32-positivas (*panel central*) y microglía Ibal-positiva (*panel inferior*) para cada grupo de tratamiento. Barra de escala = 500 μ m.

Figuras 40A-40C. Los miARN artificiales reducen de forma natural los ARN inhibidores precursores y maduros. (40A) Secuencias y comparación de sh2.4 y mi2.4 que contiene la secuencia HD2.4 central (recuadros sombreados). Cada transcrito empieza con el nucleótido +1-G natural para el promotor U6. Los sitios de escisión principales de Drosha y Dicer se muestran por almohadillas. (40B) Se transfectaron células HEK293 con plásmidos de expresión de iARN HD2.4 en las cantidades indicadas, y se realizó transferencia de northern de transcrito pequeño 48 h después. Los resultados demuestran que sh2.4 genera niveles abundantes de ARN antisentido precursor no procesado (Pre-) y procesado (2.4AS), incluso a una dosis 10 veces inferior, respecto a la tinción con bromuro de etidio (EtBr) de mi2.4 como control de carga. (40C) Se transfectaron plásmidos de expresión de iARN HD2.4 en células HEK293, y se realizó análisis de QPCR 48 h después para medir los niveles endógenos de ARNm de HD. Los resultados demuestran que mi2.4 silencia transcritos de HD de forma eficaz, respecto a sh2.4, a pesar de expresarse a niveles considerablemente inferiores.

Figura 41. Activación aumentada de microglía en ratones tratados con AAVsh2.4-GFP. Inmunohistoquímica para el marcador de microglía, Iba1, realizada sobre secciones tisulares del cuerpo estriado de ratones a los que se ha inyectado AAVsh2.4-GFP (*panel inferior*), AAVmi2.4-GFP (*panel central*) o AAVmi2.4mis-GFP (*panel superior*). Se muestran tanto el hemisferio inyectado con AAV (*panel derecho*) como el no inyectado (*panel izquierdo*). Barra de escala = 100 μ m para cada fotomicrografía.

Figuras 42A-42B. Direccionamiento a huntingtina mutante. La Figura 42A proporciona una representación esquemática del gen de huntingtina (*htt*). Las secuencias intrónicas son las bandas más claras, y las secuencias exónicas son las segundas bandas más claras. La secuencia CAG expandida (banda oscura) está localizada en el primer exón del gen *Htt*. La Figura 42B proporciona ARNip que recorre 5' y 3'. Se generaron secuencias de ARN interferente corto (ARNip) que aborda 5' y 3' de la región de repeticiones CAG para abordar de forma preferente el alelo mutante de huntingtina.

Figuras 43A-43B. Construcciones para evaluar el silenciamiento específico de alelo. Se generaron dos plásmidos que expresan huntingtina de tipo silvestre de longitud completa (Fig. 43A, pCMV-FLHtt 18Q-Flag) o huntingtina mutante (Fig. 43B, pCMV-FLHtt 83Q-V5).

5 Las Figuras 44A-44C muestran transferencias de Western y resultados de QPCR para secuencias candidatas de ARNip. La Fig. 44A muestra Htt de tipo silvestre y la Fig. 44B muestra Htt mutante. Como se observa en la Fig. 44C, la secuencia de ARNip número 7 (S7) redujo htt mutante en un 44% y la huntingtina de tipo silvestre en un 6%.

10 La Figura 45 muestra los resultados de lanzaderas de miARN para silenciamiento específico de alelo de htt. Los datos representan el análisis de densitometría de la expresión de Htt de tipo silvestre y mutante para diferentes lisados proteicos.

Figuras 46A-46B. Respuesta de dosis de la secuencia de mi7A1. La Fig. 46A muestra Htt normal, y la Fig. 46B muestra Htt mutante.

15 Figura 47. Desvío de hebra de lanzaderas de miR. Los datos representan expresión relativa de luciferasa de las construcciones indicadoras para cada hebra específica después de transfección con lanzadera de mi7. Todos los datos están comparados con células transfectadas con cada construcción indicadora y un control de miARN (miGFP).

Descripción detallada de la invención

20 La interferencia de ARN (iARN) proporciona un enfoque prometedor para el tratamiento de varias enfermedades humanas. Sin embargo, la seguridad de terapias basadas en iARN basado en vector expresado sigue siendo una preocupación. Las preocupaciones de seguridad para terapias de iARN expresado en vector surgen como resultado de toxicidad desviada de su diana.

25 El uso de iARN como un terapéutico depende de la dilucidación de varios factores incluyendo i) el suministro y persistencia de la construcción de iARN para silenciamiento eficaz de la secuencia génica diana; ii) el diseño del ARNip para conseguir silenciamiento eficaz o supresión génica de la secuencia diana, y iii) el sistema de expresión óptimo de ARNip (ARNhc o miARN) para el suministro del ARNip terapéutico. Aunque muchos estudios han evaluado el uso de iARN suministrado como estructuras oligonucleotídicas sintetizadas de forma química, para
30 muchas condiciones clínicas y patologías tales como enfermedad de Huntington, se cree que para conseguir un efecto terapéutico existe la necesidad de alto nivel de expresión a largo plazo y/o persistente del ARNip terapéutico conseguido por producción endógena de ARNip expresado. Hasta la fecha, se han comparado las estrategias basadas en ARNhc y miARN artificial con resultados contradictorios (Boden et al., 2004, Nucleic Acids Res 32: 1154-1158; Silva et al., 2005, Nat Genet 37: 1281-1288; Li et.al., 2007, RNA 13: 1765-1774). La utilidad terapéutica de
35 iARN expresado está sin resolver debido a las cuestiones de seguridad como resultado de la toxicidad desviada de su diana que surge de las respuestas celulares contra ARNhc (IFN-b, PKR, OAS1), saturación de la maquinaria de iARN o silenciamiento de dianas desviadas mediante complementariedad parcial con ARNm no pretendidos. Por tanto, existe una necesidad continua de optimizar vectores de iARN expresado que sean seguros y eficaces.

40 Los ARNhc están compuestos por estructuras de tronco-bucle que se diseñan para contener una región flanqueante 5', segmentos de región de ARNip, una región de bucle, una región de ARNip 3' y una región flanqueante 3'. La mayoría de las estrategias de expresión de iARN han utilizado ARN de horquilla cortos (ARNhc) dirigidos por promotores fuertes basados en polIII. Muchos ARNhc han demostrado silenciamiento eficaz de las secuencias diana *in vitro* así como *in vivo*, sin embargo algunos ARNhc que demostraron silenciamiento eficaz del gen diana también
45 se descubrió que tenían toxicidad *in vivo*. Un enfoque alternativo recientemente descubierto es el uso de miARN artificiales (estructuras de pri-miARN que lanzan secuencias de ARNip) como vectores de iARN. Los miARN artificiales se parecen de forma más natural a sustratos de iARN endógenos y son más susceptibles a transcripción por Pol-II (por ejemplo, permitiendo expresión específica de tejido de iARN) y estrategias policistrónicas (por ejemplo, permitiendo el suministro de múltiples secuencias de ARNip). Hasta la fecha, la eficacia de los sistemas de vector basados en miARN en comparación con ARNhc se han contradicho por resultados contradictorios. De forma
50 importante, no se ha evaluado la cuestión de la toxicidad desviada de su diana producida por los dos sistemas.

Una consideración importante para el desarrollo de ARNip expresado es el concepto de "dosificación" de la célula hospedadora con la construcción expresada de ARNip. "Dosificación" para un ARNip expresado en el contexto de la
55 presente invención se refiere a y puede depender del vehículo de suministro (por ejemplo, viral o no viral), las cantidades relativas o concentración del vehículo de suministro, y la potencia y especificidad del promotor utilizado para dirigir la expresión de la secuencia de ARNip. En la presente solicitud los inventores han comparado de forma directa la eficacia y toxicidad desviada de su diana de los vectores expresados de iARN en condiciones donde se suministraron los ARNhc y miARN a dosis equivalentes por un vector AAV.

60 Los inventores han desarrollado vectores lanzadera de miARN artificiales que incorporan las secuencias de tronco-bucle contenidas en los ARNhc dentro de modificaciones de una secuencia de microARN 30 humano de origen natural o secuencia mi30 que sirve para lanzar estas secuencias de ARN interferente pequeño (ARNip). A diferencia de los informes previamente publicados, estas lanzaderas de miARN se compararon posteriormente con
65 construcciones optimizadas de ARNhc. Las construcciones de ARNhc se optimizaron para que contuvieran secuencias con el par de bases más débil cerca del extremo 5' de la hebra antisentido o guía en comparación con la

hebra con sentido o no guía para permitir un procesamiento eficaz y carga de la hebra antisentido en el complejo de silenciamiento inducido por iARN (RISC). Estos ARNip optimizados después se compararon con los vectores lanzadera de miARN artificial que contenían las secuencias diana idénticas. Los inventores descubrieron que los ARNhc optimizados, independientemente de la secuencia de ARNip y la secuencia diana, generan ARNip más procesados y son más eficaces en la mediación del silenciamiento génico. Sin embargo, el análisis de transferencia de northern mostró una sobreabundancia de ARNhc no procesados así como moléculas de ARN antisentido maduras, mientras que el procesamiento de las lanzaderas de miARN era altamente eficaz. Los inventores hipotizaron que los ARNhc no procesados pueden surgir debido a la saturación de la maquinaria de iARN y pueden provocar cuestiones adicionales de seguridad debido a la toxicidad desviada de su diana. Además, aunque ciertos ARNhc demostraron ser silenciadores génicos potentes como resultado de la sobreabundancia o sobreexpresión de ARNhc, también fueron demasiado tóxicos cuando se suministraban *in vivo* a cerebros. Un enfoque para reducir la toxicidad evaluada por los inventores fue disminuir la dosis del ARNhc suministrado disminuyendo el título viral inyectado, disminuyendo de ese modo el número de copias del ARNip en la célula transducida, que provoca una expresión inferior del ARNip. Sin embargo, disminuir la dosis en término de título viral no redujo la toxicidad desviada de su diana en el cerebro hasta que la dosis se disminuyó a niveles que no fueron eficaces en el silenciamiento génico de la diana.

Los inventores evaluaron si la generación de miARN artificiales reduciría la toxicidad desviada de su diana, mejorando de ese modo la seguridad relativa del ARNip como terapéutico potencial. Los inventores evaluaron la toxicidad desviada de su diana de ARNhc y vectores de miARN sobre el procesamiento y función de miARN artificiales diseñados para imitar troncos-bucles endógenos. El análisis de transferencia de northern mostró que los ARNhc inhibían de forma marcada el procesamiento de miARN artificiales, mientras que las lanzaderas de miARN tenían relativamente ningún efecto incluso a dosis mucho mayores. Asimismo, los ARNhc a dosis bajas redujeron drásticamente el silenciamiento mediado por miARN artificiales, mientras que las lanzaderas de miARN a dosis altas solamente causaron una ligera inhibición. De forma notable, las eficacias de silenciamiento de las lanzaderas de miARN (dosis alta) y ARNhc (dosis baja) fueron indistinguibles. Estos resultados sugieren que los vectores basados en ARNhc saturan la maquinaria celular de iARN sustancialmente más que las lanzaderas de miARN. Sorprendentemente, las secuencias que se descubrió que tenían toxicidad desviada de su diana *in vivo* en el contexto de un vector de ARNhc, cuando se colocaba en el vector de miARN artificial de la presente invención, mostraba toxicidad atenuada desviada de su diana aunque retenía un silenciamiento eficaz del gen diana. Por tanto, el vector lanzadera de miARN de la presente invención proporciona un enfoque más seguro para suministrar iARN terapéutico *in vivo*.

Lanzaderas de microARN para iARN

Los miARN son ARN celulares pequeños (~22nt) que se procesan a partir de transcritos de tronco-bucle precursores. Los tronco-bucles de miARN conocidos pueden modificarse para contener secuencias de iARN específicas para genes de interés. Las moléculas de miARN pueden ser preferibles sobre moléculas de ARNhc porque los miARN se expresan de forma endógena. Por lo tanto, las moléculas de miARN probablemente no inducen las vías de interferón sensibles a ARNbc, se procesan de forma más eficaz que los ARNhc, y han demostrado un silenciamiento un 80% más eficaz.

Además, las tareas del promotor son diferentes para moléculas de miARN en comparación con moléculas de ARNhc. La expresión inducible específica de tejido de los ARNhc implica el truncamiento de promotores polII en el sitio de inicio de la transcripción. En contraste, los miARN pueden expresarse a partir de cualquier promotor polII porque los sitios de inicio y parada de la transcripción pueden ser relativamente arbitrarios.

Tratamiento de enfermedades

Las enfermedades de expansión de poliglutamina dominantes, que incluyen ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1) y enfermedad de Huntington (HD), son trastornos neurodegenerativos progresivos no tratables. En modelo de ratón inducibles de SCA1 y HD, la represión de la expresión del alelo mutante mejora los fenotipos de enfermedad. Por tanto, serían beneficiosas terapias diseñadas para inhibir la expresión del gen de enfermedad. En estudios presentados en este documento, se evaluó la capacidad de la interferencia de ARN (iARN) para inhibir la neurodegeneración inducida por poliglutamina causada por ataxina-1 mutante en un modelo de ratón de SCA1. Tras la inyección intracerebelosa, los vectores AAV recombinantes que expresan ARNhc mejoraron profundamente la coordinación motora, restauraron la morfología cerebelar, y resolvieron las inclusiones características de ataxina-1 en células de Purkinje de ratones SCA1. La presente invención por tanto proporciona métodos para usar iARN *in vivo* para tratar enfermedades neurodegenerativas dominantes. "Tratar" como se usa en este documento se refiere a mejorar al menos un síntoma de, curar y/o prevenir el desarrollo de una enfermedad o una afección.

En cierta realización de la invención, los ARNip se emplean para inhibir la expresión de un gen diana. Por "inhibir la expresión" se entiende reducir, disminuir o suprimir la expresión de un gen diana. La expresión de un gen diana puede inhibirse mediante "silenciamiento génico". El silenciamiento génico se refiere a la supresión de la expresión génica, por ejemplo, expresión de transgén, gen heterólogo y/o gen endógeno, que puede mediarse a través de procesos que afectan a la transcripción y/o a través de procesos que afectan a los mecanismos post-

transcripcionales. En algunas realizaciones, el silenciamiento génico sucede cuando el ARNip inicia la degradación del ARNm transcrito a partir de un gen de interés de un modo específico de secuencia mediante interferencia de ARN, evitando de ese modo la traducción del producto génico.

5 Se entiende que referencias a ARNip en este documento incluyen ARNhc y otros ARN pequeños que pueden o son capaces de modular la expresión de un gen diana, por ejemplo, el gen HD, por ejemplo mediante interferencia de ARN. Dichos ARN pequeños incluyen sin limitación, ARNhc y microARN (miARN).

10 Se describe en este documento una estrategia que provoca silenciamiento sustancial de alelos diana mediante ARNip. El uso de esta estrategia provoca una expresión marcadamente disminuida *in vitro* e *in vivo* de alelos diana. Esta estrategia es útil para reducir la expresión de alelos diana para modelar los procesos biológicos o para proporcionar terapia para enfermedades humanas. Por ejemplo, esta estrategia puede aplicarse a una clase principal de trastornos neurodegenerativos, las enfermedades por poliglutamina, como se demuestra por la reducción de la agregación de poliglutamina en células después de la aplicación de la estrategia. Como se usa en este documento, la expresión "silenciamiento sustancial" significa que el ARNm del alelo diana se inhibe y/o degrada por la presencia del ARNip introducido, de modo que se reduzca la expresión del alelo diana en aproximadamente un 10% a un 100% en comparación con el nivel de expresión observado cuando no está presente el ARNip. Generalmente, cuando un alelo se silencia sustancialmente, tendrá al menos un 40%, 50%, 60%, hasta 70%, por ejemplo, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, hasta 79%, generalmente al menos 80%, por ejemplo, 81%-84%, al menos 85%, por ejemplo, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o incluso 100% de reducción de la expresión en comparación a cuando no está presente el ARNip. Como se usa en este documento, la expresión "actividad sustancialmente normal" significa el nivel de expresión de un alelo cuando no se ha introducido un ARNip en una célula.

25 Las enfermedades hereditarias dominantes, incluyendo trastornos neurodegenerativos por poliQ, son candidatos ideales para terapia basada en ARNip. Los trastornos neurodegenerativos por poliQ incluyen al menos nueve trastornos hereditarios causados por expansiones de repeticiones CAG que codifican poliQ en la proteína de enfermedad. La expansión de poliQ confiere una propiedad tóxica dominante en la proteína mutante que está asociada con acumulación aberrante de la proteína de enfermedad en neuronas. Las enfermedades por poliQ son trastornos progresivos, finalmente mortales que típicamente comienzan en la madurez. La enfermedad de Huntington (HD) es la enfermedad por poliQ mejor conocida, pero al menos siete ataxias hereditarias y una enfermedad de neuronas motoras también se deben a expansión de repeticiones CAG/poliQ. Aunque las características clínicas y patrones de la degeneración neurológica difieren entre las enfermedades, evidencias crecientes sugieren que las enfermedades por poliQ comparten importantes características patogénicas. En particular, la expansión de la repetición CAG/dominio poliQ confiere a la proteína codificada una propiedad tóxica dominante. Por tanto, como estrategia terapéutica, esfuerzos por disminuir la expresión del producto génico mutante antes de la muerte celular podría ser altamente beneficioso para los pacientes.

40 Los trastornos neurodegenerativos por poliQ incluyen al menos nueve enfermedades causadas por expansiones de la repetición CAG que codifica poliQ en la proteína de enfermedad. La expansión de poliQ confiere una propiedad tóxica dominante en la proteína mutante que está asociada con acumulación aberrante de la proteína de enfermedad en neuronas. En FTDP-17, mutaciones de Tau conducen a la formación de ovillos neurofibrilares acompañada por disfunción y degeneración neuronal. Los mecanismos precisos por los cuales estas proteínas mutantes causan lesión neuronal son desconocidos, pero evidencias considerables sugieren que las proteínas anormales en sí mismas inician el proceso patogénico. Por consiguiente, la eliminación de la expresión de la proteína mutante por ARNip u otro medio ralentiza o previene la enfermedad. Sin embargo, como muchos genes dominantes de enfermedad también codifican proteínas esenciales, se desarrollaron enfoques mediados por ARNip que inactivan de forma selectiva los alelos mutantes, permitiendo al mismo tiempo una expresión continuada de las proteínas de tipo silvestre ataxina-3 y huntingtina.

50 I. Moléculas de interferencia de ARN (iARN)

Una molécula de "interferencia de ARN", "iARN", "ARN interferente pequeño" o "ARN interferente corto" o "ARNip" o "ARN de horquilla corta" o "ARNhc", "miARN" es un dúplex de ARN de nucleótidos que está dirigido a una secuencia de ácido nucleico de interés, por ejemplo, ataxina-1 o huntingtina (htt). Como se usa en este documento, el término "ARNip" es un término genérico que abarca el subconjunto de ARNhc y miARN. Un "dúplex de ARN" se refiere a la estructura formada por el apareamiento complementario entre dos regiones de una molécula de ARN. El ARNip está "dirigido" a un gen porque la secuencia de nucleótidos de la parte dúplex del ARNip es complementaria a una secuencia de nucleótidos del gen diana. En ciertas realizaciones, los ARNip están dirigidos a la secuencia que codifica ataxina-1 o huntingtina. En algunas realizaciones, la longitud del dúplex de los ARNip es de menos de 30 pares de bases. En algunas realizaciones, el dúplex puede ser de 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 ó 10 pares de bases de longitud. En algunas realizaciones, la longitud del dúplex es de 19 a 25 pares de bases de longitud. En cierta realización, la longitud del dúplex es de 19 ó 21 pares de bases de longitud. La parte dúplex de ARN del ARNip puede ser parte de una estructura de horquilla. Además de la parte de dúplex, la estructura de horquilla puede contener una parte de bucle posicionada entre las dos secuencias que forman el dúplex. El bucle puede variar de longitud. En algunas realizaciones, el bucle es de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, el bucle es de 18

nucleótidos de longitud. La estructura de horquilla también puede contener partes de saliente 3' y/o 5'. En algunas realizaciones, el saliente es un saliente 3' y/o 5' de 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 nucleótidos de longitud.

La unidad transcripcional de un "ARNhc" está compuesta por secuencias con sentido y antisentido conectadas por un bucle de nucleótidos no apareados. Los ARNhc se exportan desde el núcleo por exportina-5, y una vez en el citoplasma, se procesan por Dicer para generar ARNip funcionales. Los troncos-bucles de "miARN" están compuestos por secuencias con sentido y antisentido conectados por un bucle de nucleótidos no apareados típicamente expresados como parte de transcritos primarios más grandes (pri-ARNm), que se escinden por el complejo Drosha-DGCR8 que genera intermedios conocidos como pre-miARN, que posteriormente se exportan desde el núcleo por exportina-5, y una vez en el citoplasmas, se procesan por Dicer para generar ARNip funcionales. "miARN artificial" o un "vector lanzadera de miARN artificial", como se usa en este documento de forma intercambiable, se refiere a un transcrito de miARN primario que ha mantenido una región del tronco-bucle dúplex (al menos aproximadamente 9-20 nucleótidos) que se escinde mediante procesamiento con Drosha y Dicer reemplazada con la secuencia de ARNip para el gen diana reteniendo al mismo tiempo los elementos estructurales dentro del tronco-bucle necesarios para el procesamiento eficaz por Drosha. El término "artificial" surge del hecho de que las secuencias flanqueantes (~35 nucleótidos cadena arriba y ~40 nucleótidos cadena abajo) surgen de sitios de enzimas de restricción dentro del sitio de clonación múltiple del ARNip. Como se usa en este documento, el término "miARN" abarca secuencias de miARN de origen natural así como vectores lanzadera de miARN generados de forma artificial.

El ARNip puede codificarse por una secuencia de ácido nucleico, y la secuencia de ácido nucleico también puede incluir un promotor. La secuencia de ácido nucleico también puede incluir una señal de poliadenilación. En algunas realizaciones, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación mínima sintética o una secuencia de seis T.

"Toxicidad desviada de su diana" se refiere a cambios fenotípicos perjudiciales, indeseables, o no pretendidos de una célula hospedadora que expresa o contiene un ARNip. La toxicidad desviada de su diana puede provocar pérdida de función deseable, ganancia de función no deseable, o incluso muerte a nivel celular u orgánico. La toxicidad desviada de su diana puede suceder inmediatamente tras la expresión del ARNip o puede suceder de forma gradual en el tiempo. La toxicidad desviada de su diana puede suceder como un resultado directo de la expresión de ARNip o puede suceder como resultado de la inducción de la respuesta inmune del hospedador contra la célula que expresa el ARNip. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, se postula que la toxicidad desviada de su diana surge de altos niveles o sobreabundancia de sustratos de iARN dentro de la célula. Estos sustratos de iARN sobreabundantes sobreexpresados, incluyendo aunque sin limitación sustratos de iARN pre- o pri- así como ARN antisentido maduro sobreabundantes, pueden competir por la maquinaria endógena de iARN, alterando de este modo la biogénesis y función del miARN natural. La toxicidad desviada de su diana también puede surgir de una probabilidad aumentada de silenciamiento de ARNm no pretendido (es decir, desviados de su diana) debido a complementariedad parcial de la secuencia. La toxicidad desviada de su diana también puede suceder por una preferencia inapropiada de hebra de una región no de guía de modo que se cargue de forma preferente la región no de guía sobre la región diana o de guía del iARN. La toxicidad desviada de su diana también puede surgir de la estimulación de respuestas celulares contra ARNbc que incluyen ARNbc (IFN-b, PKR, OAS 1). "Toxicidad desviada de su diana disminuida" se refiere a una disminución, reducción, supresión o atenuación en la toxicidad desviada de su diana de modo que el efecto terapéutico sea más beneficioso para el hospedador que la toxicidad limitante o perjudicial medida por una duración mejorada o calidad de vida o un signo o síntoma mejorado de una enfermedad o afección que se está abordando por el ARNip. "Toxicidad desviada de su diana limitada" o "toxicidad desviada de su diana baja" se usa para hacer referencia a cambios fenotípicos indeseables no pretendidos en una célula u organismos, sean detectables o no, que no impidan o sobrepasen o limiten el beneficio terapéutico del hospedador tratado con el ARNip y puede considerarse un "efecto secundario" de la terapia. La toxicidad desviada de su diana disminuida o limitada puede determinarse o inferirse por comparación del análisis *in vitro* tal como transferencia de Northern o QPCR para los niveles de sustratos de ARNip o los efectos *in vivo* comparando un vector de ARNhc equivalente con el vector lanzadera de miARN de la presente invención.

"Knock-down", "tecnología knock-down" se refiere a una técnica de silenciamiento génico en que se reduce la expresión de un gen diana en comparación con la expresión génica antes de la introducción del ARNip, que puede conducir a la inhibición de la producción del producto génico diana. El término "reducido" se usa en este documento para indicar que la expresión del gen diana está disminuida en un 1-100%. En otras palabras, la cantidad de ARN disponible para su traducción en un polipéptido o proteína está minimizada. Por ejemplo, la cantidad de proteína puede reducirse en un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, o 99%. En algunas realizaciones, la expresión se reduce en aproximadamente un 90% (es decir, solamente aproximadamente un 10% de la cantidad de proteína se observa en la célula en comparación con una célula donde no se han administrado moléculas de ARNip). El silenciamiento de la expresión génica puede dirigirse mediante el uso de ARNbc o ARNip.

"Interferencia de ARN (iARN)" es el proceso de silenciamiento génico post-transcripcional específico de secuencia iniciado por ARNip. Durante la iARN, el ARNip induce la degradación del ARNm diana con una consecuente inhibición específica de secuencia de la expresión génica.

- De acuerdo con un uso de la presente invención, la expresión de huntingtina o ataxina puede modificarse mediante iARN. Por ejemplo, puede suprimirse la acumulación de huntingtina o ataxina-1 en una célula. El término "suprimir" se refiere a la disminución, reducción o eliminación en el número o cantidad de transcritos presentes en una célula particular. Por ejemplo, la acumulación del ARNm que codifica a huntingtina o ataxina-1 puede suprimirse en una
- 5 célula por interferencia de ARN (iARN), por ejemplo, el gen se silencia por ARN bicatenario específico de secuencia (ARNbc), que también se llama ARN interferente corto (ARNip). Estos ARNip pueden ser dos moléculas diferentes de ARN que han hibridado juntas, o pueden ser una única horquilla donde dos partes de una molécula de ARN han hibridado juntas para formar un dúplex.
- 10 Una proteína mutante se refiere a la proteína codificada por un gen que tiene una mutación, por ejemplo, una mutación con cambio de sentido o sin sentido en uno o ambos alelos de huntingtina o ataxina-1. Una huntingtina o ataxina-1 mutante puede ser causante de enfermedad, es decir, puede conducir a una enfermedad asociada con la presencia de huntingtina o ataxina-1 en un animal que tiene uno o dos alelos mutantes.
- 15 El término "gen" se usa ampliamente para hacer referencia a cualquier segmento de ácido nucleico asociado con una función biológica. Por tanto, los genes incluyen secuencias codificantes y/o las secuencias reguladoras necesarias para su expresión. Por ejemplo, "gen" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa ARNm, ARN funcional, o proteína específica, incluyendo secuencias reguladoras. "Genes" también incluye segmentos no expresados de ADN que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Los "genes"
- 20 pueden obtenerse de una diversidad de fuentes, incluyendo clonación de una fuente de interés o síntesis a partir de información de secuencia conocida o predicha, y pueden incluir secuencias diseñadas para tener parámetros deseados. Un "alelo" es una de varias formas alternativas de un gen que ocupa un locus dado en un cromosoma.
- La expresión "ácido nucleico" se refiere a ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) y polímeros de
- 25 los mismos en forma mono o bicatenaria, compuesto por monómeros (nucleótidos) que contienen un azúcar, fosfato y una base que es una purina o pirimidina. Salvo que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y se metabolizan de un modo similar a los nucleótidos de origen natural. Salvo que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca variantes modificadas de forma
- 30 conservativa de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada de forma explícita. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados pueden conseguirse generando secuencias en que la tercera posición de uno o más (o todos) de los codones seleccionados se sustituye con restos de base mixta y/o desoxiinosina. Un "fragmento de ácido nucleico" es una parte de una molécula de ácido nucleico dada.
- 35 Una "secuencia de nucleótidos" es un polímero de ADN o ARN que puede ser monocatenario o bicatenario, que contiene opcionalmente bases nucleotídicas sintéticas, no naturales o alteradas con capacidad de incorporación en polímeros de ADN o ARN.
- 40 Las expresiones "ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico", "fragmento de ácido nucleico", "secuencia o segmento de ácido nucleico", o "polinucleótido" se usan de forma intercambiable y también pueden usarse de forma intercambiable con gen, ADNc, ADN y ARN codificado por un gen.
- La invención abarca moléculas aisladas y sustancialmente purificadas de ácido nucleico y composiciones que
- 45 contienen estas moléculas. En el contexto de la presente invención, una molécula de ADN o molécula de ARN "aislada" o "purificada" es una molécula de ADN o molécula de ARN que existe separada de su entorno nativo y por lo tanto no es un producto de la naturaleza. Una molécula de ADN o molécula de ARN aislada puede existir en una forma purificada o puede existir en un entorno no nativo tal como, por ejemplo, una célula hospedadora transgénica. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico o parte biológicamente activa de la misma "aislada" o "purificada", está
- 50 sustancialmente libre de otro material celular, o medio cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetiza químicamente. En una realización, un ácido nucleico "aislado" está libre de secuencias que flanquean de forma natural el ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del cual se obtiene el ácido nucleico. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la molécula de ácido nucleico aislada puede
- 55 contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, o 0,1 kb de secuencias nucleotídicas que flanquean de forma natural la molécula de ácido nucleico en ADN genómico de la célula de la cual se obtiene el ácido nucleico. Los fragmentos y variantes de las secuencias de nucleótidos descritas también están abarcados por la presente invención. Por "fragmento" o "parte" se entiende la longitud completa o menos de la longitud completa de la secuencia de nucleótidos.
- 60 "De origen natural", "nativo", o "de tipo silvestre" se usa para describir un objeto que puede encontrarse en la naturaleza distinto del que se produce de forma artificial. Por ejemplo, una proteína o secuencia de nucleótidos presente en un organismo (incluyendo un virus), que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado de forma intencionada por un especialista en el laboratorio, es de origen natural.
- 65

Una "variante" de una molécula es una secuencia que es sustancialmente similar a la secuencia de la molécula nativa. Para secuencias de nucleótidos, las variantes incluyen aquellas secuencias que, a causa de la degeneración del código genético, codifican la secuencia de aminoácidos idéntica de la proteína nativa. Las variantes alélicas de origen natural tales como estas pueden identificarse con el uso de técnicas de biología molecular como, por ejemplo, con reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación. Las secuencias variantes de nucleótidos también incluyen secuencias de nucleótidos derivadas de forma sintética, tales como las generadas, por ejemplo, mediante el uso de mutagénesis dirigida al sitio, que codifican la proteína nativa, así como aquellas que codifican un polipéptido que tiene sustituciones de aminoácidos. Generalmente, las variantes de secuencia de nucleótidos de la invención tendrán al menos un 40%, 50%, 60%, hasta 70%, por ejemplo, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, al 79%, generalmente al menos un 80%, por ejemplo, 81%-84%, al menos un 85%, por ejemplo, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, hasta 98%, de identidad de secuencia con la secuencia nativa de nucleótidos (endógena).

El término "quimérico" se refiere a un gen o ADN que contiene 1) secuencias de ADN, incluyendo secuencias reguladoras y codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza o 2) secuencias codificantes de partes de proteínas no unidas de forma natural, o 3) partes de promotores que no están contiguas de forma natural. Por consiguiente, un gen quimérico puede incluir secuencias reguladoras y secuencias codificantes que se obtienen de diferentes fuentes, o incluir secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de un modo diferente del encontrado en la naturaleza.

Un "transgén", se refiere a un gen que se ha introducido en el genoma por transformación. Los transgenes incluyen, por ejemplo, ADN que es heterólogo u homólogo al ADN de una célula particular a transformar. Adicionalmente, los transgenes pueden incluir genes nativos insertados en un organismo no nativo, o genes quiméricos.

La expresión "gen endógeno" se refiere a un gen nativo en su localización natural en el genoma de un organismo.

Un gen "foráneo" se refiere a un gen no encontrado de forma normal en el organismo hospedador que se ha introducido por transferencia génica.

Los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido" se usan de forma intercambiable en este documento.

"Variaciones modificadas de forma conservativa" de una secuencia de ácido nucleico particular se refiere a aquellas secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias idénticas o esencialmente idénticas de aminoácidos. A causa de la degeneración del código genético, una cantidad mayor de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier polipéptido dado. Por ejemplo, los codones CGT, CGC, CGA, CGG, AGA y AGG codifican todos el aminoácido arginina. Por tanto, en cualquier posición donde se especifica una arginina por un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar la proteína codificada. Dichas variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de "variaciones modificadas de forma conservativa". Cada secuencia de ácido nucleico descrita en este documento que codifica un polipéptido también describe cualquier posible variación silenciosa, excepto donde se indique otra cosa. Un especialista en la técnica reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto ATG, que es habitualmente el único codón para metionina) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica por técnicas convencionales. Por consiguiente, cada "variación silenciosa" de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

"Molécula de ADN recombinante" es una combinación de secuencias de ADN que se unen juntas usando tecnología de ADN recombinante y procedimientos usados para unir secuencias de ADN juntas como se describe, por ejemplo, en Sambrook y Russell (2001).

Las expresiones "gen heterólogo", "secuencia heteróloga de ADN", "secuencia exógena de ADN", "secuencias heteróloga de ARN", "secuencia exógena de ARN" o "ácido nucleico heterólogo" se refieren cada una a una secuencia que se origina de una fuente foránea a la célula hospedadora particular, o es de la misma fuente pero está modificada de su forma original o nativa. Por tanto, un gen heterólogo en una célula hospedadora incluye un gen que es endógeno a la célula hospedadora particular pero se ha modificado a través, por ejemplo, del uso de barajado de ADN. Las expresiones también incluyen múltiples copias de origen no natural de una secuencia de ADN o ARN de origen natural. Por tanto, los términos se refieren a un segmento de ADN o ARN que es foráneo o heterólogo a la célula, u homólogo a la célula pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedadora en que el elemento no se encuentra habitualmente. Los segmentos exógenos de ADN se expresan para producir polipéptidos exógenos.

Una secuencia de ADN o ARN "homóloga" es una secuencia que está asociada de forma natural con una célula hospedadora en que se ha introducido.

"Tipo silvestre" se refiere al gen u organismo normal encontrado en la naturaleza.

"Genoma" se refiere al material genético completo de un organismo.

Un "vector" se define incluyendo, *inter alia*, cualquier vector viral, así como cualquier vector plasmídico, cósmido, fágico o binario en forma lineal bi o monocatenaria o circular que pueda ser autotransmisible o móvil o no, y que puede transformar hospedadores procariotas o eucariotas por integración en el genoma celular o existir de forma extracromosómica (por ejemplo, plásmido de replicación autónoma con un origen de replicación).

"Casete de expresión" como se usa en este documento significa una secuencia de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de una secuencia particular de nucleótidos en una célula hospedadora apropiada, que puede incluir un promotor unido de forma funcional a la secuencia de nucleótidos de interés que puede estar unida de forma funcional a señales de terminación. La región codificante habitualmente codifica un ARN funcional de interés, por ejemplo, un ARNip. El casete de expresión que incluye la secuencia de nucleótidos de interés puede ser quimérico. El casete de expresión también puede ser uno que exista de forma natural pero se haya obtenido de una forma recombinante útil para expresión heteróloga. La expresión de la secuencia de nucleótidos en el casete de expresión puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor regulable que inicie la transcripción solamente cuando la célula hospedadora se expone a algún estímulo particular. En el caso de un organismo multicelular, el promotor también puede ser específico para un tejido u órgano particular o fase de desarrollo.

Dichos casetes de expresión pueden incluir una región de inicio de la transcripción ligada a una secuencia de nucleótidos de interés. Dicho casete de expresión se proporciona con una pluralidad de sitios de restricción para que la inserción del gen de interés esté bajo el control de la regulación transcripcional de las regiones reguladoras. El casete de expresión puede contener adicionalmente genes marcadores de selección.

"Secuencia codificante" se refiere a una secuencia de ADN o ARN que codifica una secuencia específica de aminoácidos. Puede constituir una "secuencia codificante no interrumpida", es decir, que carece de un intrón, tal como en un ADNc, o puede incluir uno o más intrones unidos por juntas apropiadas de corte y ajuste. Un "intrón" es una secuencia de ARN que está contenida en el transcrito primario pero se elimina a través de escisión y religamiento del ARN dentro de la célula para crear el ARNm madura que puede traducirse en una proteína.

La expresión "fase de lectura abierta" (ORF) se refiere a una secuencia entre los codones de inicio y terminación de la traducción de una secuencia codificante. Las expresiones "codón de inicio" y "codón de terminación" se refieren a una unidad de tres nucleótidos adyacentes (un "codón") en una secuencia codificante que especifica el inicio y terminación de cadena, respectivamente, de la síntesis proteica (traducción de ARNm).

"ARN funcional" se refiere a ARN con sentido, ARN antisentido, ARN ribozima, ARNip, u otro ARN que puede no traducirse pero aún tiene un efecto sobre al menos un proceso celular.

La expresión "transcrito de ARN" o "transcrito" se refiere al producto resultante de la transcripción catalizada por ARN polimerasa de una secuencia de ADN. Cuando el transcrito de ARN es una copia complementaria perfecta de la secuencia de ADN, se menciona como transcrito primario o puede ser una secuencia de ARN derivada del procesamiento post-transcripcional del transcrito primario y se menciona como ARN maduro. "ARN mensajero" (ARNm) se refiere al ARN que es sin intrones y que puede traducirse en proteína por la célula.

"ADNc" se refiere a un ADN mono o bicatenario que es complementario a y derivado del ARNm.

"Secuencias reguladoras" son secuencias de nucleótidos localizadas cadena arriba (secuencias no codificantes 5'), dentro, o cadena abajo (secuencias no codificantes 3') de una secuencia codificante, y que influyen en la transcripción, el procesamiento de o estabilidad del ARN, o traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras incluyen potenciadores, promotores, secuencias líder de traducción, intrones, y secuencias de señal de poliadenilación. Incluyen secuencias naturales y sintéticas así como secuencias que pueden ser una combinación de secuencias sintéticas y naturales. Como se indica en este documento, la expresión "secuencias reguladoras adecuadas" no se limita a promotores. Sin embargo, algunas secuencias reguladoras adecuadas útiles en la presente invención incluirán, aunque sin limitación, promotores constitutivos, promotores específicos de tejido, promotores específicos del desarrollo, promotores regulables y promotores virales.

"Secuencia no codificante 5'" se refiere a una secuencia de nucleótidos localizada 5' (cadena arriba) a la secuencia codificante. Está presente en el ARNm completamente procesado cadena arriba del codón de inicio y puede afectar el procesamiento del transcrito primario en ARNm, la estabilidad o eficacia de traducción del ARNm.

"Secuencia no codificante 3'" se refiere a secuencias de nucleótidos localizadas 3' (cadena abajo) a una secuencia codificante y puede incluir secuencias de señal de poliadenilación y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar al procesamiento del ARNm o expresión génica. La señal de poliadenilación habitualmente se caracteriza por afectar a la adición de tramos de ácido poliadenílico en el extremo 3' del precursor de ARNm.

La expresión "secuencia líder de traducción" se refiere a esa parte de secuencia de ADN de un gen entre el promotor y la secuencia codificante que se transcribe en ARN y está presente en el ARNm procesado

completamente cadena arriba (5') del codón de inicio de la traducción. La secuencia líder de traducción puede afectar al procesamiento del transcrito primario en ARNm, la estabilidad o eficacia de traducción del ARNm.

5 El término proteína "madura" se refiere a un polipéptido procesado de forma post-traduccional sin su péptido señal. Proteína "precursora" se refiere al producto primario de traducción de un ARNm. "Péptido señal" se refiere a la extensión aminoterminal de un polipéptido, que se traduce junto con el polipéptido que forma un péptido precursor y que es necesario para su entrada en la vía de secreción. La expresión "secuencia señal" se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal.

10 "Promotor" se refiere a una secuencia de nucleótidos, habitualmente cadena arriba (5') a su secuencia codificante, que dirige y/o controla la expresión de la secuencia codificante proporcionando el reconocimiento por la ARN polimerasa y otros factores necesarios para la transcripción apropiada. "Promotor" incluye un promotor mínimo que es una corta secuencia de ADN compuesta por una caja TATA y otras secuencias que sirven para especificar el sitio de inicio de la transcripción, al cual se añaden elementos reguladores para el control de la expresión. "Promotor" también se refiere a una secuencia de nucleótidos que incluye un promotor mínimo más elementos reguladores que es capaz de controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. Este tipo de secuencia promotora consiste en elementos cadena arriba proximales y más distales, mencionándose a menudo los últimos elementos como potenciadores. Por consiguiente, un "potenciador" es una secuencia de ADN que puede estimular la actividad promotora y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para potenciar el nivel o especificidad tisular de un promotor. Es capaz de funcionar en ambas orientaciones (normal o invertida), y es capaz de funcionar incluso cuando se mueve cadena arriba o cadena abajo del promotor. Tanto los potenciadores como otros elementos promotores cadena arriba se unen a proteínas de unión a ADN específicas de secuencia que median sus efectos. Los promotores pueden derivarse en su totalidad de un gen nativo, o estar compuestos por diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso pueden estar compuestos por segmentos de ADN sintético. Un promotor también puede contener secuencias de ADN que están implicadas en la unión de factores proteicos que controlan la eficacia del inicio de la transcripción en respuesta a condiciones fisiológicas o del desarrollo. Ejemplos de promotores que pueden usarse en la presente invención incluyen los promotores de ARN U6 de ratón, los promotores ARN1H humanos sintéticos, promotores de ARN polimerasa II y ARN polimerasa III de SV40, CMV, RSV.

20 El "sitio de inicio" es la posición que rodea el primer nucleótido que es parte de la secuencia transcrita, que también se define como posición +1. Todas las demás secuencias del gen y sus regiones de control están numeradas con respecto a este sitio. Las secuencias cadena abajo (es decir, secuencias codificantes proteicas adicionales en la dirección 3') se denominan positivas, mientras que las secuencias cadena arriba (principalmente las regiones de control en la dirección 5') se denominan negativas.

35 Los elementos promotores, particularmente un elemento TATA, que son inactivos o que tienen actividad promotora enormemente reducida en ausencia de activación cadena arriba se mencionan como "promotores mínimos o centrales". En presencia de un factor adecuado de transcripción, el promotor mínimo funciona permitiendo la transcripción. Un "promotor mínimo o central" por tanto consiste en solamente todos los elementos básicos necesarios para el inicio de la transcripción, por ejemplo, una caja TATA y/o un iniciador.

40 "Expresión constitutiva" se refiere a la expresión usando un promotor constitutivo o regulado. "Expresión Condicional" y "regulada" se refiere a la expresión controlada por un promotor regulado.

45 "Unido de forma funcional" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un único fragmento de ácido nucleico de modo que la función de una de las secuencias esté afectada por otras. Por ejemplo, una secuencia reguladora de ADN se dice que está "unida de forma funcional a" o "asociada con" una secuencia de ADN que codifica un ARN o un polipéptido si las dos secuencias están situadas de modo que la secuencia de ADN reguladora afecta a la expresión de la secuencia de ADN codificante (es decir, que la secuencia codificante o ARN funcional está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes pueden estar unidas de forma funcional a secuencias reguladoras en orientación con sentido o antisentido.

50 "Expresión" se refiere a la transcripción y/o traducción de un gen endógeno, segmento génico o de ácido nucleico heterólogo, o un transgén en células. Por ejemplo, en el caso de construcciones de ARNip, la expresión puede referirse a la transcripción del ARNip solamente. Además, expresión se refiere a la transcripción y acumulación estable de ARN con sentido (ARNm) o funcional. La expresión también puede referirse a la producción de proteína.

55 "Niveles alterados" se refiere al nivel de expresión en células u organismos transgénicos que difiere del de células u organismos normales o no transformados.

60 "Sobreexpresión" se refiere al nivel de expresión en células u organismos transgénicos que excede los niveles de expresión en células u organismos normales o no transformados.

65 "Inhibición antisentido" se refiere a la producción de transcritos de ARN antisentido capaces de suprimir la expresión de proteína desde un gen endógeno o un transgén.

"Fragmento de parada de la transcripción" se refiere a secuencias de nucleótidos que contienen una o más señales reguladoras, tales como secuencias de señal de poliadenilación, capaces de terminar la transcripción. Los ejemplos incluyen las secuencias no reguladoras 3' de genes que codifican nopalina sintasa y la subunidad pequeña de la ribulosa bisfosfato carboxilasa.

"Fragmento de parada de la traducción" se refiere a secuencias de nucleótidos que contienen una o más señales reguladoras, tales como uno o más codones de terminación en las tres fases, capaces de terminar la traducción. La inserción de un fragmento de parada de la traducción adyacente a o cerca del codón de inicio en el extremo 5' de la secuencia codificante provocará ausencia de traducción o traducción inapropiada. La escisión del fragmento de parada de la traducción por recombinación específica de sitio dejará una secuencia específica de sitio en la secuencia codificante que no interfiere con la traducción apropiada usando el codón de inicio.

Las expresiones "secuencia de acción en *cis*" y "elemento de acción en *cis*" se refieren a secuencias de ADN o ARN cuyas funciones requieren que estén en la misma molécula. Un ejemplo de una secuencia de acción en *cis* en el replicón es el origen de replicación viral.

Las expresiones "secuencia de acción en *trans*" y "elemento de acción en *trans*" se refieren a secuencias de ADN o ARN cuya función no requiere que estén en la misma molécula.

"Integrado de forma cromosómica" se refiere a la integración de un gen o construcción de ácido nucleico foráneo en el ADN hospedador por enlaces covalentes. Cuando los genes no están "integrados de forma cromosómica" pueden "expresarse de forma transitoria". La expresión transitoria de un gen se refiere a la expresión de un gen que no está integrado en el cromosoma hospedador pero funciona independientemente, como parte de un plásmido o casete de expresión de replicación autónoma, por ejemplo, o como parte de otro sistema biológico tal como un virus.

Los siguientes términos se usan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más ácidos nucleicos o polinucleótidos: (a) "secuencia de referencia", (b) "ventana de comparación", (c) "identidad de secuencia", (d) "porcentaje de identidad de secuencia", y (e) "identidad sustancial".

(a) Como se usa en este documento, "secuencia de referencia" es una secuencia definida usada como base para comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto o la totalidad de una secuencia especificada; por ejemplo, como un segmento de un ADNc de longitud completa o secuencia génica, o el ADNc o secuencia génica completa.

(b) Como se usa en este documento, "ventana de comparación" hace referencia a un segmento contiguo y específico de una secuencia polinucleotídica, donde la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. Generalmente, la ventana de comparación es de al menos 20 nucleótidos contiguos de longitud, y opcionalmente puede ser de 30, 40, 50, 100, o más larga. Los especialistas en la técnica entienden que para evitar una alta similitud con una secuencia de referencia debido a la inclusión de huecos en la secuencia polinucleotídica, típicamente se introduce una penalización por hueco y se sustrae de la cantidad de coincidencias.

Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Por tanto, la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias cuales quiera puede conseguirse usando un algoritmo matemático.

Pueden utilizarse implementaciones informáticas de estos algoritmos matemáticos para la comparación de secuencias para determinar la identidad de secuencia. Dichas implementaciones incluyen, aunque sin limitación: CLUSTAL en el programa PC/Gene (disponible en Intelligenetics, Mountain View, California); el programa ALIGN (Versión 2.0) y GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Versión 8 (disponible en Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.UU.). Las alineaciones usando estos programas pueden realizarse usando los parámetros por defecto.

El software para realizar análisis BLAST está disponible al público a través del National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo implica identificar en primer lugar pares de secuencias de alta valoración (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que se ajustan o satisfacen algún valor T umbral valorado positivo cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se refiere al umbral del valor de palabra adyacente. Estos aciertos de palabra adyacente inicial actúan como semillas para iniciar búsquedas para hallar HSP más largos que los contengan. Los aciertos de palabra después se amplían en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en todo lo que pueda aumentarse el valor de alineación acumulativo. Los valores acumulativos se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (valor recompensa para un par de restos apareados; siempre > 0) y N (valor de penalización para restos desapareados; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de valores para calcular el valor acumulativo. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando el valor de alineación acumulativa queda fuera en una cantidad X de su valor máximo conseguido, el valor acumulativo llega a cero o por debajo debido a la

acumulación de una o más alineaciones de restos de valoración negativa, o se alcanza el final de cualquier secuencia.

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias. Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$) que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual puede suceder por casualidad un apareamiento entre dos secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico de ensayo se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación de la secuencia de ácido nucleico de ensayo con la secuencia de ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor de aproximadamente 0,01, y mucho más preferiblemente menor de aproximadamente 0,001.

Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST (en BLAST 2.0). Como alternativa, puede usarse PSI-BLAST (en BLAST 2.0) para realizar una búsqueda iterada que detecte relaciones distantes entre moléculas. Cuando se utiliza BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, BLASTN para secuencias de nucleótidos). El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, un corte de 100, $M=5$, $N=-4$, y una comparación de ambas hebras. La alineación también puede realizarse manualmente por inspección.

Para los propósitos de la presente invención, la comparación de secuencias de nucleótidos para la determinación del porcentaje de identidad de secuencia con las secuencias promotoras descritas en este documento se hace preferiblemente usando el programa BlastN (versión 1.4.7 o posterior) con sus parámetros por defecto o cualquier programa equivalente. Por "programa equivalente" se entiende cualquier programa de comparación de secuencias que, para dos secuencias cuales quiera en cuestión, genera una alineación que tiene apareamientos de nucleótidos idénticos y un porcentaje de identidad de secuencia idéntico cuando se comparan a la alineación correspondiente generada por el programa preferido.

(c) Como se usa en este documento, "identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico, hace referencia a un porcentaje especificado de nucleótidos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para la máxima correspondencia sobre una ventana de comparación especificada, medida por algoritmos de comparación de secuencia o por inspección visual.

(d) Como se usa en este documento, "porcentaje de identidad de secuencia" significa el valor determinado mediante la comparación de dos secuencias alineadas de forma óptima sobre una ventana de comparación, donde la parte de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando la cantidad de posiciones en las cuales existe la base de ácido nucleico o el resto de aminoácido idéntico en ambas secuencias para producir la cantidad de posiciones apareadas, dividiendo el número de posiciones apareadas por la cantidad total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

(e) La expresión "identidad sustancial" de secuencias polinucleotídicas significa que un polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, ó 79%, preferiblemente al menos un 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, u 89%, más preferiblemente al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, ó 94%, y mucho más preferiblemente al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% de identidad de secuencia, en comparación con una secuencia de referencia usando uno de los programas de alineación descritos usando parámetros convencionales.

Otra indicación de que secuencias de nucleótidos son sustancialmente idénticas es si dos moléculas hibridan entre sí en condiciones rigurosas. Generalmente, se seleccionan condiciones rigurosas que son aproximadamente 5° inferiores al punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, las condiciones rigurosas abarcan temperaturas en el intervalo de aproximadamente 1°C a aproximadamente 20°C, dependiendo del grado deseado de rigurosidad como se matiza de otro modo en este documento.

Para comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la cual se comparan secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencia, las secuencia de ensayo y referencia se introducen en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencias si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencias entonces calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de ensayo respecto a la secuencia de referencia, en base a los parámetros designados del programa.

Como se indica en este documento, otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas hibriden entre sí en condiciones rigurosas. La expresión "que hibridan específicamente con" se refiere a la unión, formación de dúplex, o hibridación de una molécula solamente con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla

compleja (por ejemplo, celular total) de ADN o ARN. "Se une sustancialmente" se refiere a hibridación complementaria entre un ácido nucleico de sonda y un ácido nucleico diana y abarca desapareamientos minoritarios que pueden acomodarse reduciendo la rigurosidad del medio de hibridación para conseguir la detección deseada de la secuencia de ácido nucleico diana.

5 "Condiciones rigurosas de hibridación" y "condiciones rigurosas de lavado de hibridación" en el contexto de experimentos de hibridación de ácido nucleico tales como hibridaciones de Southern y Northern son dependientes de secuencia, y son diferentes en diferentes parámetros ambientales. Secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas superiores. La T_m es la temperatura (a fuerza iónica y pH definidos) a la cual el 50% de la secuencia diana hibrida como una sonda perfectamente coincidente. La especificidad es típicamente la función de lavados post-hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para híbridos ADN-ADN, la T_m puede aproximarse a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984); $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/L$; donde M es la molaridad de cationes monovalentes, %GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina en el ADN, % form es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m se reduce en aproximadamente 1°C por cada 1% de desapareamiento; por tanto, la T_m , la hibridación, y/o las condiciones de lavado pueden ajustarse para hibridar secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con >90% de identidad, la T_m puede disminuirse 10°C . Generalmente, se seleccionan condiciones rigurosas que son aproximadamente 5°C inferiores al punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, condiciones severamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3, ó 4°C inferior que el punto de fusión térmica (T_m); las condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9, ó 10°C inferior que el punto de fusión térmica (T_m); las condiciones de baja rigurosidad pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15, ó 20°C inferior que el punto de fusión térmica (T_m). Usando la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado, y la T deseada, los especialistas en la técnica entenderán que se describen de forma inherente variaciones en la rigurosidad de las soluciones de hibridación y/o lavado. Si el grado deseado de desapareamiento produce una T de menos de 45°C (solución acuosa) o 32°C (solución de formamida), se prefiere aumentar la concentración de SSC de modo que pueda usarse una temperatura superior. Generalmente, se seleccionan condiciones de hibridación y lavado altamente rigurosas que son aproximadamente 5°C inferiores que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos.

Un ejemplo de condiciones de lavado altamente rigurosas es NaCl 0,15 M a 72°C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado en SSC 0,2X a 65°C durante 15 minutos (véase, Sambrook y Russell 2001, para una descripción del tampón SSC). A menudo, un lavado de alta rigurosidad está precedido por un lavado de baja rigurosidad para eliminar la señal de sonda de fondo. Para secuencias cortas de ácido nucleico (por ejemplo, aproximadamente 10 a 50 nucleótidos), las condiciones rigurosas típicamente implican concentraciones salinas de menos de aproximadamente 1,5 M, más preferiblemente aproximadamente 0,01 a 1,0 M, concentración de iones Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3, y la temperatura es típicamente al menos aproximadamente 30°C . Las condiciones rigurosas también pueden conseguirse con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. En general, una proporción de señal a ruido de 2X (o superior) que la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica detección de una hibridación específica. Se seleccionan condiciones muy rigurosas que son iguales a la T_m para una molécula de ácido nucleico particular.

45 Se seleccionan condiciones muy rigurosas que son iguales a la T_m para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones rigurosas para hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 restos complementarios en un filtro en una transferencia de Southern o Northern es formamida al 50%, por ejemplo, hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C , y un lavado en SSC 0,1X de 60 a 65°C . Las condiciones ejemplares de baja rigurosidad incluyen hibridación con una solución tampón de formamida del 30 al 35%, NaCl 1 M, SDS al 1% (dodecil sulfato sódico) a 37°C , y un lavado en SSC 1X a 2X (SSC 20X = NaCl 3,0 M/citrato trisódico 0,3 M) de 50 a 55°C . Las condiciones ejemplares de rigurosidad moderada incluyen hibridación en formamida del 40 al 45%, NaCl 1,0 M, SDS al 1% a 37°C , y un lavado en SSC 0,5X a 1X de 55 a 60°C .

55 El término "transformación" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico en el genoma de una célula hospedadora, provocando herencia genéticamente estable. Una "célula hospedadora" es una célula que se ha transformado, o tiene capacidad de transformación, por una molécula exógena de ácido nucleico. Las células hospedadoras que contienen los fragmentos transformados de ácido nucleico se mencionan como células "transgénicas".

60 "Transformada", "transducida", "transgénica" y "recombinante" se refiere a una célula hospedadora en que se ha introducido una molécula de ácido nucleico heteróloga. Como se usa en este documento, el término "transfección" se refiere al suministro de ADN en células eucariotas (por ejemplo, de mamífero). El término "transformación" se usa en este documento para hacer referencia al suministro de ADN en células procariotas (por ejemplo, E. coli). El término "transducción" se usa en este documento para hacer referencia a la infección de células con particular 65 virales. La molécula de ácido nucleico puede integrarse de forma estable en el genoma de forma generalmente conocida en la técnica. Los métodos conocidos de PCR incluyen, aunque sin limitación, métodos usando cebadores

emparejados, cebadores anidados, cebadores específicos individuales, cebadores degenerados, cebadores específicos de gen, cebadores específicos de vector, cebadores parcialmente desapareados, y similares. Por ejemplo, las células "transformadas", "transformantes" y "transgénicas" han ido a través del proceso de transformación y contienen un gen foráneo integrado en su cromosoma. El término "no transformada" se refiere a células normales que no han ido a través del proceso de transformación.

"Células genéticamente alteradas" indica células que se han modificado mediante la introducción de ácidos nucleicos recombinantes o heterólogos (por ejemplo, una o más construcciones de ADN o sus equivalentes de ARN) e incluye adicionalmente la descendencia de dichas células que retienen parte o toda esta modificación genética.

Como se usa en este documento, el término "derivada" o "dirigida a" con respecto a una molécula de nucleótidos significa que la molécula tiene identidad de secuencia complementaria con una molécula particular de interés.

Los ARNip de la presente invención pueden generarse por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por transcripción *in vitro*, de forma recombinante, o por medios sintéticos. En un ejemplo, los ARNip pueden generarse *in vitro* usando una enzima recombinante, tal como una ARN polimerasa T7, y moldes oligonucleotídicos de ADN.

II. Moléculas de ácido nucleico de la invención

Las expresiones "aislado y/o purificado" se refieren a aislamiento *in vitro* de un ácido nucleico, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN de su entorno celular natural, y de la asociación con otros componentes de la célula, tal como ácido nucleico o polipéptido, de modo que pueda secuenciarse, replicarse, y/o expresarse. El ARN o ADN está "asilado" porque está libre de al menos un ácido nucleico contaminante con que está normalmente asociado en la fuente natural del ARN o ADN y preferiblemente está sustancialmente libre de cualquier otro ARN o ADN de mamífero. La expresión "libre de al menos un ácido nucleico contaminante de la fuente con el que está normalmente asociado" incluye el caso donde el ácido nucleico se reintroduce en la fuente o célula natural pero está en una localización cromosómica diferente o está flanqueado de otro modo por secuencias de ácido nucleico no encontradas normalmente en la célula fuente, por ejemplo, en un vector o plásmido.

Además de una secuencia de ADN que codifica un ARNip, las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen moléculas de ARN interferente bicatenario, que también son útiles para inhibir la expresión de un gen diana.

Como se usa en este documento, la expresión "ácido nucleico recombinante", por ejemplo, "secuencia o segmento de ADN recombinante" se refiere a un ácido nucleico, por ejemplo, a ADN, que se ha derivado o aislado de cualquier fuente celular apropiada, que posteriormente puede alterarse químicamente *in vitro*, de modo que su secuencia no sea de origen natural, o corresponde a secuencias de origen natural que no están posicionadas como estarían posicionadas en un genoma que no se ha transformado con ADN exógeno. Un ejemplo de ADN preseleccionado "derivado" de una fuente sería una secuencia de ADN que se identifica como fragmento útil dentro de un organismo dado, y que después se sintetiza químicamente en forma esencialmente pura. Un ejemplo de dichos ADN "aislado" de una fuente sería una secuencia de ADN útil que se escinde o retira de dicha fuente por medios químicos, por ejemplo, mediante el uso de endonucleasas de restricción, de modo que pueda manipularse adicionalmente, por ejemplo, amplificarse, para su uso en la invención, mediante la metodología de ingeniería genética.

Por tanto, la recuperación o aislamiento de un fragmento dado de ADN de una digestión de restricción puede emplear separación de la digestión en gel de poli(acrilamida o agarosa por electroforesis, identificación del fragmento de interés por comparación de su movilidad frente a la de fragmentos marcadores de ADN de peso molecular conocido, retirada de la sección de gel que contiene el fragmento deseado, y separación del gel del ADN. Por lo tanto, "ADN recombinante" incluye secuencias de ADN completamente sintéticas, secuencias de ADN semi-sintéticas, secuencias de ADN aisladas de fuentes biológicas, y secuencias de ADN derivadas de ARN, así como mezclas de las mismas.

Las moléculas de ácido nucleico que tienen sustituciones de bases (es decir, variantes) se preparan mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, aunque sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de origen natural) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR, y mutagénesis con casete de una variante previamente preparada o una versión no variante de la molécula de ácido nucleico.

La mutagénesis mediada por oligonucleótidos es un método para preparar variantes de sustitución. Esta técnica es conocida en la técnica. En resumen, puede alterarse un ácido nucleico que codifica un ARNip hibridando un oligonucleótido que codifica la mutación deseada a un molde de ADN, donde el molde es la forma monocatenaria de un plásmido o bacteriófago que contiene la secuencia génica inalterada o nativa. Después de la hibridación, se usa una ADN polimerasa para sintetizar una segunda hebra completa complementaria del molde que por tanto incorporará el cebador oligonucleotídico, y codificará la alteración seleccionada en el ácido nucleico que codifica el ARNip. Los oligonucleótidos se sintetizan fácilmente usando técnicas conocidas en la técnica.

El molde de ADN puede generarse por aquellos vectores que derivan de vectores de bacteriófago M13 (los vectores disponibles en el mercado M13mp18 y M13mp19 son adecuados), o aquellos vectores que contienen un origen de replicación fágico monocatenario. Por tanto, el ADN que tiene que mutarse puede insertarse en uno de estos vectores para generar molde monocatenario. La producción del molde monocatenario se describe en el Capítulo 3 de Sambrook y Russell, 2001. Como alternativa, el molde de ADN monocatenario puede generarse por desnaturalización del ADN plasmídico bicatenario (u otro) usando técnicas convencionales.

Para la alteración de la secuencia de ADN nativa (para generar variantes de secuencia de aminoácidos, por ejemplo), el oligonucleótido se hibrida con el molde monocatenario en condiciones adecuadas de hibridación. Después se añade una enzima que polimeriza el ADN, habitualmente el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, para sintetizar la hebra complementaria del molde usando el oligonucleótido como cebador para la síntesis. Así se forma una molécula heterodúplex de modo que una hebra de ADN codifica la forma mutada del ADN, y la otra hebra (el molde original) codifica la secuencia nativa, inalterada del ADN. Esta molécula heterodúplex después se transforma en una célula hospedadora adecuada, habitualmente una procarionta tal como *E. coli* JM101. Después de cultivar las células, se siembran en placas de agarosa y se seleccionan usando el cebador oligonucleotídico radiomarcado con 32-fosfato para identificar las colonias bacterianas que contienen el ADN mutado. La región mutada después se retira y se coloca en un vector apropiado, generalmente un vector de expresión del tipo típicamente empleado para transformación de un hospedador apropiado.

El método descrito inmediatamente antes puede modificarse de modo que se cree una molécula homodúplex donde ambas hebras del plásmido contienen la mutación o mutaciones. Las modificaciones son las siguientes: El oligonucleótido monocatenario se hibrida con el molde monocatenario como se describe en este documento. Se combina una mezcla de tres desoxirribonucleótidos, desoxirriboadenosina (dATP), desoxirriboguanosina (dGTP), y desoxirribotimidina (dTTP), con una tiodesoxirribocitosina modificada llamada dCTP-(*S) (que puede obtenerse en Amersham Corporation). Esta mezcla se añade al complejo molde-oligonucleótido. Después de la adición de la ADN polimerasa a esta mezcla, se genera una hebra de ADN idéntica al molde excepto por las bases mutadas. Además, esta nueva hebra de ADN contendrá dCTP-(*S) en lugar de dCTP, que sirve para protegerlo de la digestión con endonucleasa de restricción.

Después de mellar la hebra molde del heterodúplex bicatenario con una enzima de restricción apropiada, la hebra de molde puede digerirse con nucleasa ExoIII u otra nucleasa apropiada pasada la región que contiene el sitio o sitios a mutagenizar. La reacción después se detiene para dejar una molécula que es solamente monocatenaria parcialmente. Entonces se forma un homodúplex de ADN bicatenario completo usando ADN polimerasa en presencia de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato, ATP, y ADN ligasa. Esta molécula homodúplex después puede transformarse en una célula hospedadora adecuada tal como *E. coli* JM101.

III. Casetes de expresión de la invención

Para preparar casetes de expresión, la secuencia o segmento de ADN recombinante puede ser circular o lineal, bicatenario o monocatenario. Generalmente, la secuencia o segmento de ADN está en forma de ADN quimérico, tal como ADN plasmídico o un vector que también puede contener regiones codificantes flanqueadas por secuencias de control que promueven la expresión del ADN recombinante presente en la célula transformada resultante.

Un vector o casete de expresión "quimérico", como se usa en este documento, significa un vector o casete que incluye secuencias de ácido nucleico de al menos dos especies diferentes, o tiene una secuencia de ácido nucleico de la misma especie que está unida o asociada de un modo que no existe en el tipo "nativo" o silvestre de la especie.

A parte de las secuencias de ADN recombinante que sirven como unidades de transcripción para un transcrito de ARN, o partes del mismo, una parte del ADN recombinante puede no transcribirse, cumpliendo una función reguladora o estructural. Por ejemplo, el ADN recombinante puede tener un promotor que es activo en células de mamífero.

Otros elementos funcionales en las células hospedadoras, tales como intrones, potenciadores, secuencias de poliadenilación y similares, también pueden ser parte del ADN recombinante. Dichos elementos pueden ser necesarios o no para la función del ADN, pero pueden proporcionar expresión mejorada del ADN afectando a la transcripción, estabilidad del ARNip, o similares. Dichos elementos pueden incluirse en el ADN según se desee para obtener el rendimiento óptimo del ARNip en la célula.

Las secuencias de control son secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida de forma funcional en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para células procariontas, por ejemplo, incluyen un promotor, y opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

Los ácidos nucleicos unidos de forma funcional son ácidos nucleicos colocados en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido de forma funcional a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido de forma funcional a una secuencia codificante si está posicionado de modo que facilite la traducción. Generalmente, las secuencias de ADN unidas de forma funcional son secuencias de ADN que están unidas contiguas. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se consigue por ligamiento en sitios convenientes de restricción. Si dichos sitios no existen, se usan adaptadores o enlazadores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

El ADN recombinante a introducir en las células puede contener un gen marcador de selección o un gen indicador o ambos para facilitar la identificación y selección de células de expresión entre la población de células que se busca transfectar o infectar a través de vectores virales. En otras realizaciones, el marcador de selección puede portarse en un trozo diferente de ADN y usarse en un procedimiento de co-transfección. Tanto los marcadores de selección como los genes indicadores pueden estar flanqueados con secuencias reguladoras apropiadas para posibilitar la expresión en las células hospedadoras. Los marcadores de selección útiles son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, tales como *neo* y similares.

Los genes indicadores se usan para identificar células potencialmente transfectadas y para evaluar la funcionalidad de secuencias reguladoras. Los genes indicadores que codifican proteínas fácilmente ensayables son bien conocidos en la técnica. En general, un gen indicador es un gen que no está presente en o se expresa por el organismo o tejido receptor y que codifica una proteína cuya expresión se manifiesta por alguna propiedad fácilmente detectable, por ejemplo, actividad enzimática. Por ejemplo, los genes indicadores incluyen el gen de la cloranfenicol acetil transferasa (*cat*) de Tn9 de *E. coli* y el gen de luciferasa de luciérnaga *Photinus pyralis*. La expresión del gen indicador se ensaya en un momento adecuado después de haber introducido el ADN en las células receptoras.

Los métodos generales para construir ADN recombinante que pueda transfectar células diana son bien conocidos para los especialistas en la técnica, y pueden utilizarse las mismas composiciones y métodos de construcción para producir el ADN útil en este documento.

El ADN recombinante puede introducirse fácilmente en las células hospedadoras, por ejemplo, células de mamífero, bacterianas, de levadura o insecto por transfección con un vector de expresión compuesto por ADN que codifica el ARNip por cualquier procedimiento útil para la introducción en una célula particular, por ejemplo, métodos físicos o biológicos, para producir una célula que tenga el ADN recombinante integrado de forma estable en su genoma o que exista como elemento episómico, de modo que las moléculas de ADN, o secuencias de la presente invención se expresen por la célula hospedadora. Preferiblemente, el ADN se introduce en las células hospedadoras mediante un vector. La célula hospedadora es preferiblemente de origen eucariota, por ejemplo, fuentes vegetales, de mamífero, insecto, levadura u hongo, pero también pueden emplearse células hospedadoras de origen no eucariota.

Los métodos físicos para introducir un ADN preseleccionado en una célula hospedadora incluyen precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo con partículas, microinyección, electroporación, y similares. Los métodos biológicos para introducir el ADN de interés en una célula hospedadora incluyen el uso de vectores virales de ADN y ARN. Para terapia génica de mamíferos, como se describe en este documento a continuación, es deseable usar un medio eficaz para insertar un gen de copia en el genoma del hospedador. Los vectores virales, y especialmente los vectores retrovirales, se han convertido en el método más ampliamente usado para insertar genes en células de mamífero, por ejemplo, humanas. Pueden obtenerse otros vectores virales de poxvirus, virus del herpes simple I, adenovirus y virus adeno-asociados, y similares. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.350.674 y 5.585.362.

Como se analiza en este documento, una célula hospedadora o línea celular "transfectada", o "transducida" es una en que el genoma se ha alterado o aumentado por la presencia de al menos una secuencia de ácido nucleico heteróloga o recombinante. Las células hospedadoras de la presente invención se producen típicamente por transfección con una secuencia de ADN en un vector plasmídico de expresión, un vector viral de expresión, o como una secuencia de ADN lineal aislada. El ADN transfectado puede llegar a ser una secuencia de ADN recombinante cromosómicamente integrada, que está compuesta por la secuencia que codifica el ARNip.

Para confirmar la presencia de la secuencia de ADN recombinante en la célula hospedadora, puede realizarse una diversidad de ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de "biología molecular" bien conocidos para los especialistas en la técnica, tales como transferencia de Southern y Northern, RT-PCR y PCR; ensayos "bioquímicos", tales como detección de la presencia o ausencia de un péptido particular, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y transferencias de Western) o por ensayos descritos en este documento para identificar agentes que entran dentro del alcance de la invención.

Para detectar y cuantificar ARN producido a partir de segmentos introducidos de ADN recombinante, puede emplearse RT-PCR. En esta aplicación de PCR, primero es necesario transcribir de forma inversa el ARN en ADN, usando enzimas tales como transcriptasa inversa, y después a través del uso de técnicas convencionales de PCR

para amplificar el ADN. En la mayoría de los casos, las técnicas de PCR, aunque útiles, no demostrarán integridad del producto de ARN. Puede obtenerse información adicional acerca de la naturaleza del producto de ARN por transferencia de Northern. Esta técnica demuestra la presencia de una especie de ARN y da información acerca de la integridad de ese ARN. La presencia o ausencia de una especie de ARN también puede determinarse usando hibridaciones de Northern dot o slot blot. Estas técnicas son modificaciones de la transferencia de Northern y solamente demuestran la presencia o ausencia de una especie de ARN.

Aunque puede usarse transferencia de Southern y PCR para detectar el segmento de ADN recombinante en cuestión, no proporcionan información en cuanto a si el segmento preseleccionado de ADN se está expresando. La expresión puede evaluarse identificando específicamente los productos peptídicos de las secuencias introducidas de ADN recombinante o evaluando los cambios fenotípicos ocasionados por la expresión del segmento introducido de ADN recombinante en la célula hospedadora.

La presente invención proporciona un sistema de expresión celular para expresar material exógeno de ácido nucleico en un mamífero receptor. El sistema de expresión, también mencionado como "célula modificada genéticamente", comprende una célula y un vector de expresión para expresar el material exógeno de ácido nucleico. Las células modificadas genéticamente son adecuadas para su administración a un mamífero receptor, donde reemplazan las células endógenas del receptor. Por tanto, las células modificadas genéticamente preferidas son no inmortalizadas y son no tumorigénicas.

De acuerdo con una realización, las células se transfectan o modifican genéticamente de otro modo *ex vivo*. Las células se aíslan de un mamífero (preferiblemente un ser humano), se introduce el ácido nucleico (es decir, se transduce o transfecta *in vitro*) con un vector para expresar un gen heterólogo (por ejemplo, recombinante) que codifica el agente terapéutico, y después se administran a un mamífero receptor para el suministro del agente terapéutico *in situ*. El mamífero receptor puede ser un ser humano y las células a modificar son células autólogas, es decir, las células se aíslan del mamífero receptor.

De acuerdo con otra realización, las células se transfectan o transducen o modifican genéticamente de otro modo *in vivo*. Las células del mamífero receptor se transducen o transfectan *in vivo* con un vector que contiene material exógeno de ácido nucleico para expresar un gen heterólogo (por ejemplo, recombinante) que codifica un agente terapéutico y el agente terapéutico se suministra *in situ*.

Como se usa en este documento, "material exógeno de ácido nucleico" se refiere a un ácido nucleico o un oligonucleótido, natural o sintético, que no se encuentra de forma natural en las células; o si se encuentra de forma natural en las células, está modificado a partir de su forma original o nativa. Por tanto, "material exógeno de ácido nucleico" incluye, por ejemplo, un ácido nucleico de origen no natural que pueden transcribirse en un ARN antisentido, un ARNip, así como un "gen heterólogo" (es decir, un gen que codifica una proteína que no se expresa o se expresa a niveles biológicamente insignificantes en una célula de origen natural del mismo tipo). Para ilustrar, un gen sintético o natural que codifique eritropoyetina humana (EPO) se consideraría "material exógeno de ácido nucleico" con respecto a células mesoteliales de peritoneo humano ya que estas últimas células no expresan de forma natural EPO. Otro ejemplo más de "material exógeno de ácido nucleico" es la introducción de solamente una parte de un gen para crear un gen recombinante, tal como combinando un promotor regulable con una secuencia codificante endógena mediante recombinación homóloga.

La condición susceptible a terapia por inhibición génica puede ser un proceso profiláctico, es decir, un proceso para prevenir una enfermedad o una afección médica indeseada. Por tanto, la presente invención abarca un sistema para suministrar ARNip que tiene una función profiláctica (es decir, un agente profiláctico) al mamífero receptor.

IV. Métodos para introducir los casetes de expresión de la invención en células

El material de ácido nucleico inhibidor (por ejemplo, un casete de expresión que codifica ARNip dirigido a un gen de interés) puede introducirse en la célula *ex vivo* o *in vivo* por métodos de transferencia genética, tales como transfección o transducción, para proporcionar una célula modificada genéticamente. Los diversos vectores de expresión (es decir, vehículos para facilitar el suministro de ácido nucleico exógeno a una célula diana) son conocidos para los especialistas en la técnica.

Como se usa en este documento, "transfección de células" se refiere a la adquisición por una célula de nuevo material de ácido nucleico mediante la incorporación de ADN añadido. Por tanto, transfección se refiere a la inserción de ácido nucleico en una célula usando métodos físicos o químicos. Varias técnicas de transfección son conocidas para los especialistas en la técnica incluyendo co-precipitación de ADN con fosfato cálcico, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposoma catiónico, bombardeo de micropartículas facilitado por partículas de tungsteno, y co-precipitación de ADN con fosfato de estroncio.

En contraste, "transducción de células" se refiere al proceso de transferir ácido nucleico a una célula usando un virus ADN o ARN. Un virus ARN (es decir, un retrovirus) para transferir un ácido nucleico a una célula se menciona en este documento como retrovirus quimérico de transducción. El material de ácido nucleico exógeno contenido dentro

del retrovirus se incorpora en el genoma de la célula transducida. Una célula que se ha transducido con un virus ADN quimérico (por ejemplo, un adenovirus que porta un ADNc que codifica un agente terapéutico), no tendrá el material de ácido nucleico exógeno incorporado en su genoma pero será capaz de expresar el material de ácido nucleico exógeno que se retiene de forma extracromosómica dentro de la célula.

5 El material de ácido nucleico exógeno puede incluir el ácido nucleico que codifica el ARNip junto con un promotor para controlar la transcripción. El promotor característicamente tiene una secuencia nucleotídica específica necesaria para iniciar la transcripción. El material de ácido nucleico exógeno puede incluir adicionalmente
10 secuencias adicionales (es decir, potenciadores) necesarios para obtener la actividad de transcripción génica deseada. Para el propósito de este análisis un "potenciador" es simplemente cualquier secuencia de ADN no traducido que trabaja con la secuencia codificante (en *cis*) para cambiar el nivel de transcripción basal impuesto por el promotor. El material de ácido nucleico exógeno puede introducirse en el genoma celular inmediatamente cadena
15 abajo del promotor de modo que el promotor y la secuencia codificante estén unidos de forma funcional para permitir la transcripción de la secuencia codificante. Un vector de expresión puede incluir un elemento promotor exógeno para controlar la transcripción del gen exógeno insertado. Dichos promotores exógenos incluyen tanto promotores constitutivos como regulables.

Los promotores constitutivos de origen natural controlan la expresión de funciones celulares esenciales. Como
20 resultado, una secuencia de ácido nucleico bajo el control de un promotor constitutivos se expresa en todas las condiciones de crecimiento celular. Los promotores constitutivos incluyen los promotores de los siguientes genes que codifican ciertas funciones constitutivas o "de gestión": hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT), dihidrofolato reductasa (DHFR), adenosina desaminasa, fosfoglicerol quinasa (PGK), piruvato quinasa, fosfoglicerol mutasa, el promotor de beta-actina, y otros promotores constitutivos conocidos para los especialistas en la técnica. Además,
25 muchos promotores virales funcionan de forma constitutiva en células eucariotas. Éstos incluyen: los promotores temprano y tardío de SV40; las repeticiones terminales largas (LTR) del virus de la leucemia de Moloney y otros retrovirus; y el promotor de la timidina quinasa del virus del herpes simple, entre muchos otros.

Las secuencias de ácido nucleico que están bajo el control de promotores regulables se expresan solamente o a un
30 grado mayor o menor en presencia de un agente inductor o represor (por ejemplo, la transcripción bajo el control del promotor de la metalotioneína se aumenta enormemente en presencia de ciertos iones metálicos). Los promotores regulables incluyen elementos de respuesta (RE) que estimulan la transcripción cuando sus factores inductores están unidos. Por ejemplo, existen RE para factores séricos, hormonas esteroides, ácido retinoico, AMP cíclico, y tetraciclina y doxiciclina. Pueden elegirse promotores que contienen un RE particular para obtener una respuesta regulable y en algunos casos, el propio RE puede unirse a un promotor diferente, confiriendo de este modo
35 capacidad regulable a la secuencia de ácido nucleico codificada. Por tanto, seleccionando el promotor apropiado (constitutivo frente a regulable; fuerte frente a débil), es posible controlar tanto la existencia como el nivel de expresión de una secuencia de ácido nucleico en la célula modificada genéticamente. Si la secuencia de ácido nucleico está bajo el control de un promotor regulable, el suministro del agente terapéutico *in situ* se desencadena exponiendo la célula modificada genéticamente *in situ* a condiciones para permitir la transcripción de la secuencia de
40 ácido nucleico, por ejemplo, por inyección intraperitoneal de inductores específicos de los promotores regulables que controlan la transcripción del agente. Por ejemplo, la expresión *in situ* de una secuencia de ácido nucleico bajo el control del promotor de metalotioneína en células modificadas genéticamente se potencia poniendo en contacto las células modificadas genéticamente con una solución que contiene los iones metálicos apropiados (es decir, inductores) *in situ*.

45 Por consiguiente, la cantidad de ARNip generado *in situ* se regula controlando factores tales como la naturaleza del promotor usado para dirigir la transcripción de la secuencia de ácido nucleico (es decir, si el promotor es constitutivo o regulable, fuerte o débil) y la cantidad de copias de la secuencia de ácido nucleico exógeno que codifica una secuencia de ARNip que están en la célula.

50 Además de al menos un promotor y al menos una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica el ARNip, el vector de expresión puede incluir un gen de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a neomicina, para facilitar la selección de células que se han transfectado o transducido con el vector de expresión.

55 Las células también pueden transfectarse con dos o más vectores de expresión, conteniendo al menos un vector la secuencia o secuencias de ácido nucleico que codifican el o los ARNip, conteniendo el otro vector un gen de selección. La selección de un promotor, potenciador, gen de selección, y/o secuencia señal adecuados se considera dentro del alcance de los especialistas en la técnica sin experimentación excesiva.

60 El siguiente análisis se refiere a diversas utilidades de la presente invención. Por ejemplo, la presente invención tiene utilidad como sistema de expresión adecuado para silenciar la expresión de uno o más genes de interés.

La presente invención también proporciona métodos para modificar genéticamente células de un destinatario mamífero *in vivo*. De acuerdo con una realización, el método comprende introducir un vector de expresión para
65 expresar una secuencia de ARNip en células del destinatario mamífero *in situ* por, por ejemplo, inyección del vector en el destinatario.

V. Vehículos de suministro para los casetes de expresión de la invención

5 El suministro de compuestos en tejidos y a través de la barrera hemato-encefálica puede limitarse por el tamaño y propiedades bioquímicas de los compuestos. Actualmente, el suministro eficaz de compuestos a células *in vivo* puede conseguirse solamente cuando las moléculas son pequeñas (habitualmente menor de 600 Dalton). La transferencia génica para la corrección de errores innatos en el metabolismo y enfermedades neurodegenerativas del sistema nervioso central (SNC), y para el tratamiento del cáncer se ha conseguido con vectores adenovirales recombinantes.

10 La selección y optimización de un vector de expresión particular para expresar un ARNip específico en una célula puede realizarse obteniendo la secuencia de ácido nucleico del ARNip, posiblemente con una o más regiones de control apropiadas (por ejemplo, promotor, secuencia de inserción); preparando una construcción de vector que comprenda el vector en que se inserta la secuencia de ácido nucleico que codifica el ARNip; transfectando o transduciendo células cultivadas *in vitro* con la construcción de vector; y determinando si el ARNip está presente en las células cultivadas.

15 Los vectores para terapia génica celular incluyen virus, tales como virus deficientes en replicación (descritos en detalle a continuación). Se obtienen vectores virales ejemplares del virus del sarcoma de Harvey, el virus del sarcoma de Rous (MPSV), el virus de la leucemia murina de Moloney y virus ADN (por ejemplo, adenovirus).

20 Los retrovirus deficientes en replicación son capaces de dirigir la síntesis de todas las proteínas del virión, pero son incapaces de fabricar partículas infecciosas. Por consiguiente, estos vectores retrovirales de expresión genéticamente alterados tienen utilidad general para transducción de alta eficacia de secuencias de ácido nucleico en células cultivadas, y utilidad específica para su uso en el método de la presente invención. Dichos retrovirus tienen adicionalmente utilidad para la transducción eficaz de secuencias de ácido nucleico en células *in vivo*. Los retrovirus se han usado extensivamente para transferir material de ácido nucleico a células. Los protocolos para producir retrovirus deficientes en replicación (incluyendo las etapas de incorporación de material de ácido nucleico exógeno en un plásmido, transfección de una línea celular de empaquetado con plásmido, la producción de retrovirus recombinantes por la línea celular de empaquetado, la recogida de partículas virales del medio de cultivo tisular, y la infección de las células diana con las partículas virales) son bien conocidos en la técnica.

25 Una ventaja de usar retrovirus para terapia génica es que los virus insertan la secuencia de ácido nucleico que codifica el ARNip en el genoma de la célula hospedadora, permitiendo de ese modo que la secuencia de ácido nucleico que codifica el ARNip pase a la descendencia de la célula cuando se divide. Las secuencias promotoras en la región LTR pueden potenciar la expresión de una secuencia codificante insertada en una diversidad de tipos celulares. Algunas desventajas de usar un vector de expresión retroviral son (1) mutagénesis de inserción, es decir, la inserción de la secuencia de ácido nucleico que codifica el ARNip en una posición indeseable en el genoma de la célula diana que, por ejemplo, conduce a crecimiento celular no regulado y (2) la necesidad de proliferación de la célula diana para que la secuencia de ácido nucleico que codifica el ARNip portada por el vector se integre en el genoma diana.

30 Otro candidato viral útil como vector de expresión para la transformación de células es el adenovirus, un virus ADN bicatenario. El adenovirus es infeccioso en un amplio intervalo de tipos celulares incluyendo, por ejemplo, células musculares y endoteliales.

35 Los adenovirus (Ad) son virus ADN lineal bicatenario con un genoma de 36 kb. Varias características de los adenovirus los han hecho útiles como vehículos de suministro transgénico para aplicaciones terapéutica, tales como favorecimiento de suministro génico *in vivo*. Los vectores adenovirales recombinantes han demostrado tener capacidad de transferencia génica *in situ* eficaz a células parenquimáticas de diversos órganos, incluyendo el pulmón, cerebro, páncreas, vesícula biliar, e hígado. Esto ha permitido el uso de estos vectores en métodos para tratar enfermedades genéticas heredadas, tales como fibrosis quística, donde los vectores pueden suministrarse a un órgano diana. Además, la capacidad de los vectores adenovirales de conseguir transducción tumoral *in situ* ha permitido el desarrollo de una diversidad de métodos de terapia génica antineoplásica para enfermedad no diseminada. En estos métodos, el confinamiento del vector favorece la transducción específica de célula tumoral.

40 Al igual que en el retrovirus, el genoma adenoviral es adaptable para su uso como un vector de expresión para terapia génica, es decir, eliminando la información genética que controla la producción del propio virus. Como el adenovirus funciona de un modo extracromosómico, el adenovirus recombinante no tiene el problema teórico de mutagénesis de inserción.

45 Tradicionalmente se han usado varios enfoques para generar los adenovirus recombinantes. Un enfoque implica ligamiento directo de fragmentos de endonucleasa de restricción que contienen una secuencia de ácido nucleico de interés a partes del genoma adenoviral. Como alternativa, la secuencia de ácido nucleico de interés puede insertarse en un adenovirus defectuoso por resultados de recombinación homóloga. Los recombinantes deseados se identifican seleccionando placas individuales generadas en un césped de células de complementación.

La mayoría de los vectores adenovirales se basan en la estructura del adenovirus tipo 5 (Ad5) en que se ha introducido un casete de expresión que contiene la secuencia de ácido nucleico de interés en lugar de la región temprana 1 (E1) o región temprana 3 (E3). Virus en que se ha delecionado E1 son defectuosos para la replicación y se propagan en células humanas de complementación (por ejemplo, células 293 o 911), que suministran el gen perdido E1 y pIX en *trans*.

En una realización de la presente invención, se deseará generar ARNip en una célula cerebral o tejido cerebral. Un vector adecuado para esta aplicación es un vector FIV o un vector AAV. Por ejemplo, se puede usar AAV5. Además, se pueden aplicar vectores de poliovirus o HSV.

La aplicación de ARNip se consigue generalmente por transfección de ARNip sintéticos, ARN sintetizados *in vitro*, o plásmidos que expresan ARNhc o miARN. Más recientemente, se han empleado virus para estudios *in vitro* y para generar ratones transgénicos knock-down de genes diana. Puede usarse adenovirus recombinante, virus adeno-asociado (AAV) y virus de inmunodeficiencia felina (FIV) para suministrar genes *in vitro* e *in vivo*. Cada uno tiene sus propias ventajas y desventajas. Los adenovirus son virus ADN bicatenario con genomas grandes (36 kb) y se han modificado por ingeniería en el propio laboratorio y otros para acomodar casetes de expresión en distintas regiones.

Los virus adeno-asociados tienen genomas encapsidados, similares a Ad, pero son más pequeños de tamaño y capacidad de empaquetado (~30 nm frente a ~100 nm; límite de empaquetado ~4,5 kb). Los AAV contienen genomas de ADN monocatenario de la hebra + o la hebra -. Se han estudiado ocho serotipos de AAV (1-8) extensivamente, tres de los cuales se han evaluado en el cerebro. Una consideración importante para la presente aplicación es que AAV5 transduce neuronas del cuerpo estriado y la corteza, y no está asociado con ninguna patología conocida.

El virus adeno asociado (AAV) es un virus no patógeno pequeño de la familia parvoviridae. AAV es distinto de los otros miembros de esta familia por su dependencia en un virus auxiliar para su replicación. En ausencia de un virus auxiliar, el AAV puede integrarse de un modo específico de locus en el brazo q del cromosoma 19. El genoma de aproximadamente 5 kb de AAV consiste en un segmento de ADN monocatenario de polaridad más o menos. Los extremos del genoma son repeticiones terminales invertidas cortas que pueden plegarse en estructuras de horquilla y sirven como origen de replicación de ADN viral. Físicamente, el virión de parvovirus no tiene envuelta y su cápsida icosaédrica es de aproximadamente 20 nm de diámetro.

Esta invención proporciona adicionalmente virus quiméricos donde el AAV pueden combinarse con herpes virus, amplicones de herpes virus, baculovirus u otros virus para conseguir un tropismo deseado asociado con otro virus. Por ejemplo, las ITR de AAV4 podrían insertarse en el herpes virus y las células podrían infectarse. Después de la infección, las ITR de AAV4 podrían actuar por rep de AAV4 proporcionada en el sistema o en un vehículo diferente para rescatar AAV4 del genoma. Por lo tanto, el tropismo celular del virus del herpes simple puede combinarse con integración dirigida mediada por rep de AAV4. Otros virus que podrían utilizarse para construir virus quiméricos incluyen lentivirus, retrovirus, vectores retrovirales pseudotipados, y vectores adenovirales.

Esta invención también proporciona vectores AAV variantes. Por ejemplo, la secuencia de un AAV nativo, tal como AAV5, pueden modificarse en nucleótidos individuales. La presente invención incluye vectores AAV nativos y mutantes. La presente invención incluye adicionalmente todos los serotipos de AAV.

FIV es un virus de envuelta con un perfil de seguridad fuerte en seres humanos; los individuos mordidos o arañados por gatos infectados por FIV no se seroconvierten y no se ha informado que muestren ningún síntoma de enfermedad. Como el AAV, el FIV proporciona expresión transgénica duradera en neuronas de ratón y primate no humano, y la transducción puede dirigirse a diferentes tipos celulares por pseudotipado, el proceso de intercambio de la envuelta nativa del virus por una envuelta de otro virus.

Por tanto, como será evidente para un especialista en la técnica, está disponible una diversidad de vectores virales adecuados de expresión para transferir material de ácido nucleico exógeno a células. La selección de un vector de expresión apropiado para expresar un agente terapéutico para una condición particular susceptible a terapia de silenciamiento génico y la optimización de las condiciones para inserción del vector de expresión seleccionado en la célula, están dentro del alcance de un especialista en la técnica sin la necesidad de experimentación excesiva.

En otra realización, el vector de expresión está en forma de un plásmido, que se transfiere a las células diana por uno de una diversidad de métodos: físico (por ejemplo, microinyección, electroporación, carga por raspado, bombardeo de micropartículas) o por captación celular como un complejo químico (por ejemplo, co-precipitación con calcio o estroncio, formación de complejos con lípidos, formación de complejos con ligando). Están disponibles varios productos comerciales para formación de complejos con liposomas catiónicos incluyendo Lipofectin™ (Gibco-BRL, Gaithersburg, Md.) y Transfectam™ (Promega®, Madison, Wis.). Sin embargo, la eficacia de transfección por estos métodos es muy dependiente de la naturaleza de la célula diana y, por consiguiente, deben optimizarse las condiciones para la transfección óptima de ácidos nucleicos a células usando los procedimientos mencionados en

este documento. Dicha optimización está dentro del alcance de los especialistas en la técnica sin necesidad de experimentación excesiva.

VI. Enfermedades y afecciones susceptibles a los métodos de la invención

En las ciertas realizaciones de la presente invención, un destinatario mamífero para un casete de expresión de la invención tiene una afección que es susceptible a terapia por silenciamiento génico. Como se usa en este documento, "terapia por silenciamiento génico" se refiere a la administración al destinatario de material de ácido nucleico exógeno que codifica un ARNip terapéutico y la posterior expresión del material de ácido nucleico administrado *in situ*. Por tanto, la expresión "afección susceptible a terapia con ARNip" abarca afecciones tales como enfermedades genéticas (es decir, una patología que se puede atribuir a uno o más defectos génicos), patologías adquiridas (es decir, una afección patológica que no se puede atribuir a un defecto innato), cánceres, enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, trastornos por repetición de trinucleótidos, y procesos profilácticos (es decir, prevención de una enfermedad o de una afección médica indeseada). Un gen "asociado con una afección" es un gen que es la causa, o es parte de la causa, de la afección a tratar. Ejemplos de dichos genes incluyen genes asociados con una enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, una enfermedad por repetición de trinucleótidos tal como una enfermedad asociada con repeticiones de poliglutamina, enfermedad de Huntington, y varias ataxias espinocerebelosas), y genes que codifican ligandos para quimioquinas implicadas en la migración de células cancerosas, o receptor de quimioquinas. También pueden usarse ARNip expresados a partir de vectores virales para terapia antiviral *in vivo* usando los sistemas de vector descritos.

Por consiguiente, como se usa en este documento, la expresión "ARNip terapéutico" se refiere a cualquier ARNip que tiene un efecto beneficioso sobre el destinatario. Por tanto, "ARNip terapéutico" abarca ARNip tanto terapéutico como profiláctico.

Las diferencias entre alelos que son susceptibles a abordarse por ARNip incluyen mutaciones que causan enfermedad así como polimorfismos que no son en sí mismos mutaciones, pero pueden estar ligados a una mutación o asociados con una predisposición a una patología. Un ejemplo de un polimorfismo abordable que no es en sí mismo una mutación es el polimorfismo en el exón 58 asociado con enfermedad de Huntington.

Los polimorfismos de un único nucleótido comprenden la mayor parte de la diversidad genética entre los seres humanos. El factor de riesgo principal para desarrollar enfermedad de Alzheimer es la presencia de un polimorfismo particular en el gen de la apolipoproteína E.

Los polimorfismos de un único nucleótido comprenden la mayor parte de la diversidad genética entre los seres humanos, y muchos genes de enfermedad, incluyendo el gen de HD en la enfermedad de Huntington, contienen numerosos polimorfismos de un único nucleótido o múltiples nucleótidos que podrían abordarse por separado en un alelo frente al otro. El factor de riesgo principal para desarrollar enfermedad de Alzheimer es la presencia de un polimorfismo particular en el gen de la apolipoproteína E.

A. Defectos génicos

Se han identificado varias enfermedades causadas por defectos génicos. Por ejemplo, esta estrategia puede aplicarse a una clase principal de trastornos neurológicos incapacitantes. Por ejemplo esta estrategia puede aplicarse a las enfermedades por poliglutamina, como se demuestra por la reducción de agregación de poliglutamina en células después de la aplicación de la estrategia. La enfermedad neurodegenerativa puede ser una enfermedad por repetición de trinucleótidos, tal como una enfermedad asociada con repeticiones de poliglutamina, incluyendo la enfermedad de Huntington, y varias ataxias espinocerebelosas. Además, esta estrategia puede aplicarse a un trastorno neurológico no degenerativo, tal como distonía DYT1.

B. Patologías adquiridas

Como se usa en este documento, "patología adquirida" se refiere a una enfermedad o síndrome manifestado por estado fisiológico, bioquímico, celular, estructural o molecular anormal. Por ejemplo, la enfermedad podía ser una enfermedad vírica, tal como hepatitis o SIDA.

C. Cánceres

La afección susceptible a terapia por silenciamiento génico, como alternativa, puede ser un trastorno genético o una patología adquirida que se manifiesta por proliferación celular anormal, por ejemplo, cáncer. De acuerdo con esta realización, la presente invención es útil para silenciar un gen implicado en actividad neoplásica. La presente invención también puede usarse para inhibir la sobre-expresión de uno o varios genes. La presente invención puede usarse para tratar neuroblastoma, meduloblastoma, o glioblastoma.

VII. Dosificaciones, formulaciones y vías de administración de los agentes de la invención

Los agentes de la invención se administran preferiblemente de modo que provoquen una reducción en al menos un síntoma asociado con una enfermedad. La cantidad administrada variará dependiendo de diversos factores incluyendo, aunque sin limitación, la composición elegida, la enfermedad particular, el peso, el estado físico, y la edad del mamífero, y si tiene conseguirse prevención o tratamiento. Dichos factores puede determinarlos fácilmente el médico empleando modelos animales u otros sistemas de ensayo, que son bien conocidos en la técnica.

La administración del ARNip puede conseguirse a través de la administración de la molécula de ácido nucleico que codifica el ARNip. Las formulaciones farmacéuticas, dosificaciones y vías de administración para ácidos nucleicos son generalmente conocidas.

La presente invención concibe el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad neurodegenerativa, en un mamífero mediante la administración de un agente, por ejemplo, una composición de ácido nucleico, un vector de expresión, o una partícula viral de la invención. La administración de los agentes terapéuticos de acuerdo con la presente invención puede ser continua o intermitente dependiendo, por ejemplo, del estado fisiológico del destinatario, sin el propósito de la administración es terapéutico o profiláctico, y otros factores conocidos para los facultativos especialistas. La administración de los agentes de la invención puede ser esencialmente continua durante un periodo preseleccionado de tiempo o puede ser en una serie de dosis espaciadas. Se contempla tanto la administración local como sistémica.

Puede administrarse una o más formas monodosis adecuadas que tengan el agente o agentes terapéuticos de la invención que, como se analiza a continuación, pueden formularse opcionalmente para liberación sostenida (por ejemplo usando microencapsulación, véase el documento WO 94/07529, y la patente de Estados Unidos N° 4.962.091), mediante una diversidad de vías incluyendo parenteral, incluyendo por vía intravenosa e intramuscular, así como por inyección directa en el tejido enfermo. Por ejemplo, el agente terapéutico puede inyectarse directamente en el cerebro. Como alternativa el agente terapéutico puede introducirse de forma intratecal para afecciones cerebrales y de médula espinal. En otro ejemplo, el agente terapéutico puede introducirse de forma intramuscular para virus que circulan de vuelta a las neuronas afectadas desde el músculo, tales como AAV, lentivirus y adenovirus. Las formulaciones pueden, cuando sea apropiado, presentarse convenientemente en formas monodosis concretas y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en farmacia. Dichos métodos pueden incluir la etapa de poner en asociación el agente terapéutico con vehículos líquidos, matrices sólidas, vehículos semi-sólidos, vehículos sólidos finamente divididos o combinaciones de los mismos, y después, si fuera necesario, introducir o conformar el producto en el sistema de suministro deseado.

Cuando los agentes terapéuticos de la invención se preparan para administración, se combinan preferiblemente con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable para formar una formulación farmacéutica, o forma monodosis. Los ingredientes activos totales en dichas formulaciones incluyen del 0,1 al 99,9% en peso de la formulación. Uno "farmacéuticamente aceptable" es un vehículo, diluyente, excipiente, y/o sal que es compatible con los otros ingredientes de la formulación, y no perjudicial para el destinatario de la misma. El ingrediente activo para administración puede estar presente en forma de un polvo o como gránulos, como una solución, una suspensión o una emulsión.

Las formulaciones farmacéuticas que contienen los agentes terapéuticos de la invención pueden prepararse por procedimientos conocidos en la técnica usando ingredientes bien conocidos y fácilmente disponibles. Los agentes terapéuticos de la invención también pueden formularse como soluciones apropiadas para administración parenteral, por ejemplo por vías intramuscular, subcutánea o intravenosa.

Las formulaciones farmacéuticas de los agentes terapéuticos de la invención también pueden adoptar la forma de una solución o dispersión acuosa o anhidra, o como alternativa la forma de una emulsión o suspensión.

Por tanto, el agente terapéutico puede formularse para administración parenteral (por ejemplo, por inyección, por ejemplo, inyección en embolada o infusión continua) y puede presentarse en forma monodosis en ampollas, jeringas pre-cargadas, recipientes de infusión de volumen pequeño o en recipientes multi-dosis con un conservante añadido. Los ingredientes activos pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones, o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, los ingredientes activos pueden estar en forma de polvo, obtenidos por aislamiento aséptico de un sólido estéril o por liofilización a partir de una solución, para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

Se apreciará que el contenido unitario de ingrediente o ingredientes activos contenido en una dosis individual de aerosol de cada forma de dosificación no tiene que constituir en sí mismo una cantidad eficaz para tratar la indicación o enfermedad particular ya que la cantidad eficaz necesaria puede alcanzarse por administración de una pluralidad de unidades de dosificación. Además, la cantidad eficaz puede conseguirse usando menos que la dosis en la forma de dosificación, de forma individual, o en una serie de administraciones.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir, como ingredientes opcionales, vehículos, diluyentes, agentes solubilizantes o emulsionantes, y sales farmacéuticamente aceptables del tipo que es bien

conocido en la técnica. Ejemplos no limitantes específicos de los vehículos y/o diluyentes que son útiles en las formulaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen agua y soluciones salinas tamponadas fisiológicamente aceptables tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato de pH 7,0-8,0, soluciones salinas y agua.

5 La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes Ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

10 Silenciamiento por iARN

Los presentes inventores modificaron mir-30 humano para que contuviera secuencias específicas para genes de interés (Fig. 1). Se conservaron las secuencias de la base del tronco y el bucle.

15 Los inventores fueron capaces de silenciar un gen diana con lanzaderas de miARN. Se clonó el gen diana (en este caso Ataxina-1, también llamada SCA1) y también se generó el miARN de SCA1, como se indica en la Fig. 2. Se realizó microscopía de fluorescencia y análisis de transferencia de Western y los resultados indicaron silenciamiento dependiente de dosis de ataxina-1 48 horas después de la co-transfección de células HEK293 con plásmidos a iARN:Diana.

20 A continuación, se diseñó un estudio de comparación para comparar eficacias de silenciamiento de diversos vectores de iARN y para evaluar la incorporación de hebra en RISC usando un sistema indicador artificial altamente sensible. Los inventores quisieron aprender qué vector es el más óptimo, y si los resultados permanecían constantes independientemente de la diana. Como ambas hebras de ARNip tienen el potencial de entrar en el complejo RISC, se generaron construcciones diana de iARN artificiales en ambas direcciones (Fig. 3). Las hebras antisentido de guía abordan dianas con sentido (por ejemplo, SCA1-Con sentido), mientras que las hebras con sentido de ARNip abordan dianas antisentido (por ejemplo, SCA1-Antisentido).

25 En primer lugar, se compararon moléculas de miARN con moléculas de ARNhc de "1ª generación" (Fig. 4). Los ARNhc de 1ª generación cargan preferentemente la hebra no pretendida. Además, estos ARNhc carecen de los salientes 3' de 2-nt que son sustratos óptimos para la maquinaria de la vía de iARN.

30 Para comparar equitativamente las estrategias de iARN, se diseñaron ARNhc optimizados (moléculas de ARNhc de "2ª generación") para imitar los pre-miARN (es decir, escindidos por Drosha), que se indican como flechas en la Fig. 5. Se generaron miARN correspondientes para tomar en cuenta la G (U6+1) y UU (terminador de polIII) implicados en la transcripción del ARNhc. Usando las moléculas de ARNhc de 2ª generación, la iARN contra HD y SCA1 mostró resultados similares (transferencia de Northern y direccionamiento a siChk2) a las construcciones de iARN de eGFP (Fig. 6 y 7). La compilación de los resultados del ensayo de luciferasa Dual-Glo® de 10 experimentos de comparación de iARN (4 eGFP, 4 SCA1 y 2 HD) usando las dianas artificiales siChk2 se compararon respecto a la iARN simulada (Fig. 8). Esta tendencia en la eficacia de silenciamiento también se observó cuando se abordaba eGFP natural y SCA1 o HD endógeno (datos no mostrados).

Seguridad simulada de vectores de iARN

45 Los inventores también investigaron cómo de extensamente alteran los enfoques de expresión de iARN el procesamiento y función de miARN endógeno. Los inventores diseñaron un experimento de seguridad de iARN simulado *in vitro*. Se transfectaron células 293 con U6.miGFP y siChk2-eGFP Diana (1:1). Se co-transfectaron "adiciones" de iARN no específicas (U6.shSCA1 o U6.miSCA1) para evaluar su eficacia sobre el silenciamiento mediado por miGFP. En este experimento, un aumento en la luz era evidencia de toxicidad (es decir, saturación de la vía de iARN). Los resultados indicaron que en estudios de seguridad, los ARNhc a bajas dosis inhiben el procesamiento de y el silenciamiento mediado por miARN artificiales. Los resultados también indicaron que los miARN a altas dosis solamente causan inhibición mínima. Es importante observar que la eficacia de silenciamiento del ARNhc (baja dosis) y el miARN (alta dosis) son similares (Fig. 9).

50 También se examinó la seguridad de iARN en células C2C12 (Fig. 10). Las células tratadas con ARNhc mostraron viabilidad celular disminuida en comparación con las células tratadas con miARN.

Seguridad *in vivo* de vectores de iARN en músculo

60 Los inventores co-electroporaron plásmidos miIndicador y GFP:U6.iARN en el tibialis anterior (ARNhc:Izquierda o miARN:Derecha) (Fig. 11). Se usaron imágenes IVIS para luciferasa de luciérnaga o Renilla y GFP. Los inventores quisieron aprender si había alteración de la función de miARN endógeno (es decir, más luz) entre los diferentes vectores. Los resultados muestran que los vectores de miARN eran seguros *in vivo* (Fig. 12).

65 En conclusión, los inventores descubrieron que el enfoque de miARN es más eficaz que el ARNhc de 1ª generación; que los ARNhc de 2ª generación optimizados silencian de forma más eficaz que los miARN; que los ARNhc inhiben

el silenciamiento mediado por miARN sustancialmente más que los correspondientes vectores lanzadera de miARN; y que las estrategias basadas en miARN proporcionan terapéutica más segura.

Ejemplo 2

5 Silenciamiento de HD en cuerpo estriado de ratón

Se inyectaron vectores AAV para moléculas de iARN específicas para una diana en cuerpo estriado de ratón. Cuatro meses después, se recogieron cuerpos estriados GFP-positivos, y se aisló el ARN. Se realizó Q-PCR para HD y CD11b de ratón, así como transferencias de Northern (Fig. 13). La expresión de alto nivel a partir de ARNhc explica la toxicidad observada.

Se generaron moléculas de miARN siguiendo la estrategia expuesta en las Fig. 14 y 15.

15 Ejemplo 3

Se clonó un casete de expresión (5'NheI-3'BglII) que contenía el promotor CMV, sitio de clonación múltiple (MCS) y señal de poliadenilación de SV40 en TOPObluntII (XbaI-8amHI, Invitrogen™) en orientación inversa. Se clonó un casete de expresión de polIII que contenía el promotor U6 de ratón, MCS y terminador de PolIII (6T) en TOPObluntII con la misma estrategia. Se generaron lanzaderas de miARN por extensión con polimerasa de oligonucleótidos de ADN solapantes (IDT). Se digirieron los productos prolongados por polimerasa con XhoI-SpeI y se clonaron en el MCS de los vectores de expresión XhoI-SpeI (miV1) o XhoI-XbaI (miV2). La producción de shHD2.1 se ha descrito previamente. Se clonaron otros ARNhc usando una estrategia PCT con cola. Los productos de PCR que contenían U2-ARNhc-6T se clonaron en TOPO en el vector bluntII y los clones positivos se consideraron en orientación inversa para mantener la coherencia con los otros vectores de expresión.

Se construyeron vectores indicadores de luciferasa de iARN usando psiCheck2 (Promega®). Se usó PR con cola para amplificar un fragmento 3' de luciferasa de *Renilla* que contenía un único sitio diana de iARN complementario perfecto (~25 pb: 21 pb diana + 2 nt 5' y 3') cadena abajo del codón de parada. Este producto de PCR se digirió con AatII-XhoI y se clonó en los mismos sitios dentro de psiCheck2. Las secuencias de vector se muestran en la Fig. 16. La Figura 19 muestra secuencias adicionales de miARN que se usaron para abordar HD o SCA1. Éstas son las estructuras de tronco-bucle de ARN predichas que contienen las secuencias activas de iARN. La hebra antisentido activa de la secuencia de ARNip incluida está subrayada.

35 La Figura 17 muestra la estructura básica de miARN de la Variante 2. La Variante 1 y Variante 3 forman estructuras únicas que dirigen un procesamiento por Droscha menos eficaz que la Variante 2. Fue inesperado que la Variante 2 fuera mucho más eficaz que las Variantes 1 y 3, en base al algoritmo de diseño.

Las Variantes 1 y 3 pueden proporcionar alternativas para deducir estrategias adicionales de iARN. Si se desea un alto grado de silenciamiento, entonces se usaría la Variante 2. Si, sin embargo, se deseara un grado menor de silenciamiento, se usaría la Variante 1 o 3. La región recuadrada mostrada en la Fig. 17 indica una región que afecta a la eficacia de silenciamiento, presumiblemente por influencia en la eficacia o precisión de la escisión por Droscha. La región está localizada en las 10-12 pares de bases de la base del tronco desde los sitios de escisión por Droscha. La eficacia de silenciamiento se mejoró cuando esta región se hacía inestable (es decir, sin apareamiento de bases o bucle abultado). La eficacia de silenciamiento se reduce cuando esta región se hace más estable (es decir, apareamiento de bases, sin bucle o bucle pequeño). Las Variantes 1 y 3 contienen conformaciones más estables y, por tanto, son menos eficaces que la Variante 2.

Para mejorar la estrategia de iARN, los inventores investigaron el uso de miARN artificiales como lanzaderas de ARNip. Los inventores modificaron el transcrito primario de miR-30 humano reemplazando la región miR-30 madura (dúplex de ~20 pb que se escinde mediante procesamiento secuencial por Droscha y Dicer) con secuencias deseadas de ARNip (Fig. 18A). La estructura de miR-30 se ha caracterizado bien, y los sitios principales de escisión por Droscha y Dicer se han validado experimentalmente. Los inventores generaron miARN artificiales que contenían los elementos estructurales dentro de la base del tronco necesarios para el procesamiento eficaz por Droscha pero por lo demás desprovistos de secuencias flanqueantes naturales de miR-30. Con esta estrategia, las secuencias flanqueantes (~35-nt cadena arriba y ~40-nt cadena abajo) surgen de la secuencia del vector dentro del sitio de clonación múltiple (MCS). Aunque los elementos mínimos de secuencia necesarios para el procesamiento de miR-30 son conocidos, no se han evaluado los efectos de las secuencias flanqueantes, y por consiguiente la estructura del transcrito dentro de la base de tronco-bucle cercana, sobre la eficacia de procesamiento. Para ensayar esto, los inventores generaron variantes lanzadera de miR-30 que se ha predicho que forman estructuras únicas de ARN proximales a la base de un tronco-bucle de miARN idéntico (Fig. 18A, B). Se desarrollaron indicadores de luciferasa que contenían un sitio diana de ARNip (~25 pb) dentro de la 3'UTR, en este documento mencionados como indicadores de luciferasa de iARN (Fig. 18C), para evaluar eficacias de silenciamiento en estudios de co-transfección. Las secuencias flanqueantes influyeron en la eficacia de silenciamiento respecto al mismo tronco-bucle de miARN flanqueado por secuencias naturales de miR-30 humano (Fig. 18D). De forma notable, una variante de miARN (miV2) produjo un 20% más de silenciamiento génico que la estructura natural de miR-30 (P <

0,01). Este silenciamiento mejorado probablemente era el resultado de un procesamiento mejorado, ya que miV2 generó más ARN antisentido determinado por transferencia de Northern de transcrito pequeño. De forma interesante, miV2 muestra una región de naturaleza monocatenaria (Fig. 18B, región sombreada) que puede promover la unión del complejo Drosha-DGCR8, como sostienen los modelos para el procesamiento de pri-miARN.

5

Ejemplo 4

Minimizar variables entre vectores de iARN basados en horquilla revela la potencia de los ARNhc

10 La interferencia de ARN (iARN) es un proceso celular evolutivamente conservado que regula la expresión génica y participa en la defensa innata contra elementos transponibles e invasión vírica. La iARN media el silenciamiento génico específico de secuencia mediante ARN bicatenarios (ARNbc) que pueden procesarse por Dicer en ARN pequeños funcionales [ARN interferentes pequeños (ARNip) y microARN (miARN) entre otros]. Los ARN pequeños asociados con el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) o complejos tipo RISC median el
15 silenciamiento génico post-transcripcional abordando transcritos para la degradación o represión traduccional. Además, los ARN pequeños en complejos tipo RISC pueden dirigir la formación de heterocromatina para mediar e silenciamiento génico transcripcional.

20 La iARN se ha utilizado como herramienta para indagar la función génica y se está desarrollando como modalidad para terapia de enfermedades. Se ha expresado iARN exógeno en células cultivadas y organismos como ARN de horquilla corta (ARNhc) o miARN artificiales (Fig. 18A). La unidad transcripcional básica de un ARNhc es secuencias con sentido y antisentido conectadas por un bucle de nucleótidos desapareados. Los ARNhc se exportan desde el núcleo por Exportina-5, y una vez en el citoplasma, se procesan por Dicer para generar ARNip funcionales. Los troncos-bucles de miARN se expresan típicamente como parte de transcritos primarios más largos (pri-miARN). El
25 complejo Drosha-DGCR8 escinde los intermedios que generan troncos-bucles conocidos como pre-miARN, que se exportan posteriormente al citoplasma y se cortan en ARN pequeños funcionales.

30 Estudios previos de varios laboratorios, incluyendo el de los inventores, demuestran la utilidad y eficacia de los ARNhc *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, el uso de miARN artificiales (estructuras de pri-miARN que transportan secuencias de ARNip) como vectores de iARN se ha convertido en una alternativa atractiva. Los miARN artificiales se parecen de forma más natural a sustratos endógenos de iARN y son más susceptibles a transcripción por Pol-II (que permite la expresión específica de tejido de iARN) y estrategias policistrónicas (que permite el suministro de múltiples secuencias de ARNip). Una cuestión persistente en el campo, sin embargo, es que el sistema de expresión de iARN es más óptimo para conseguir silenciamiento génico en aplicaciones particulares.

35 La optimización de estrategias de iARN sigue siendo importante debido a los efectos secundarios potenciales causados por iARN suministro de forma exógena. Los vectores de iARN pueden competir por la maquinaria endógena de iARN, estimular las respuestas celulares a ARNbc, o silenciar ARNm diana no pretendidos debido a complementariedad parcial. Estos efectos secundarios pueden producir toxicidad celular severa e incluso provocar
40 muerte orgánica. Las estrategias mejoradas de silenciamiento génico basado en iARN pueden permitir el suministro de dosis inferiores, reduciendo de este modo la probabilidad de efectos secundarios relacionados con iARN.

45 Hasta la fecha, las estrategias basadas en ARNhc y miARN artificiales se han comparado con resultados contradictorios. En ciertas comparaciones, los ARNhc ensayados tenían salientes 5' sub-óptimos debido a disposiciones variables de las secuencias de inicio de la transcripción y parada, algunas causadas de forma inadvertida por el uso de sitios de enzimas de restricción durante la producción del vector. Esto plantea dudas ya que informes recientes han demostrado que salientes 3' de 2-nt, a menudo observados en pre-miARN naturales, son sustratos óptimos para Exportina-5 y Dicer. Además, ninguna de las comparaciones previas basadas en horquilla evaluó la equivalencia de la preferencia de hebra. Preferencia de hebra se refiere a cuál de las hebras del dúplex de
50 ARNip entra en el RISC y media el silenciamiento génico. En general, la hebra con el apareamiento de bases más débil cerca del extremo 5' se incorporará en el RISC. Por tanto, pueden contradecirse las comparaciones de ARNhc y miARN artificiales si los vectores, después del procesamiento, liberan ARNip que muestran preferencia de hebra diferencial (es decir, uno que carga la hebra antisentido pretendida y otro que carga la hebra con sentido no pretendida). De hecho, un desplazamiento de un único par de bases durante el procesamiento del sustrato de iARN
55 puede alterar la hebra del ARNip resultante que entra preferentemente en el RISC, poniendo de relieve por tanto la importancia de evaluar la preferencia de hebra en estudios de comparación de vectores de iARN.

60 Los presentes inventores han demostrado el modo en que los ARNhc de primera generación con mala preferencia de hebra contradicen la comparación de enfoques de iARN basados en horquilla. Minimizar las variables para comparación revela que, para tres secuencias diana independientes y en diferentes entornos (*in vitro* e *in vivo*), los ARNhc son más potentes que los miARN artificiales.

RESULTADOS

65 Desarrollo de una lanzadera de ARNip basada en miR-30 mejorado

Los inventores han demostrado previamente la eficacia terapéutica de los ARNhc en modelos de ratón de enfermedades neurodegenerativas [Ataxia Espinocerebelosa Tipo I (SCA1) y enfermedad de Huntington (HD)] (Xia et al., Nat Med, 10(8), 816-820 (2004); Harper et al., 2005, PNAS, 102: 5820-5825). Para mejorar la estrategia de iARN, los inventores investigaron el uso de miARN artificiales como lanzaderas de ARNip. Los inventores modificaron el transcrito primario de miR-30 humano reemplazando la región miR-30 madura (dúplex de ~20 pb que se escinde mediante procesamiento secuencial con Drosha y Dicer) con secuencias deseadas de ARNip (Fig. 18A). La estructura de miR-30 se ha caracterizado bien, y se han validado experimentalmente los sitios principales de escisión por Drosha y Dicer. Los inventores generaron miARN artificiales que contenían los elementos estructurales dentro de la base del tronco necesarios para el procesamiento eficaz por Drosha pero por lo demás desprovistos de secuencias flanqueantes miR-30 naturales. Con esta estrategia, las secuencias flanqueantes (~35-nt cadena arriba y ~40-nt cadena abajo) surgen de la secuencia del vector dentro del sitio de clonación múltiple (MCS). Aunque los elementos de secuencia mínimos necesarios para el procesamiento de miR-30 son conocidos, no se han evaluado los efectos de secuencias flanqueantes, y por consiguiente la estructura del transcrito dentro de la base de tronco-bucle cercana, sobre la eficacia de procesamiento. Para ensayar esto, los inventores generaron variantes lanzadera de miR-30 que se ha predicho que forman estructuras de ARN únicas proximales a la base de un tronco-bucle de miARN idéntico (Fig. 18A, B). Se desarrollaron indicadores de luciferasa que contienen un sitio diana de ARNip (~25 pb) dentro de la 3'UTR, en este documento mencionados como indicadores de luciferasa de iARN (Fig. 18C), para evaluar las eficacias de silenciamiento en estudios de co-transfección. Las secuencias flanqueantes variantes influyeron en la eficacia de silenciamiento respecto al mismo tronco-bucle de miARN flanqueado por secuencias naturales de miR-30 humano (Fig. 18D). De forma notable, una variante de miARN (miV2) produjo un 20% más de silenciamiento génico que la estructura natural de miR-30 ($P < 0,01$). Este silenciamiento mejorado probablemente fue el resultado de un procesamiento mejorado, ya que miV2 generó más ARN antisentido determinado por transferencia de Northern de transcrito pequeño (Fig. 18E). De forma interesante, miV2 muestra una región de naturaleza monocatenaria (Fig. 18B, región sombreada) que puede promover la unión del complejo Drosha-DGCR8, como sostienen los modelos para el procesamiento de pri-miARN.

La preferencia de hebra contradice las comparaciones basadas en horquilla

Los inventores a continuación desarrollaron lanzaderas de miR-30 (miV1 y miV2) que contenían secuencias de ARNip basadas en HD2.1 [aborda el transcrito del gen de la enfermedad de Huntington humana (HD)] para comparar con shHD2.1 de horquilla corta (un ARNhc previamente ensayado en estudios de eficacia terapéutica en un modelo de ratón para HD (Harper et al., 2005, PNAS, USA 102: 5820-5825)). El procesamiento de las variantes miHD2.1 dirigidas por CMV y shHD2.1 dirigido por U6 se evaluó por análisis de transferencia de Northern de transcrito pequeño (Fig. 4A). Las lanzaderas basadas en miARN produjeron más ARN antisentido que el vector de ARNhc que generó una abundancia de ARN de tronco-bucle precursores no procesados. Además, miV2 generó más ARN antisentido que miV1 como se ha observado previamente en la Fig. 18E. De forma importante, la mejora en los miARN artificiales sobre el ARNhc no fue el resultado de discrepancias de promotor ya que los vectores U6-miARN fueron incluso más potente que los vectores CMV-miARN (Fig. 26; $P < 0,01$).

Se evaluaron las eficacias de silenciamiento de CMV-miHD2.1 (V2) y U6-shHD2.1 contra transcritos endógenos de HD por Q-PCR después de transfección de vectores de expresión de iARN en células HEK293 derivadas de ser humano. Coherente con nuestros resultados de transferencia de Northern, miHD2.1 demostró un silenciamiento aproximadamente un 50% mejorado del ARNm de HD endógeno respecto a shHD2.1 (Fig. 4B; $P < 0,05$). Estos hallazgos apoyan los datos previos que muestran que las estrategias basadas en miARN son más potentes que los ARNhc de primera generación. Sin embargo, como recientes trabajos han demostrado que la preferencia de hebra afecta al silenciamiento génico mediado por ARNip, los inventores ensayaron si shHD2.1 y miHD2.1 (ambos dirigidos por U6) cargaban de forma preferente la hebra antisentido pretendida o la hebra con sentido no pretendida. Los inventores diseñaron indicadores de luciferasa de iARN que contenían sitios diana con sentido o antisentido para evaluar la actividad de silenciamiento de cada hebra. Estudios de co-transfección revelaron que shHD2.1 silenciaba preferentemente la diana no pretendida, mientras que miHD2.1 favorecía el silenciamiento de la hebra pretendida (Fig. 4C). Estos datos son importantes ya que demuestran que preferencias de hebra dispares pueden contradecir las comparaciones de enfoque basados en ARNhc y miARN.

La expresión y potencia de ARNhc es dependiente de saliente

Para comparar más completamente las estrategias de silenciamiento basadas en ARNhc y miARN, los inventores diseñaron ARNhc usando la estructura predicha de troncos-bucles de miR-30 escindidos con Drosha como guía de diseño. Estos ARNhc se diseñaron para que tuvieran salientes 3' minimizados (2-4 U resultantes de terminación de Pol-III) para parecerse a los salientes 3' de 2-nt que resultan de la escisión con Drosha. Los salientes de esta longitud proporcionan sustratos óptimos para Exportina-5 y Dicer. Además, se seleccionaron secuencias diana para dar cuenta del nucleótido +1-G del promotor U6 de ratón y para que contuvieran extremos 3' ricos en AU, ambos cuales promueven la carga de la hebra antisentido. Aunque el diseño de ARNhc de este modo se está convirtiendo en una práctica común, los estudios iniciales de comparación ARNhc - miARN ensayaron ARNhc con salientes sub-óptimos. Por tanto, los inventores revisaron el ensayo de los efectos de los salientes de ARNhc (5' y 3') sobre la eficacia de procesamiento y silenciamiento. Los inventores desarrollaron una serie de vectores que expresaban un ARNhc común pero con longitudes alteradas de saliente, en ciertos casos, que se parecen a aquellos (es decir,

variantes 5') encontrados en estudios de comparación previos de ARNhc y miARN artificiales (Fig. 21 A). Los análisis de transferencia de Northern y densitometría mostraron que los ARNhc con los salientes mínimos 3'-U₂₋₄ producen 3 y 4 veces más pre-ARNhc (no procesado) y ARN antisentido (procesado), respectivamente, que los ARNhc con salientes 5' (Fig. 21B). Inesperadamente, parece que los niveles de expresión de ARNhc disminuyen con el alargamiento de los salientes 5' o 3'. Los inventores presumen que salientes sub-óptimos disminuyen la estabilidad del transcrito de ARNhc, considerando que todas las variantes se expresaron por el mismo promotor U6 de ratón y solamente diferían en hasta 27-nt de longitud.

En estudios de silenciamiento génico que abordan un indicador de luciferasa de iARN co-transfectado, los inventores descubrieron que los ARNhc con salientes mínimos (3'-U₂₋₄ o 3'-CU₂₋₄) eran más eficaces ($P < 0,001$), aunque la eficacia se compromete tras aumentar los salientes 5' o 3' (Fig. 21C). Los análisis de transferencia de Northern y los estudios de silenciamiento génico que abordan indicadores de luciferasa de iARN con sentido o antisentido demostraron que cada variante de ARNhc favorecía la carga de la hebra antisentido pretendida (Fig. 21B, C). Aunque los ARNhc con salientes más largos muestran proporciones ligeramente reducidas de silenciamiento pretendido: no pretendido, sus eficacias disminuidas de silenciamiento probablemente resulten de una estabilidad y procesamiento reducidos del transcrito como sostiene nuestros datos de transferencia de Northern.

Minimización de las variables entre vectores de miARN artificial y ARNhc para comparación

A continuación, los inventores buscaron comparar los miARN artificiales (Fig. 18, miV2) y ARNhc (Fig. 22A, 3'U₂₋₄) mejorados para la eficacia de procesamiento y silenciamiento. Para ensayar la coherencia de los resultados independientemente de la diana y la secuencia, los inventores diseñaron vectores basados en ARNhc y miARN que abordan ARNm de SCA1, HD, y GFP - proporcionando los dos primeros construcciones para ensayar adicionalmente en desarrollo terapéutico. De forma importante, y exclusivo de otras comparaciones de ARNhc y miARN (Boden et al., 2004, Nucleic Acids Res 32: 1154-1158; Silva et al., 2005, Nat Genet 37:1281-1288; Li et al., 2007, RNA 13: 1765-1774), los miARN artificiales de los inventores se ajustaron para dar cuenta de las restricciones de nucleótidos asociadas con la transcripción con Pol-III de ARNhc (Fig. 22A, B). Por tanto, después de la escisión con Droscha, los pre-miARN serían comparables con los ARNhc y el procesamiento posterior de cada tronco-bucle por Dicer produciría especies similares de ARNip. Esta es una consideración importante ya que un desplazamiento de un único par de bases puede alterar la preferencia de hebra o potencia del ARNip resultante.

Para evaluar el procesamiento de los vectores actuales, los inventores realizaron 3'-RACE para identificar los extremos 3' de las hebras con sentido y antisentido de los ARNip generados por los correspondientes vectores de expresión de miARN artificial y ARNhc (Fig. 27). Hasta la fecha, ninguno de los estudios de comparación de vectores de iARN ha realizado este importante análisis para ensayar la equivalencia del procesamiento entre los vectores comparados. Los análisis 3'-RACE de los inventores revelaron que ambos vectores de iARN generaban al menos cuatro especies de ARNip que eran comunes entre los vectores. Estos hallazgos son coherentes con un informe previo que demostró flexibilidad (es decir, desplazamiento de pares de bases) en la escisión de ARNhc por Dicer (Vermeulen et al., 2005, RNA 11: 674-682). De forma notable, las especies más prevalentes generadas por los vectores de iARN estaban compartidas, lo que representa aproximadamente un 50% de las secuencias 3'-RACE analizadas ($n = 10-12$ por vector por hebra). Estos resultados apoyan la integridad de la comparación de miARN artificiales y ARNhc diseñados con la presente estrategia.

A continuación, los inventores evaluaron la preferencia de hebra de estos vectores de iARN que abordan indicadores de luciferasa de iARN con sentido o antisentido, ya que la preferencia de hebra incoherente contradecía nuestra comparación original (Fig. 4). En los tres pares de vector de iARN (SCA1, HD, y GFP), se observó una fuerte preferencia por el silenciamiento de la hebra pretendida tanto para los miARN artificiales como para los ARNhc (Fig. 23). Para los vectores de SCA1 y GFP, ninguna de las estrategias de expresión de iARN silenció las dianas no pretendidas, y se observó actividad solamente mínima de la hebra no pretendida con los vectores de iARN de HD. Estos resultados demuestran que la preferencia de hebra deseada es coherente para cada par de vector de iARN, manteniendo de este modo su idoneidad para estudios adicionales de comparación.

Los ARNhc muestran potencia mejorada respecto a los miARN artificiales

Como una comparación inicial de eficacia de silenciamiento génico, se co-transfectaron vectores de iARN y sus respectivos indicadores de luciferasa de iARN en células HEK293. Se compilaron los datos del ensayo de luciferasa de varios experimentos ($n = 4$ SCA1, $n = 2$ HD y $n = 4$ GFP), revelando que los ARNhc optimizados son más potentes que los miARN artificiales independientemente de las dosis ensayadas de iARN y la secuencia diana [Fig. 24A; $P < 0,001$ y $P < 0,05$ para dosis 1:1 y 3:1 (iARN:Diana) respectivamente]. De forma notable, esta eficacia mejorada de los ARNhc también se observó por par de vectores en nuestros estudios previos de preferencia de hebra (Fig. 23).

Aunque el direccionamiento de indicadores de luciferasa de iARN proporciona un medio cuantitativo y fácil para evaluar el silenciamiento génico, los inventores también quisieron evaluar las capacidades para estos vectores de iARN de silenciar sus dianas naturales. En células HEK293 transfectadas con plásmidos de expresión de iARN, las tendencias de silenciamiento de ARNhc > miARN también se observaron cuando se abordaban transcritos

endógenos de SCA1 o HD (Fig. 24B, C; $P < 0,05$ y $P < 0,001$ respectivamente). Además, el ARNhc que aborda GFP mostró potencia mejorada sobre el correspondiente miARN artificial después de co-transfección de plásmidos de expresión de iARN y GFP en células HEK293 (Fig. 24D; $P < 0,01$).

A continuación, los inventores compararon las eficacias de procesamiento de nuestros pares de vectores de miARN artificial y ARNhc *in vitro* después de transfección de plásmidos de expresión de iARN. Las transferencias de Northern de transcrito pequeño demuestran que, a diferencia de los ARNhc de primera generación (Fig. 4A), los ARNhc optimizados producen al menos 4 veces más ARN antisentido en comparación con miARN artificiales independientemente de la diana (Fig. 24E). Esta producción mejorada probablemente resulta de niveles de expresión mayores ya que los ARNhc optimizados aún generan altos niveles de precursor, mientras que los miARN artificiales muestran acumulación mínima de pri- o pre-transcritos.

Las aplicaciones *in vivo* de la iARN están llegando a usarse ampliamente para estudiar la función génica o para desarrollar agentes terapéuticos. Por tanto, los inventores compararon uno de los presentes pares de vectores (shSCA1 y miSCA1) para el silenciamiento génico en ratones. Como estas construcciones abordan SCA1 humano, y no SCA1 de ratón, los inventores midieron el silenciamiento *in vivo* de un indicador de luciferasa de iARN de SCA1 co-suministrado. Los plásmidos de iARN e indicadores de luciferasa de iARN se co-electroporaron en los músculos *tibialis anterior* de ratones, y se realizaron imágenes de bioluminiscencia para determinar el silenciamiento génico *in vivo* a los 4 y 8 días después del tratamiento. A proporciones 1:1 y 10:1 (iARN:Diana), los ARNhc muestran potencia mejorada sobre los miARN artificiales (Fig. 25). Estos resultados, junto con los datos *in vitro*, demuestran que los ARNhc pueden ser más potentes que los miARN independientemente de diana y entorno experimental (*in vitro* e *in vivo*).

DISCUSIÓN

Los inventores han desarrollado una nueva lanzadera de ARNip basada en miR-30 que muestra potencia mejorada sobre la lanzadera de miR-30 habitualmente usada que contiene secuencias flanqueantes naturales de miR-30. Los enfoques basados e miARN proporcionan una alternativa atractiva a los ARNhc clásicos; por tanto, los inventores compararon las eficacias de estos sistemas en la mediación del silenciamiento génico.

Los inventores presentan datos que demuestran que los análisis de comparación de ARNhc y miARN artificiales deben controlarse cuidadosamente, ya que la preferencia de hebra diferencial entre los vectores comparados puede generar resultados engañosos. Esta posibilidad, además del uso de ARNhc con salientes sub-óptimos, puede explicar las discrepancias entre estudios de comparación previamente publicados basados en horquilla. Los presentes análisis proporcionan una comparación equitativa de vectores basados en ARNhc y miARN, teniendo en consideración el producto transcrito, los sitios de procesamiento, y la preferencia de hebra. Cuando se minimizan las variables entre los dos sistemas, los ARNhc demuestran eficacia mejorada de silenciamiento respecto a sus equivalentes basados en miARN. Los presentes experimentos son únicos porque los inventores controlaron cuidadosamente el diseño del vector (por ejemplo, mantuvieron la longitud del tronco y las estructuras de bucle entre los vectores comparados), evaluaron la equivalencia de los ARNip generados y la preferencia de hebra, y validaron la potencia mejorada de los ARNhc *in vivo*. Además, los inventores demuestran que los ARNhc producen niveles abundantes de ARN antisentido precursor y completamente procesado respecto a los miARN artificiales, proporcionando de este modo una idea del mecanismo para explicar la potencia aumentada.

Los usuarios generales de iARN deben considerar cuidadosamente el equilibrio de eficacia y toxicidad cuando seleccionan la estrategia de expresión de iARN más adecuada. La potencia mejorada de los ARNhc optimizados puede contrarrestarse por cuestiones de toxicidad; altos niveles de sustratos de iARN (procesados y no procesados) generados a partir de vectores de expresión de ARNhc pueden saturar la maquinaria celular de iARN, interfiriendo de este modo con la biogénesis de miARN endógeno y la función en cultivo celular e *in vivo*.

La fuerte expresión de ARNhc optimizados puede ser deseable para ciertas aplicaciones. Por ejemplo, la toxicidad se minimiza probablemente en aplicaciones de bajo número de copias tales como la generación de líneas celulares estables mediante vectores retrovirales, que típicamente transducen de unas pocas a una copia por célula. Por tanto, los ARNhc pueden ser más adecuados que los vectores basados en miARN donde la expresión a bajo nivel impediría un silenciamiento suficiente. Como alternativa, los ARNhc pueden ser ventajosos cuando se silencian dianas altamente expresadas que pueden desplazar los bajos niveles de ARN antisentido; por ejemplo, direccionamiento terapéutico de virus invasivos o cánceres, donde limitar la toxicidad puede no ser la mayor prioridad.

Para algunas aplicaciones, deben suministrarse dosis altas de vector para conseguir una transducción eficaz de una población celular. Por tanto, pueden ser indeseables las estrategias de ARNhc si no pueden limitarse fácilmente las copias de vector por célula, como sucede a menudo *in vivo*, y minimizar la toxicidad es de alta prioridad. Además de la toxicidad basada en saturación, altos niveles de ARNip pueden promover el silenciamiento de dianas no pretendidas mediante complementariedad parcial. Por tanto, utilizar miARN artificiales, que muestran expresión inferior, puede proporcionar una oportunidad única para limitar los niveles de sustrato de iARN cuando deben administrarse grandes dosis de vector para conseguir una direccionamiento eficaz a las células en todo un tejido

dado. Este concepto es particularmente relevante para el desarrollo de iARN terapéutica, donde la eficacia de transducción y la seguridad del vector son de la máxima importancia.

5 Inevitablemente, la selección del sistema de expresión de iARN basado en horquilla que es más adecuado para una aplicación dada depende de varios factores: los objetivos del proyecto, las opciones de suministro, los niveles de expresión de la diana, y la eficacia deseada de silenciamiento. El enfoque aquí esbozado, donde se minimizan las variables de preferencia de hebra y procesamiento, puede ayudar a guiar a los investigadores en la identificación de vectores adecuados para sus aplicaciones basadas en iARN.

10 MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del vector

15 Se clonó un casete de expresión (5'NheI-3'BglII) que contenía el promotor CMV, sitio de clonación múltiple (MCS) y señal de poliadenilación de SV40 (poliA) en TOPO-BluntII (XbaI-BamHI, Invitrogen™) en orientación inversa. Se clonó un casete de expresión Pol-III que contenía el promotor U6 de ratón, MCS y terminado de Pol-III (6T) en TOPO-BluntII con la misma estrategia. Se generaron miARN artificiales por extensión con polimerasa de oligonucleótidos de ADN solapantes (IDT). Los productos extendidos con polimerasa se digirieron con XhoI-SpeI y se clonaron en el MCS de los vectores de expresión XhoI-SpeI (miV1) o XhoI-XbaI (miV2). Se produjo miV3 por un error inexplicable de clonación. Se ha descrito previamente shHD2.1 (Harper et al., 2005, PNAS, USA 102: 5820-5825). Se clonaron otros ARNhc usando una estrategia de PCR con cola. Los productos de PCR que contenían U6-ARNhc-6T se clonaron en TOPO en el vector BluntII y los clones positivos se consideraron en orientación inversa para mantener la coherencia con los otros vectores de expresión.

25 Para estudios *in vivo*, se clonaron casetes de expresión de miARN o ARNhc dirigidos por el promotor U6 de ratón en la misma orientación cadena arriba de un casete de expresión CMV-hrGFP-SV40poliA.

30 Se construyeron vectores indicadores de luciferasa de iARN usando psiCheck2 (Promega®). Se usó PCR con cola para amplificar un fragmento 3' de luciferasa de *Renilla* que contenía un único sitio diana de iARN complementario perfecto (~25 pb: diana de 21 pb +2-nt 5' y 3') cadena abajo del codón de parada. Este producto de PCR se digirió con AatII-XhoI y se clonó en los mismos sitios dentro de psiCheck2.

Véase la Fig. 16 y Fig. 28 para información detallada acerca de la construcción del vector.

35 Análisis 3'-RACE

Se transfectaron células HEK293 cultivadas en placas de 6 pocillos (Lipofectamina™ 2000, Invitrogen™) con plásmidos de expresión de iARN (200 ng o 2 µg para plásmidos de ARNhc y miARN artificial respectivamente). Se aisló el ARN total a las 48 h después de la transfección usando 1 ml de reactivo TRIzol® (Invitrogen™). Posteriormente, se trataron 250 ng de ARN total con Poli(A) polimerasa A-Plus™ (Epicentre®), y después se sometieron a síntesis de ADNc de primera hebra usando un cebador oligo-dT anclado que contenía secuencia enlazadora (RLM-RACE, Ambion®; reactivos de transcripción inversa TaqMan®, Applied Biosystems). La PCR se realizó usando los siguientes cebadores: 5'-TTAATACGACTCACTATAGGT-3', (SEC ID N° 210) (cebador enlazador), 5'-ACTTCAACGCTGACCT-3' (SEC ID N° 211) (RACE antisentido de SCA1) y 5'-CCAGGTCAGCGTTGA-3' (SEC ID N° 212) (RACE con sentido de SCA1). Los productos se clonaron en TOPO en el vector pCR2.1 (Invitrogen™) y se secuenciaron.

Análisis de transferencia de Northern

50 Se transfectaron células HEK293 cultivadas en placas de 6 pocillos con 1,5 µg de plásmido de expresión de iARN. Se aisló el ARN total a las 48 h después de la transfección usando 1 ml de reactivo TRIzol® (Invitrogen™); como alternativa, se recogió la fracción de ARN pequeño usando el kit de aislamiento mirVana (Ambion®). Se resolvieron 15-20 µg de ARN total o 1-2 µg de la fracción de ARN pequeño en un gel de acrilamida al 15%. Los tamaños de transcrito pequeño se determinaron con el Decade Ladder (Ambion®). Se evaluó la carga coherente y la integridad del ARN por tinción con bromuro de etidio. El ARN se transfirió a membrana Hybond™-XL (Amersham Pharmacia) a 200-400 mA durante 1-2 h y se reticuló por UV con la función de auto-reticulación en un Stratilinker® 1800 (Stratagene®). Las transferencias se pre-hibridaron usando UltraHyb-Oligo (Ambion®) a 35°C, se sondearon con oligonucleótidos marcados con ³²P (Ready-To-Go T4 polinucleótido quinasa; Amersham) a 30-35°C durante una noche, se lavaron tres veces (5 min cada una) en SSC 2X, SDS al 0,1% a 30-35°C, y se expusieron a la película. Como alternativa, las transferencias se sondearon con oligonucleótidos marcados con biotina y se analizaron usando el kit Bio-Detect (Ambion®). Se realizaron análisis de densitometría usando un sistema de bioimágenes (UVP) acoplado con el software LabWorks (UVP).

65 Análisis de PCR cuantitativa a tiempo real

Se transfectaron células HEK293 cultivadas en placas de 24 pocillos con 700 ng de plásmidos que expresan iARN. A las 48 h después de la transfección, se aisló el ARN total con 0,5 ml de reactivo TRIzol® (Invitrogen™), y se realizó síntesis de ADNc de primera hebra aleatoria usando 1 µg de ARN total (reactivos de transcripción inversa TaqMan®; Applied Biosystems) según el protocolo del fabricante. Los ensayos se realizaron en un sistema de detección de secuencia usando conjuntos de cebadores-sonda específicos para HD, SCA1, GAPDH o ARNr 18S humano (Prism 7900HT y mezcla maestra universal 2X TaqMan®; Applied Biosystems). La expresión génica relativa se determinó usando el método de curva patrón relativa.

Análisis de silenciamiento de GFP

Se transfectaron células HEK293 cultivadas en placas de 12 pocillos con 1,2 µg y 300 ng de plásmidos de expresión de iARN (SCA1 o GFP) y eGFP respectivamente. A las 48 h después de la transfección, se capturaron fotomicrografías fluorescentes a aumento 4X usando un Olympus IX70 (microscopio) y DP70 (cámara) acoplados con el software Olympus DP Controller. Se determinó la fluorescencia media en cada imagen usando la función de histograma en el software Image J (NIH). Los resultados para células tratadas con iARN de GFP se normalizaron para controlar las células tratadas con iARN de SCA1.

Ensayos de luciferasa *in vitro*

Se co-transfectaron células HEK293 cultivadas en placas negras de 96 pocillos (Costar 3603; Corning Inc.) por triplicado con plásmidos que expresan iARN (1-60 ng) y plásmidos de diana luciferasa de iARN (10-20 ng). En estudios de dosis, se suplementó vector vacío para bajas dosis para igualar la carga total de ADN. Se evaluaron los actividades luciferasa de luciérnaga y *Renilla* 24 h después de la transfección usando el sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo (Promega®) según las instrucciones del fabricante, usando 50 µl por sustrato. Se adquirieron lecturas luminiscentes con un luminómetro de placa de 96 pocillos (Dynex). Los resultados se calcularon como el cociente de las actividades luciferasa de *Renilla*/luciérnaga.

Ensayo de luciferasa *in vivo*

Los estudios en animales fueron aprobados por el comité de protección y uso de animales de la Universidad de Iowa. Se anestesiaron ratones C57/BL6 macho de ocho semanas de edad (Jackson Laboratories) con ketamina-xilazina y se les inyectó 30 µl de 0,4 U/µl hialuronidasa (Sigma) en el músculo *tibialis anterior* (TA). Dos horas después, se inyectaron los plásmidos en 30 µl de solución salina en el músculo TA de ratones re-anestesiados. Todos los grupos (n = 4 músculos) recibieron 1 µg de plásmido indicador de luciferasa de iARN junto con 10 µg de vector vacío o plásmido de iARN (dosis alta) o 9 µg de vector vacío y 1 µg de plásmido de iARN (dosis baja). Los plásmidos se prepararon usando el kit EndoFree® Plasmid Maxi (Qiagen®). Los músculos inyectados con plásmido se electroporaron como se ha descrito previamente (McMahon et al., 2001, Gene Ther 8: 1264-1270) aplicando 175 V/cm en 10 impulsos de 20 ms a 2 Hz (electroporador ECM 830, BTX). A las 4 y 8 días después del tratamiento, los ratones se sedaron con isoflurano, y se inyectaron 30 µl de coelenterazina (0,3 mg/ml, Promega®) en los músculos TA. Se realizaron imágenes de bioluminiscencia inmediatamente usando un sistema de imágenes IVIS200 (Xenogen). Se analizaron las emisiones de luz usando el software Living Image (Xenogen) y el software de análisis de imágenes Igor Pro (WaveMetrics Inc.). Los datos recogidos a los 4 y 8 d revelaron tendencias similares de silenciamiento (4 días no mostrado).

Análisis estadísticos

Se usó ensayo t de Student para todos los estudios donde se proporcionaron valores *P*. En todos los análisis estadísticos, *P* < 0,05 se consideró significativo.

Ejemplo 5

Los microARN artificiales demuestran seguridad mejorada sobre ARN de horquilla corta

La interferencia de ARN (iARN) es un proceso celular evolutivamente conservado que regula la expresión génica y que participa en la defensa innata. La iARN dirige el silenciamiento génico específico de secuencia mediante ARN bicatenarios (ARNbc) que pueden procesarse por Dicer en ARN pequeños funcionales, tales como ARN interferentes pequeños (ARNip) y microARN (miARN) entre otros. Los ARN pequeños asociados con el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) o los complejos tipo RISC median el silenciamiento génico post-transcripcional abordando transcritos para su degradación o represión traduccional.

La iARN se ha utilizado como herramienta biológica para estudiar la función génica y se está desarrollando como estrategia terapéutica para tratar varias enfermedades. La iARN exógena se ha expresado en cultivos celulares y animales como ARN de horquilla corta (ARNhc) o miARN artificiales, tales como transcritos de miARN primarios (pri-miARN) que sirven como lanzaderas de ARNip. Los ARNhc se transcriben clásicamente como secuencias con sentido y antisentido conectadas por un bucle de nucleótidos no apareados. Después de la transcripción, los ARNhc

se exportan desde el núcleo por la Exportina-5, y se procesan por Dicer en el citoplasma para generar ARNip funcionales. Los troncos-bucles de miARN se expresan típicamente como parte de transcritos más grandes de pri-miARN. Estos troncos-bucles se escinden por Drosha-DGCR8 que genera intermedios conocidos como pre-miARN, que se exportan posteriormente al citoplasma y se cortan en pequeños ARN funcionales.

5 Aunque varios estudios de laboratorios independientes han demostrado eficacia terapéutica de ARNhc en modelos de ratón para enfermedad neurológica, pocos estudios han evaluado rigurosamente la seguridad de vectores de iARN. Hasta la fecha, la mayoría de las estrategias de iARN basadas en expresión han utilizado ARNhc expresados a altos niveles a partir de promotores Pol-III fuertes. Altos niveles de sustratos de iARN suministrados de forma exógena pueden causar toxicidad celular por diversos medios. Los sustratos de iARN pueden competir por la
10 maquinaria endógena de iARN, alterando de este modo la biogénesis y función natural del miARN. Como alternativa, la expresión de ARNhc puede estimular respuestas celulares a ARNbc, que puede provocar un silenciamiento génico global. Finalmente, la toxicidad puede resultar de una probabilidad aumentada de silenciamiento desviado de su diana de ARNm no pretendidos debido a complementariedad parcial con la región semilla (posiciones 2-8, importantes para el silenciamiento basado en represión traduccional) de ARN antisentido. Estos efectos secundarios
15 pueden producir toxicidad celular severa e incluso provocar muerte orgánica.

Los inventores ensayaron correspondientes vectores de expresión basados en ARNhc y miARN que, tras el procesamiento, producen secuencias similares de ARNip con preferencia comparable de hebra. Los inventores
20 evaluaron la seguridad de estos vectores *in vitro* e *in vivo* y presentan datos que apoyan adicionalmente que los miARN artificiales muestran perfiles mejorados de seguridad sobre los ARNhc. Además, los inventores demuestran que los miARN artificiales son eficaces en el silenciamiento de una diana terapéutica en un modelo de ratón para enfermedad neurodegenerativa.

RESULTADOS

Efectos de vectores de iARN basada en horquilla sobre la biogénesis y función de miARN

Los inventores compararon previamente la eficacia de ARNhc y miARN artificiales usando un esquema de comparación equitativa minimizando las variables entre los vectores (Figura 29). Descubrieron que los ARNhc son
30 más potentes; sin embargo, apreciaron que los ARNhc se expresan a niveles muy altos y producen una abundancia de precursores no procesados, mientras que los miARN artificiales se expresan a niveles más bajos y se procesan de forma eficaz. Los inventores hipotetizaron que los ARNhc saturar la maquinaria celular de procesamiento de iARN y, por tanto, son más propensos a interferir con la biogénesis y función de miARN.

35 Inicialmente, se ensayó la seguridad relativa de vectores de iARN basados en ARNhc y miARN dirigidos por U6*in vitro* por ensayo de competición. Se ensayaron los efectos de estas estrategias de iARN sobre el procesamiento y función de miARN artificiales suministrados de forma exógena. Este enfoque se usó para simular el procesamiento de miARN endógenos evitando al mismo tiempo la posibilidad de tener miARN maduros pre-procesados, que pueden ser bastante estables, presentes al inicio del experimento. En estos estudios, se co-transfectaron plásmidos que expresaban miGFP y un indicador de luciferasa de iARN de GFP, que contiene un sitio diana perfecto para la
40 secuencia de iARN de GFP, en células HEK293 para establecer el silenciamiento basal mediado por un vector basado en miARN. A continuación, se evaluó la mitigación del silenciamiento tras la co-expresión de competidos shSCA1 o miSCA1 para medir la interferencia potencial conferida sobre la actividad miGFP. Los inventores descubrieron que shSCA1 disminuye significativamente la función de miGFP (Figura 30A). De forma notable,
45 miSCA1, a una dosis 10 veces mayor, impidió de forma solamente ligera la actividad miGFP. De forma interesante, a esta dosis alta, miSCA1 mostró eficacia similar de silenciamiento que la dosis baja de shSCA1 cuando aborda el indicador de luciferasa de iARN de SCA1 en experimentos paralelos (Figura 30B). Estos resultados se apoyaron por experimentos recíprocos donde se evaluó el efecto de competidores de iARN de GFP (shGFP o miGFP) sobre la actividad miSCA1 en paralelo con los estudios de eficacia de iARN de GFP (Figura 30C, D).
50

Para evaluar si la expresión de ARNhc altera la biogénesis (por ejemplo, saturando Exportina-5 o Dicer) o función (por ejemplo, saturando RISC) de miARN, los inventores realizaron análisis de transferencia de Northern para evaluar el procesamiento de miGFP en presencia de competidores shSCA1 o miSCA1. Descubrieron que miGFP se procesaba apropiadamente en la forma madura cuando se co-expresaba con competidores miSCA1 (Figura 30E,
55 panel superior). Por el contrario, la biogénesis de miGFP se alteraba gravemente en presencia de vectores de expresión de shSCA1 a dosis bajas y altas. Esta interferencia resultaba probablemente de la fuerte expresión de shSCA1 que generaba abundantes formas precursoras y procesadas respecto a miSCA1 (Figura 30E, paneles inferiores). Estos datos, junto con los estudios de silenciamiento génico de los inventores (Figura 30B), sugieren que puede conseguirse silenciamiento máximo con enfoques basados en miARN sin acumulación de productos precursores y procesados indeseados que alteran la biogénesis y función de miARN.
60

Los inventores ensayaron posteriormente los efectos de las estrategias de iARN basadas en ARNhc y miARN sobre la biogénesis y función de miARN usando células C2C12 derivadas de músculo de ratón, que tras la diferenciación inducen la expresión de miR-1, un miARN específico de músculo. Esta inducción se evaluó midiendo la actividad de
65 un indicador de luciferasa para la función miR-1 en células C2C12 no diferenciadas y diferenciadas (Figura 31A, B). A continuación, se ensayó si la expresión de shSCA1 o miSCA1 altera la inducción de la actividad miR-1 durante la

diferenciación. Coherente con nuestros datos previos, shSCA1 inhibía casi completamente la activación de miR-1 mientras que la expresión de miSCA1 tenía efectos casi inexistentes (Figura 31B).

La inhibición de la función de miARN específicos de músculo en la diferenciación de células C2C12 ha demostrado alterar el proceso de elongación durante la formación de miotubos. Los inventores, por lo tanto, midieron la elongación de células C2C12 diferenciadas después de transfección con plásmidos de expresión de ARNhc o miARN artificial que co-expresan hrGFP dirigido por CMV (Figura 31 C). A las 72 h después del tratamiento y diferenciación, se realizó inmunocitoquímica para marcar la cadena pesada de miosina (MHC) para identificar miotubos en diferenciación, y se midieron las longitudes relativas de células MHC+/GFP+ (Figura 31D). Los inventores descubrieron que el proceso de elongación se reducía significativamente en células C2C12 transfectadas con plásmidos que expresan shSCA1, pero no aquellas que expresan miSCA1 (Figura 31E, $P < 0,01$).

Efectos de vectores de iARN basados en horquilla sobre la viabilidad celular

Durante los estudios de C2C12, los inventores observaron menor hrGFP-positividad global en células tratadas con shSCA1 a las 72 h después de la transfección. Los inventores hipotizaron que esta pérdida era el resultado de toxicidad inducida por ARNhc. Por tanto, se evaluó la supervivencia de células C2C12 transfectadas con iARN controlando la co-expresión de hrGFP por microscopía de fluorescencia sobre un curso de tiempo (Figura 32). A las 24 h después de la transfección, cada tratamiento (sin iARN, miSCA1, o shSCA1) mostró niveles similares de fluorescencia. Sin embargo, a las 72 h, los inventores apreciaron una clara pérdida de células hrGFP-positivas en la población tratada con shSCA1 y ausencia de efecto en cualquiera de los otros grupos de tratamiento. A las 72 horas después del tratamiento, los inventores también realizaron ensayo MTS para medir la viabilidad celular y descubrieron que las células tratadas con ARNhc tenían una viabilidad reducida aproximadamente un 20% respecto a células no tratadas con iARN o tratadas con miARN (Figura 32). Se observó toxicidad similar a una dosis 10 veces inferior de shSCA1 (datos no mostrados). Cabe señalar que la toxicidad observada no se puede atribuir al silenciamiento de SCA1 de ratón endógeno en las células C2C12, ya que estas secuencias de iARN son específicas para SCA1 humano.

Seguridad de vectores de iARN basada en horquilla en cerebelo de ratón

A continuación, los inventores procuraron ensayar si las estrategias basadas en miARN muestran seguridad mejorada sobre ARNhc *in vivo*. Los inventores centraron sus esfuerzos en el cerebelo. Generaron vectores virales adeno-asociados (AAV serotipo 2/1-Figura 33A) que expresan shSCA1 o miSCA1 dirigido por U6. Los vectores AAV también contienen un casete de expresión de hrGFP para observar la distribución y tipos de células transducidas. Se inyectó a ratones de tipo silvestre AAV1-hrGFP, AAV1-shSCA1, o AAV1-miSCA1 en el cerebelo y se sacrificaron 10 semanas después. Se realizaron análisis inmuno-histoquímicos para calbindina, que marca células de Purkinje dentro de la capa molecular del cerebelo. Los inventores descubrieron que shSCA1 causaba marcada neurotoxicidad, como se evidencia por una clara pérdida de células de Purkinje en regiones transducidas (GFP-positivas) en el cerebelo (Figura 33B, C). Por el contrario, los cerebelos tratados con AAV1-hrGFP y AAV1-miSCA1 mostraron integridad conservada de células de Purkinje en regiones transducidas y no transducidas (Figura 33B, C y datos no mostrados). Estos resultados apoyan que la expresión de miARN artificial en cerebelo de ratón está bien tolerada, particularmente en comparación con el correspondiente ARNhc tóxico.

Silenciamiento mediado por miARN artificial de una diana terapéutica en células de Purkinje

Previamente los inventores descubrieron que los ARNhc son más potentes que los miARN artificiales cuando abordan indicadores de luciferasa o miARN endógenos co-transfectados en células HEK293. Sin embargo, los presentes análisis de seguridad *in vitro* e *in vivo* apoyan el uso de miARN artificiales para desarrollar agentes terapéuticos de iARN basada en vector. Por tanto, los inventores ensayaron si la potencia de un miARN artificial, miSCA1, es suficiente para silenciar su diana terapéutica en un modelo de ratón de ataxia espinocerebelosa tipo I (SCA1) que expresa un transgén de ataxina-1 humana mutante mediante un promotor específico de células de Purkinje. SCA1 es una enfermedad neurológica hereditaria dominante que causa degeneración principalmente en células cerebelosas de Purkinje. La mutación responsable de la enfermedad produce una forma tóxica expandida por poliglutamina de ataxina-1, el producto génico de SCA1, que se localizó en el núcleo.

Aquí, los inventores ensayaron las capacidades de los correspondientes vectores shSCA1 y miSCA1 de silenciar el transgén de ataxina-1 humana mutante en ratones SCA1. Se inyectó a los ratones AAV1-shSCA1 o AAV1-miSCA1 en el cerebelo y se realizaron análisis histológicos siete semanas después para evaluar la transducción viral (hrGFP), la integridad de las células de Purkinje (calbindina) y el silenciamiento génico (ataxina-1). Estos análisis demuestran que el tratamiento con AAV1-miSCA1 silencia de forma eficaz la diana terapéutica SCA1 en células de Purkinje, como se evidencia por una pérdida de la tinción nuclear de ataxina-1 en regiones positivas tanto para hrGFP como para calbindina. Por el contrario, la expresión de shSCA1 causaba neurotoxicidad en ratones SCA1 a un grado similar que el observado previamente en ratones de tipo silvestre. La pérdida resultante de células de Purkinje calbindina-positivas en cerebelos tratados con shSCA1 probablemente explica la ausencia de tinción de ataxina-1 en estas regiones. Estos resultados demuestran que los miARN artificiales son capaces de silenciar una

diana candidata para terapia por iARN en cerebelo de ratón y proporcionan apoyo adicional para el perfil mejorado de seguridad de los miARN artificiales sobre los ARNhc.

DISCUSIÓN

5 Aquí, los inventores demuestran el modo en que la potencia mejorada de los ARNhc puede contrarrestarse por cuestiones de toxicidad. Altos niveles de sustratos de iARN producidos por vectores de expresión de ARNhc saturan la maquinaria celular de iARN, interfiriendo de este modo con la biogénesis y función de miARN en cultivo celular e *in vivo*. Los presentes hallazgos muestran que las estrategias basadas en miARN son menos propensas a interferencia con estos procesos *in vitro*, lo que sugiere que los miARN artificiales pueden ser menos tóxicos. Los inventores amplían estos hallazgos para mostrar que la interferencia mediada por ARNhc sucede principalmente al nivel de biogénesis de miARN, aunque la interferencia con el RISC también es probable. Además, los inventores demuestran que la expresión de miARN artificial puede no alterar los procesos celulares (es decir, la elongación de microtubos) regulados por miARN endógenos ni causar muerte celular en comparación con sus correspondientes ARNhc.

In vivo, los ARNhc pueden causar toxicidad en cuerpo estriado de ratón independientemente del silenciamiento de ARNm de HDh. Similar a nuestro trabajo, otros han observado toxicidad hepática aguda y mortalidad en ratones después de suministro sistémico de ARNhc (Grimm et al., 2006, Nature 441, 537-41). De forma importante, esta toxicidad se correlacionó con niveles aumentados de ARN antisentido maduro. Sin embargo, existen diferencias importantes entre nuestros hallazgos. En primer lugar, Grimm *et al.* descubrieron que disminuir la dosis de vector en aproximadamente 10 veces mejoraba significativamente los efectos letales de algunos ARNhc sobre la función hepática y la viabilidad animal. En los presentes estudios, reducir la dosis condujo a inferior transducción en todo el cuerpo estriado, pero no anuló la toxicidad. En segundo lugar, los datos de Grimm y colaboradores mostraron acumulación significativa de precursores de ARNhc en células hepáticas. Atribuyeron la toxicidad hepática, en parte, a la alteración de la biogénesis de miARN endógeno causada por saturación por ARNhc de la maquinaria de exportación nuclear de iARN. En el presente trabajo, los inventores detectaron niveles abundantes de ARNhc no procesados *in vitro*, pero de forma interesante, bajos hasta niveles indetectables *in vivo*. Esto sugiere que la exportación nuclear probablemente no era limitante en los presentes estudios. Como alternativa, la toxicidad del cuerpo estriado puede estar causada por niveles excesivos de ARN antisentido maduros que median el silenciamiento desviado de su diana de ARNm no pretendidos con complementariedad parcial.

Aunque es importante la comprensión del mecanismo de toxicidad inducida por ARNhc en el cuerpo estriado de ratón, lo inventores se centraron en perseguir estrategias alternativas de iARN para mitigar la toxicidad. Descubrieron que mover las secuencias HD2.4 y HD2.4mis, ambas cuales causaban toxicidad en los ARNhc de contexto, en una estructura de miARN redujo significativamente la neurotoxicidad dentro del cuerpo estriado sin sacrificio en la eficacia de silenciamiento génico. Los inventores correlacionaron este efecto positivo con los inferiores niveles en estado estacionario de ARN antisentido maduros procesados a partir de mi2.4 artificial respecto a sh2.4. Si esta disparidad en los niveles de expresión resulta de diferencias en la estabilidad o transcripción entre los ARNhc y los miARN artificiales sigue sin dilucidarse.

Los perfiles de seguridad mejorada de las estrategias de iARN basadas en miARN son fascinantes, particularmente porque la eficacia de silenciamiento génico *in vivo* no estaba comprometida respecto a los ARNhc optimizados. Estos resultados apoyan que se ha saturado el silenciamiento génico en una base celular, ya que más ARN antisentido no aumentaba la eficacia de silenciamiento. Los niveles de ARN antisentido en una base celular pueden limitarse adicionalmente ajustando la expresión de iARN y las estrategias de suministro viral. Convenientemente, los vectores basados en miARN son más susceptibles a transcripción mediada por Pol-II en comparación con ARNhc, que tienen flexibilidad limitada de espaciado para la expresión basada en Pol-II. Los miARN artificiales se parecen de forma más natural a sustratos endógenos de iARN y son más susceptibles a transcripción por Pol-II (que permite expresión específica de tejido de iARN) y estrategias policistrónicas (que permite el suministro de múltiples secuencias de ARNip). Esta ventaja permite una expresión regulada y específica de célula de ARN inhibidores. Estas estrategias de expresión versátiles potencian su aplicación como herramientas biológicas y pueden limitar adicionalmente la toxicidad potencial en aplicaciones terapéuticas. Por estas razones, además de los presentes hallazgos, los miARN artificiales son más adecuados para el desarrollo de agentes terapéuticos de iARN basada en vector.

MATERIAL Y MÉTODOS

Vectores

60 Los plásmidos que expresan miARN artificiales dirigidos por U6 o vectores de ARNhc que abordan SCA1 se han descrito previamente junto con los plásmidos indicadores de luciferasa de iARN de SCA1 y GFP. El indicador de luciferasa de luciérnaga de miR-1 se clonó usando una estrategia similar. En resumen, se insertó un único sitio con complementariedad perfecta a miR-1 en la 3'UTR de luciferasa de luciérnaga (psiCheck™2, Promega®) usando una estrategia de PCR con cola con los siguientes cebadores: directo - 5'-
65 AAAATCTAGATACATACTTCTTTACATTCCACCGCTTCGAGCAGACATG-3' (SEC ID N° 213), inverso - 5'-

AAAAGGATCCTCGAGCGATTTTACCACATTTGTAGAGG-3' (SEC ID N° 214). Este producto de PCR se digirió con XbaI-BamHI y se clonó en los mismos sitios en psiCheck™2. Para C2C12 y la producción de vector AAV, se clonaron casetes de expresión de miARN o ARNhc dirigidos por el promotor U6 de ratón en un derivado del plásmido pFBGR cadena arriba de un casete de expresión CMV-hrGFP-SV40 poliA.

5 Ensayos de luciferasa *in vitro*

Se co-transfectaron células HEK293 cultivadas en placas negras de 96 pocillos (Costar 3603; Corning Inc.) por triplicado con plásmidos que expresan iARN (10 a 100 ng) y plásmidos de dicha de luciferasa de iARN (10 a 20 ng).
 10 En estudios de dosificación, se suplementó vector vacío a bajas dosis para ajustar la carga total de ADN. Se evaluaron las actividades luciferasa de luciérnaga y *Renilla* 24 h después de la transfección usando el sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo (Promega®) según las instrucciones del fabricante, usando 50 µl por sustrato. Se adquirieron lecturas luminiscentes con un luminómetro de placa de 96 pocillos (Dynex). Los resultados se calcularon como el cociente de actividades luciferasa de *Renilla*/luciérnaga.

15 Para estudios C2C12, se transfectaron células cultivadas en placas de 24 pocillos recubiertas con poli-1-ornitina (0,1 mg/ml, Sigma) por cuadruplicado con 200 ng de plásmidos de iARN libre de endotoxina o vector vacío junto con 40 ng de plásmidos de siCheck™2 o indicador de luciferasa de miR-1 (sitio diana en 3'UTR de luciferasa de luciérnaga). Las células se diferenciaron por privación de suero a las 4 h después de la transfección, y se realizaron ensayos de luciferasa Dual (Promega®) 48 h después con un luminómetro de placa de 96 pocillos (Berthold Technologies). Cabe señalar que las muestras no diferenciadas se recogieron a las 24 h después de la transfección ya que las células estaban casi al 100% de confluencia. Los resultados se calcularon como el cociente de las actividades luciferasa de luciérnaga/*Renilla*.

25 Análisis de transferencia de Northern

Se transfectaron células HEK293 cultivadas en placas 6 pocillos con plásmidos de iARN (0,2 o 2 µg de iARN de SCA1 con 1,5 µg de miGFP para estudios de competición o 0,2 o 2 µg de iARN HD2.4). Se suplementó vector vacío a bajas dosis para ajustar la carga total de ADN. Se aisló el ARN total a las 48 h después de la transfección usando
 30 1 ml de reactivo TRIzol® (Invitrogen™), y se resolvieron 15-20 µg en un gel de acrilamida al 15%. Se determinaron los tamaños de transcrito pequeño con el Decade Ladder (Ambion®). La carga se evaluó por tinción con bromuro de etidio. El ARN se transfirió a membrana Hybond™-XL (Amersham) y se reticuló por UV. Las transferencias se pre-hibridaron usando UltraHyb®-Oligo (Ambion®) a 35°C, se sondearon con oligonucleótidos marcados con γ -³²P (Ready-To-Go T4 polinucleótido quinasa; Amersham) a 30-35°C durante una noche, se lavaron en SSC 2X, SDS al
 35 0,1% a 30-35°C, y se expusieron a la película.

Para estudios *in vivo*, se recogió el ARN total de perforaciones de tejido estriado usando 1 ml de reactivo TRIzol® (Invitrogen™). Se realizaron las transferencias de Northern como se ha indicado anteriormente usando 1-3 µg de ARN.

40 Análisis de elongación de C2C12

Se transfectaron células C2C12 cultivadas en placas de 24 pocillos recubiertas con poli-1-ornitina (0,1 mg/ml) con 200 ng de plásmidos de vector vacío o iARN que co-expresan hrGFP y se diferenciaron después de 4 h. A las 72 h,
 45 las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron en formaldehído al 4% para inmunocitoquímica (hecho a temperatura ambiente). Como alternativa, se fijaron células no diferenciadas a las 24 h después de la transfección. Las células fijadas se incubaron en tampón de bloqueo (albúmina bovina al 2%, suero de caballo al 2%, NP-40 al 0,1% en PBS) durante 30 min. Se añadió anticuerpo primario anti-cadena pesada de miosina (MHC) (1:1000, MF20 de la instalación de hibridoma de la universidad de Iowa) con tampón de bloqueo fresco y se incubaron durante 2 h.
 50 Las células después se lavaron dos veces con PBS, se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con Alexa-568 (1:5000, Invitrogen™) durante 30 min, y se lavaron de nuevo con PBS. Se capturaron imágenes de microscopía de fluorescencia (rojo-MHC y verde-hrGFP) a aumento 10X usando un Olympus IX70 (microscopio) y DP70 (cámara) acoplados con el software Olympus DP Controller. Se superpusieron las imágenes correspondientes, y se cuantificaron las longitudes de células GFP+/MHC+ usando el software Image J (NIH).

55 Estudios de supervivencia de C2C12

Se transfectaron células cultivadas en placas de 24 pocillos recubiertas con poli-1-ornitina (0,1 mg/ml) por triplicado con 400 ng de plásmidos de vector vacío libre de endotoxinas o de iARN que co-expresan hrGFP y se diferenciaron
 60 después de 4 h. A las 24 h y 72 h después de la transfección, se capturaron imágenes de microscopía de fluorescencia a aumento 4X usando un Olympus IX70 (microscopio) y DP70 (cámara) acoplados con el software Olympus DP Controller. A las 72 h, las células se trataron con tripsina, se resuspendieron en 1 ml de medio de crecimiento, y se analizaron alícuotas de 100 µl (por triplicado) usando el ensayo CellTiter-96 AQueous MTS (Promega®) según las instrucciones del fabricante. Se midió la absorbancia con un lector de microplaca de 96
 65 pocillos (Molecular Devices) y se normalizaron a células tratadas con vector vacío.

Producción y purificación de vector viral

Se produjeron vectores AAV recombinantes mediante un método convencional de transfección con fosfato de calcio en células HEK293 adherentes, usando los plásmidos de vector auxiliar Ad, empaquetado trans y AAV como se ha descrito previamente. Se determinaron los títulos de vector por QPCR, usando un detector de secuencia Prism 7900 (Applied Biosystems), y fueron entre 3 y 10×10^{12} de partículas resistentes a DNasa (DRP)/ml (posteriormente mencionado como genomas virales/ml). Se evaluó la infectividad viral en un ensayo de TCID50 usando la línea celular B50 basada en HeLa. Se produjeron AAV1.mi2.4, AAV1.mi2.4mis, AAV1.sh2.4 y AAV1.GFP por Targeted Genetics Incorporated, y se proporcionaron AAV1.miSCA1 y AAV1.shSCA1 por la instalación central de vectores de la Universidad de Iowa.

Inyecciones de AAV

Todos los protocolos en animales fueron aprobados por el comité de protección y uso de animales de la Universidad de Iowa. Se inyectó a ratones C57/BL6 de ocho semanas de edad (Jackson Laboratories) AAV2/1 que expresa ARNhc o miARN y se sacrificaron 16 semanas después. Los ratones se anestesiaron con xilazina (100 mg/kg) y ketamina (10 mg/kg), se afeitaron sus cabezas, se esterilizaron con betadine y se colocaron en una montura estereotáxica Kopf espacialmente adaptada para cirugía en ratones. Se hizo una incisión central y se crearon orificios con fresa unilateral sobre el cuero estriado derecho con un torno dental de alta velocidad. Posteriormente, se inyectaron 5 μ l de AAV1.sh2.4, AAV1.mi2.4 o AAV1.mi2.4mis (4×10^{12} genomas virales/ml) en el cuerpo estriado derecho (coordenadas: 0,86 mm rostral a bregma, 1,8 mm lateral a línea central, 3,5 mm ventral a la superficie craneal). Todas las inyecciones se realizaron a través de una jeringa Hamilton de 10 μ l conectada a una bomba de infusión a una velocidad de 0,2 μ l/min con una aguja de punta roma de calibre 33. La aguja se dejó *in situ* durante 5 min adicionales para permitir que el inyectable difundiera desde la punta de la aguja. Se cerró el cuero cabelludo con sutura de polivícril 5-0. Para estudios de cerebelo en ratones mutantes SCA1, se inyectó 1 μ l de AAV1.shSCA1 o AAV1.miSCA1 (1×10^{12} genomas virales/ml) en el cerebelo (coordenadas: 6,0 mm caudal a bregma, 2,0 mm lateral a línea central, 1,0 mm ventral a la superficie craneal) como se ha descrito anteriormente usando una jeringa Hamilton fortalecida con una punta de micropipeta de vidrio.

Sacrificio

Los ratones usados en análisis histológicos se anestesiaron con una mezcla de ketamina/xilazina y se perfundieron de forma transcardiaca con 20 ml de suero salino frío al 0,9%, seguido de 20 ml de paraformaldehído al 4% en tampón PO_4 0,1 M. Se decapitó a los ratones, se retiraron los cerebros y se post-fijaron durante una noche. Los cerebros se almacenaron en una solución de sacarosa al 30% a 4°C hasta cortarse en un microtomo de cuchilla deslizante a un grosor de 40 μ m y se almacenaron a -20°C en una solución crioprotectora. Los ratones usados para análisis bioquímico se perfundieron con 20 ml de suero salino frío al 0,9%. Los cerebros se retiraron y se seccionaron en porciones coronales de 1 mm de grosor usando una matriz de cerebro (Roboz). Se tomaron perforaciones tisulares del cuerpo estriado usando un núcleo tisular (1,4 mm de diámetro) y se titularon en 50 μ l de TRIzol (Invitrogen™).

PCR cuantitativa a tiempo real (QPCR)

Para estudios *in vitro*, se transfectaron células HEK293 cultivadas en placas de 24 pocillos con 700 ng de plásmidos de expresión de iARN HD2.4 y las células se recogieron 48 h después. Se aisló el ARN de las células HEK293 o las perforaciones de tejido estriado usando 1 ml de reactivo TRIzol (Invitrogen™). Se realizó síntesis de ADNc de primera hebra aleatoria usando 500 ng de ARN total (reactivos de transcripción inversa TaqMan®; Applied Biosystems) según el protocolo del fabricante. Los ensayos se realizaron en un sistema de detección de secuencia usando conjuntos de cebadores-sonda específicos para HD y GAPDH humana o HDh, CD11b (Itgam) y β -actina de ratón (Prism 7900HT y mezcla maestra universal 2X TaqMan®; Applied Biosystems). Se determinó la expresión génica relativa usando el método $\Delta\Delta C_T$, normalizando a los niveles de ARNm de GAPDH o β -actina.

Análisis inmunohistoquímicos

Se procesaron secciones cerebrales coronales de floración libre (40 μ m de grosor) para la visualización inmunohistoquímica de neuronas estriadas (DARPP-32, 1:100, Cell Signaling Technology), microglía (Iba1, 1:1000, WAKO), células cerebelosas de Purkinje (Calbindina, 1:2000, Cell Signaling Technology), o ataxina-1 humana mutante (11NQ). Las secciones primero se incubaron en peryodato sódico 0,1 M en solución salina tamponada con Tris (TBS) durante 20 min para retirar la actividad peroxidasa endógena y después se bloquearon con suero de cabra normal al 5% durante 1 h. Después del bloqueo, las secciones se incubaron con anticuerpo primarios durante 24 h, se lavaron, y después se incubaron con anticuerpos secundarios de cabra marcados con biotina o Cy3 anti-IgG de conejo (1:200, Vector Laboratories y Jackson Immunoresearch) durante 1 h. Las secciones se lavaron de nuevo y se colocaron en reactivo de Vectastain ABC-peroxidasa (Vector Laboratories) durante 1 h. Las secciones después se lavaron y se incubaron en una solución de chromagen que contenía tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobenzidina al

0,05% y peroxidasa de hidrógeno al 0,005% durante hasta 5 min. Todos los procedimientos de tinción se realizaron a temperatura ambiente y la eliminación del anticuerpo primario sirvió como control. Las secciones se montaron en portaobjetos Superfrost™ Plus (Fisher Scientific) y se cubrieron con Gelmount (Biomedica). Las imágenes se capturaron usando un microscopio óptico Olympus BX60 y cámara digital DP70, junto con el software Olympus DP Controller.

Análisis estadísticos

Se usó ensayo t de Student para todos los estudios, salvo que se indique otra cosa. Para los análisis de elongación de C2C12, se realizó un análisis de un factor de la varianza (ANOVA) seguido de análisis post-hoc de Bonferroni para evaluar las diferencias significativas entre grupos individuales. En todos los análisis estadísticos, $P < 0,05$ se consideró significativo.

Diseño del vector

Se clonó un casete de expresión (5'NheI-3'BglII) que contenía el promotor CMV, sitio de clonación múltiple (MCS) y señal de poliadenilación de SV40 (poliA) en TOPO-BluntII (XbaI-BamHI, Invitrogen™) en orientación inversa. Se clonó un casete de expresión Pol-III que contenía el promotor U6 de ratón, MCS y terminador de Pol-III (6T) en TOPO-BluntII con la misma estrategia. Se generaron miARN artificiales por extensión con polimerasa de oligonucleótidos de ADN solapantes (IDT). Los productos extendidos con polimerasa se digirieron con XhoI-SpeI y se clonaron en el MCS de los vectores de expresión XhoI-SpeI (miV1) o XhoI-XbaI (miV2). Se produjo miV3 por un error de clonación inexplicado. Se clonaron otros ARNhc usando una estrategia de PCR con cola. Los productos de PCR que contenían U6-ARNhc-6T se clonaron en TOPO en el vector BluntII y los clones positivos se consideraron en orientación inversa para mantener la coherencia con los otros vectores de expresión.

Para estudios *in vivo*, se clonaron casetes de expresión de miARN o ARNhc dirigidos por el promotor U6 de ratón en la misma orientación cadena arriba de un casete de expresión CMV-hrGFP-SV40poliA.

Se construyeron vectores indicadores de luciferasa de iARN usando psiCheck2™ (Promega®). Se usó PCR con cola para amplificar un fragmento 3' de luciferasa de *Renilla* que contenía un único sitio diana de iARN complementario perfecto (~25 pb: diana de 21 pb + 2-nt 5' y 3') cadena abajo del codón de parada. Este producto de PCR se digirió con AatII-XhoI y se clonó en los mismos sitios dentro de psiCheck™2.

Véase la Fig. 31 para información detallada respecto a la construcción de vectores.

Análisis de transferencia de Northern

Se transfectaron células HEK293 cultivadas en placas de 6 pocillos con 1,5 µg de plásmidos de expresión de iARN. Se aisló el ARN total a las 48 h después de la transfección usando 1 ml de reactivo TRIzol® (Invitrogen™); como alternativa, se recogió la fracción de ARN pequeño usando el kit de aislamiento mirVana™ (Ambion®). Se resolvieron 15-20 µg de ARN total o 1-2 µg de la fracción de ARN pequeño en un gel de acrilamida al 15%. Los tamaños de transcrito pequeño se determinaron con el Decade Ladder (Ambion®). Se evaluó la carga coherente y la integridad del ARN por tinción con bromuro de etidio. El ARN se transfirió a membrana Hybond-XL (Amersham Pharmacia) a 200-400 mA durante 1-2 h y se reticuló por UV con la función de auto-reticulación en un Stratilinker 1800 (Stratagene®). Las transferencias se pre-hibridaron usando UltraHyb-Oligo (Ambion®) a 35°C, se sondearon con oligonucleótidos marcados con ³²P (Ready-To-Go T4 polinucleótido quinasa; Amersham) a 30-35°C durante una noche, se lavaron tres veces (5 min cada una) en SSC 2X, SDS al 0,1% a 30-35°C, y se expusieron a la película. Como alternativa, se sondearon las transferencias con oligonucleótidos marcados con biotina y se analizaron usando el kit Bio-Detect (Ambion®). Se realizaron análisis de densitometría usando un sistema de bioimágenes (UVP) acoplado con el software LabWorks (UVP).

Análisis de PCR cuantitativa a tiempo real

Se transfectaron células HEK293 cultivadas en placas de 24 pocillos con 700 ng de plásmidos que expresan iARN. A las 48 h después de la transfección, se aisló el ARN total con 0,5 ml de reactivo TRIzol® (Invitrogen™), y se realizó síntesis de ADNc de primera hebra cebada de forma aleatoria usando 1 µg de ARN total (reactivos de transcripción inversa TaqMan®; Applied Biosystems) según el protocolo del fabricante. Se realizaron ensayos en un sistema de detección de secuencia usando conjuntos de cebadores-sonda específicos para HD, SCA1, GAPDH o ARNr 18S humano (Prism 7900HT y mezcla maestra universal 2X TaqMan; Applied Biosystems). La expresión génica relativa se determinó usando el método de curva patrón relativa.

Análisis de silenciamiento de GFP

Se transfectaron células HEK293 cultivadas en placas de 12 pocillos con 1,2 µg y 300 ng de plásmidos de expresión de iARN (SCA1 o GFP) y eGFP respectivamente. A las 48 h después de la transfección, se capturaron fotomicrografías fluorescentes a aumento 4X usando un Olympus IX70 (microscopio) y DP70 (cámara) acoplados

con el software Olympus DP Controller. Se determinó la fluorescencia media en cada imagen usando la función de histograma en el software Image J (NIH). Los resultados para células tratadas con iARN de GFP se normalizaron a las células tratadas con iARN de SCA1 de control.

5 Ensayos de luciferasa *in vitro*

Se co-transfectaron células HEK293 cultivadas en placas negras de 96 pocillos (Costar 3603; Corning Inc.) por triplicado con plásmidos que expresan iARN (1-60 ng) y plásmidos de diana de luciferasa de iARN (10-20 ng). En estudios de dosificación, se suplementó vector vacío a bajas dosis para ajustar la carga de ADN total. Se evaluaron las actividades luciferasa de luciérnaga y *Renilla* 24 h después de la transfección usando el sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo (Promega®) según las instrucciones del fabricante, usando 50 µl pos sustrato. Se adquirieron lecturas luminiscentes con un luminómetro de placa de 96 pocillos (Dynex). Los resultados se calcularon como el cociente de actividades luciferasa de *Renilla*/luciérnaga.

15 Ensayos de luciferasa *in vivo*

Los estudios en animales fueron aprobados por el comité de protección y uso de animales de la Universidad de Iowa. Se anestesiaron ratones C57/BL6 macho de ocho semanas de edad (Jackson Laboratories) con ketamina-xilazina y se les inyectó 30 µl de 0,4 U/µl de hialuronidasa (Sigma) en el músculo *tibialis anterior* (TA). Dos horas después, se inyectaron plásmidos en 30 µl de solución salina en el músculo TA de ratones re-anestesiados. Todos los grupos (n = 4 músculos) recibieron 1 µg de plásmido indicador de luciferasa de iARN junto con 10 µg de vector vacío o plásmidos de iARN (dosis alta) o 9 µg de vector vacío y 1 µg de plásmido de iARN (dosis baja). Los plásmidos se prepararon usando el kit EndoFree® Plasmid Maxi (Qiagen). Los músculos inyectados con plásmido se electroporaron como se ha descrito previamente aplicando 175 V/cm en 10 impulsos de 20 ms a 2 Hz (electroporador ECM 830, BTX). A los 4 y 8 d días después del tratamiento, se sedó a los ratones con isoflurano, y se inyectaron 30 µl de coelenterazina (0,3 mg/ml, Promega®) en los músculos TA. Se realizaron imágenes de bioluminiscencia inmediatamente usando un sistema de imágenes IVIS200 (Xenogen). Se analizaron las emisiones de luz usando el software Living Image (Xenogen) y el software de análisis de imágenes Igor Pro (WaveMetrics Inc.). Los datos recogidos a los 4 y 8 d revelaron tendencias similares de silenciamiento (4 d no mostrado).

30 Análisis estadísticos

Se usó ensayo t de Student para todos los estudios donde se proporcionan valores P. En todos los análisis estadísticos, P < 0,05 se consideró significativo.

35 Ejemplo 6

Los miARN artificiales mitigan la toxicidad mediada por ARNhc en el cerebro: implicaciones para el desarrollo terapéutico de interferencia de ARN

La capacidad de los ARN interferentes pequeños (ARNip) de silenciar genes diana se demostró por primera vez en 1998 y desde entonces ha surgido como una estrategia revolucionaria para reducir la expresión de genes diana. La iARN sucede de forma natural en células como mecanismo regulador post-transcripcional mediado por miARN endógenos. Se hipotetiza que la iARN ha evolucionado como un mecanismo de copiado celular que proporciona a la célula un medio para disminuir la expresión de diversos virus y transposones perjudiciales. En los últimos años, los científicos han adoptado este proceso biológico para reducir la expresión de ARNm diana usando ARNip, ARNhc o miARN artificiales aplicados de forma exógena. A parte de las aplicaciones biológicas básicas extendidas de iARN, la capacidad de reducir la expresión génica marca una ventaja principal hacia el desarrollo de terapias de enfermedad, particularmente para enfermedades hereditarias dominantes.

Entre las enfermedades dominantes que pueden beneficiarse de terapias basadas en iARN están la enfermedad de Huntington (HD). La reducción parcial de la expresión de huntingtina mutante por suministro viral de ARNhc es eficaz en la prevención del desarrollo de déficits motores y neuropatología en modelos de ratón transgénico de HD. En estudios de demostración de principios, se estudió el efecto terapéutico sobre el fenotipo de enfermedad por silenciamiento de un transgén HD humano mutante en el ámbito de dos alelos HDh de ratón normales. Aunque el direccionamiento específico de alelo de transcritos de enfermedad para terapia de HD sería ideal, hasta la fecha, no se han identificado polimorfismos prevalentes de un único nucleótido (SNP) que residan en el transcrito mutante. Por lo tanto, los inventores emprendieron estudios para identificar ARN inhibidores que abordaran transcritos tanto de HDh de ratón y como de HD humana, con la intención de ensayar la eficacia de la reducción de la expresión de ambos alelos en un modelo knock-in de HD. Este ejemplo describe el sorprendente hallazgo de neurotoxicidad en cerebro de ratón causada por algunos, sino todos, los vectores de expresión de ARNhc explorados *in vivo*, y la notable reducción en la toxicidad después de mover esos ARN inhibidores tóxicos a sistemas de suministro basados en miARN.

65

RESULTADOS

Los ARNhc causan toxicidad en el cuerpo estriado en ratones

5 Primero se diseñaron ARNhc (dirigidos por el promotor U6 de ratón) que abordan secuencias conservadas que abarcan los ARNm de HD humana y HDh de ratón y se exploraron (Fig. 34 y 35A). El silenciamiento del ARNm de HD medido por PCR cuantitativa a tiempo real (QPCR) y análisis dot blot reveló una disminución en la expresión de proteína huntingtina después de transfección de plásmidos de expresión de ARNhc en líneas celulares C2C12 de ratón y HEK293 derivadas de seres humanos (datos no mostrados). De los 35 ARNhc ensayados, se eligieron 3
10 para estudio adicional en base a la eficacia de silenciamiento. Los ARNhc abordan secuencias en los exones 2, 8 y 30 de los ARNm de HD, y se mencionan en adelante como sh2.4, sh8.2 y sh30.1, respectivamente (Fig. 35B). El análisis de transferencia de Western demostró que estos ARNhc, pero no los ARNhc de control discordantes (mis), reducen la expresión endógena de proteína huntingtina en células C2C12 de ratón (Fig. 35C). Se observaron resultados similares en células HEK 293 derivadas de ser humano.

15 Para examinar los efectos a largo plazo de ARNhc suministrados al cerebro en el modelo de ratón knock-in CAG140, se clonaron casetes de expresión de U6-ARNhc en vectores virales adeno-asociados (AAV serotipo 2/1- Fig. 36A). Los AAV también contenían un casete de expresión de proteína fluorescente verde de Renilla humanizada (hrGFP) para identificar la distribución y tipos de células transducidas. Se inyectó a ratones knock-in CAG140 de cinco semanas de edad de forma bilateral en el cuerpo estriado AAVsh2.4-GFP, AAVsh8.2-GFP, AAVsh30.1-GFP o AAV-GFP (control viral) y se sacrificaron 15 semanas después. Se observó fuerte expresión de GFP en células en toda la extensión rostral/caudal del cuerpo estriado y dentro de las fibras del globo pálido (Fig. 36B). Los análisis de inmunofluorescencia indicaron que las células GFP-positivas se co-localizaban con un marcador neuronal (NeuN) pero sin marcadores para astrocitos (GFAP) u oligodendrocitos (RIP1) (Fig. 37). La QPCR realizada en ARN aislado de tejido estriado GFP-positivo mostró una reducción significativa y estadísticamente similar de la expresión de ARNm de HDh (~60%) entre los diferentes vectores que expresan ARNhc activo en comparación con ratones inyectados con AAV-GFP (Fig. 36C, $F(3,11) = 32,3$, $P < 0,001$ para análisis post-hoc que comparan cada grupo de AAV-ARNhc con el control de AAV-GFP). Además, el análisis de transferencia de western demostró una reducción significativa en los niveles de proteína huntingtina después de administración de AAVARNhc-GFP en comparación con los controles (Fig. 37, $t(8)=3,9$, $P<0,01$).

35 Inesperadamente, los análisis inmunohistoquímicos para proteína regulada por dopamina y AMPc (DARPP-32), un marcador de neuronas de proyección espinal de tamaño medio en el cuerpo estriado, revelaron toxicidad en el cuerpo estriado en ratones inyectados con AAVsh2.4-GFP y AAVsh30.1-GFP (Fig. 36D, *panel superior*). La reducción en la inmunoreactividad de DARPP-32 estaba confinada en gran medida a las regiones transducidas (GFP-positivas) del cuerpo estriado. De forma interesante, esta toxicidad no se observó en ratones inyectados con AAVsh8.2-GFP (Fig. 36D, *panel superior*); los cuerpos estriados de estos ratones eran similares a los ratones de control inyectados con AAV-GFP.

40 Para evaluar su la pérdida observada de tinción DARPP-32 estaba asociada con activación de microglía, se tiñeron secciones tisulares con un anticuerpo anti-Iba1 para identificar microglía tanto en reposo como reactiva en todo el cerebro. Los cuerpos estriados inyectados con AAVsh2.4-GFP y AAVsh30.1-GFP mostraron alta expresión de Iba1, mientras que los cuerpos estriados inyectados con AAVsh8.2-GFP fueron similares a los ratones de control (Fig. 36D, *panel inferior*). Además, los ratones inyectados con AAVsh2.4-GFP y AAVsh30.1-GFP mostraron drástica astrogliosis reactiva en comparación con ratones inyectados con AAVsh8.2-GFP y de control, como se evidencia por la fuerte tinción de GFAP en áreas del cuerpo estriado correspondientes a alta positividad a GFP (datos no mostrados). De forma notable, un control de discordancia para la secuencia 2.4, AAVsh2.4mis-GFP, indujo toxicidad similar a sh2.4 y sh30.1, sin reducir la expresión de ARNm de HDh. Esto indica, además de los datos de sh8.2, que tres (dos activos, uno inactivo) de cuatro ARNhc eran tóxicos y que la toxicidad no está causada por silenciamiento de huntingtina.
50

Aunque todos los casetes de expresión de U6-ARNhc se clonaron en el mismo vector viral, los inventores ensayaron la posibilidad de que la toxicidad se correlacionara con los niveles en estado estacionario de los productos expresados. Se analizaron muestras de ARN recogidas de cuerpos estriados tratados con ARNhc por transferencia de Northern de transcrito pequeño que sondea los ARN maduros antisentido (AS) y con sentido (S) generados por el ARNhc respectivo. Los resultados demuestran que el ARN sh2.4 AS y el ARN sh30.1AS se expresan de forma más fuerte que el ARN sh8.2 AS ($n=2$ por grupo, Fig. 38), correlacionando de este modo la toxicidad con los niveles de expresión aumentados de los ARNhc *in vivo*. La disparidad en los niveles de expresión es interesante, particularmente dado el hecho de que cada ARNhc se diseñó usando las mismas normas, se inyectó a la misma dosis, estaba dirigido por el mismo promotor Pol-III y silenciaba el ARNm de HDh a un grado similar. De forma notable, las hebras con sentido y los productos pre-procesados para los ARNhc no fueron detectables en lisados cerebrales, lo que sugiere que la toxicidad se debe, en parte, a altos niveles de ARN inhibidores en lugar de carga inapropiada de la hebra con sentido en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC).
60

65 Los miARN artificiales se expresan a niveles inferiores respecto a ARNhc

Como los ARNhc tóxicos se expresaban a niveles mayores que la horquilla no tóxica activa, un enfoque para reducir la toxicidad sería disminuir el título viral inyectado. En cerebro, la disminución de los títulos en semilog ($1e^{12}$) o log completo ($5e^{11}$) consiguió silenciamiento del ARNm de HDh (47% y 51%, respectivamente) pero no mitigó la toxicidad del cuerpo estriado (Fig. 39). La disminución de los títulos incluso adicionalmente ($1e^{11}$ o $5e^{10}$) redujo la eficacia de silenciamiento hasta el 15% de los controles, haciéndolo no viable como terapéutico (Fig. 39). Por tanto, los inventores ensayaron si los niveles de ARN inhibidores podrían minimizarse sin comprometer la eficacia de silenciamiento usando un miARN artificial como lanzadera de ARNip (frente a un ARNhc).

Como se muestra en el Ejemplo 4 anterior, los miARN artificiales silencian de forma eficaz la expresión génica diana respecto a los ARNhc, sin generar niveles excesivos de ARN inhibidores. Por consiguiente, los inventores clonaron dos de las secuencias tóxicas (HD2.4 y HD2.4mis) en una estructura de miARN artificial basada en miR-30 humano, creando de este modo mi2.4 y mi2.4mis (Fig. 40A). Los niveles de expresión de mi2.4 y sh2.4 primero se compararon por análisis de transferencia de Northern de transcrito pequeño a las 48 h después de la transfección de plásmidos que expresan iARN en células HEK 293. El sondeo de la hebra antisentido HD2.4 reveló que mi2.4 produce niveles sustancialmente inferiores de ARN inhibidores respecto a sh2.4. De forma notable, sh2.4 genera una abundancia de ARN precursores y procesados, incluso a una dosis 10 veces inferior (Fig. 40B). A pesar de la drástica diferencia en los niveles de expresión, mi2.4 redujo los transcritos endógenos de HD casi tan eficazmente como sh2.4 (silenciamiento del 50% y el 60%, respectivamente) en células HEK 293 (Fig. 40C).

Los miARN artificiales mitigan la toxicidad del cuerpo estriado en ratones

A continuación, se generaron AAV2/1 que expresa mi2.4 o el control discordante de mi2.4 (Fig. 36B, 40A) para ensayar si el desarrollo de la toxicidad del cuerpo estriado podría prevenirse respecto a AAVsh2.4-GFP. Como la toxicidad inducida por ARNhc no era dependiente del modelo de enfermedad, se realizaron estudios posteriores en ratones de tipo silvestre. Se inyectó a los ratones en el cuerpo estriado derecho AAVsh2.4-GFP, AAVmi2.4-GFP o AAVmi2.4mis-GFP y se sacrificaron 4 meses después de la inyección. El curso de tiempo, el volumen y el título fueron idénticos a los usados en nuestros estudios previos de ARNhc (Fig. 36). La QPCR realizada sobre ARN aislado de cuerpo estriado de ratón mostró una reducción estadísticamente significativa de ARNm de HDh (~70%) después del tratamiento con vectores que expresan sh2.4 o mi2.4 en comparación con cuerpos estriados no inyectados o cuerpos estriados tratados con mi2.4mis (Fig. 39A, $F(2,8) = 77,6$, $P < 0,001$ para análisis post hoc que comparan sh2.4 y mi2.4 frente a no inyectados y mi2.4mis). De forma importante, el grado de silenciamiento de ARNm de HDh entre sh2.4 y mi2.4 fue similar y no significativamente diferente ($P > 0,05$). Se realizaron análisis adicionales de QPCR en estas muestras para medir el ARNm de CD11b, una lectura para la activación de microglía, como evaluación inicial para la toxicidad. Los cuerpos estriados tratados con sh2.4 mostraron un aumento de casi 4 veces del ARNm de CD11b respecto a cuerpos estriados no inyectados, mientras que los cuerpos estriados tratados con mi2.4 y mi2.4mis mostraron inducción solamente mínima (Fig. 5B, $F(2,8) = 23,6$, $P < 0,001$ para análisis post-hoc que comparan sh2.4 con todos los demás grupos). Para determinar si estas diferencias en la toxicidad podrían atribuirse a los niveles de ARN inhibidores de HD2.4, los inventores realizaron análisis de transferencia de Northern en las mismas muestras de ARN usadas para los análisis de QPCR. Aunque las eficacias de silenciamiento entre los grupos tratados con sh2.4 y mi2.4 fueron comparables, el análisis de transferencia de Northern, que sondea la hebra antisentido HD2.4, demostró considerablemente más ARN antisentido maduros en ratones tratados con sh2.4 respecto a ratones tratados con mi2.4 (Fig. 39C). Estos resultados corroboran nuestros hallazgos *in vitro* y correlacionan la mejora en la toxicidad con los niveles reducidos de ARN antisentido HD2.4.

Los inventores evaluaron adicionalmente la toxicidad en el cuerpo estriado por análisis histológicos. El inmunomarcaje para la expresión de DARPP-32 reveló atenuación significativa de la toxicidad en el cuerpo estriado en cohortes inyectadas con AAVmi2.4-GFP respecto a ratones inyectados con AAVsh2.4-GFP (Fig. 39D, panel central). Además, la intensa activación de la microglía (células Iba1 positivas) observada en ratones inyectados con AAVsh2.4-GFP estuvo escasamente presente en ratones inyectados con AAVmi2.4-GFP (Fig. 39D, panel inferior y Fig. 41). Cabe indicar que los cerebros tratados con mi2.4mis también mostraron ausencia de toxicidad aparente por estos análisis mientras que 2.4mis fue tóxico cuando se suministró como un ARNhc. Por tanto, las secuencias que codifican HD2.4 y HD2.4mis fueron tóxicas en el ámbito de un ARNhc en cerebro, pero no en el contexto de una estructura de miARN.

DISCUSIÓN

Aquí, se ha demostrado que algunos ARNhc causan toxicidad en cuerpo estriado de ratón independientemente del silenciamiento de ARNm de HDh. Similar al presente trabajo, Grimm y colaboradores observaron toxicidad hepática aguda y mortalidad en ratones después de suministro sistémico de ARNhc, que se correlacionó con niveles aumentados de ARN antisentido maduro (Grimm et al., 2006, Nature 441, 537-41). Sin embargo, existen importantes diferencias entre los presentes hallazgos. En primer lugar, Grimm *et al.* descubrieron que disminuir la dosis del vector en aproximadamente 10 veces mejoraba significativamente los efectos letales de algunos ARNhc sobre la función hepática y la viabilidad animal. En los presentes estudios, reducir la dosis condujo a transducción inferior en todo el cuerpo estriado, pero no anuló la toxicidad. En segundo lugar, los datos Grimm y colaboradores mostraron acumulación significativa de precursores de ARNhc en células hepáticas. Atribuyeron la toxicidad hepática, en parte, la saturación de la maquinaria endógena de exportación de iARN. En el presente trabajo, los inventores detectaron

abundantes niveles de ARNhc no procesados *in vitro*, pero de forma interesante, bajos hasta niveles indetectables *in vivo*. Esto sugiere que la exportación probablemente no era limitante en los presentes estudios. Como alternativa, la toxicidad en el cuerpo estriado puede estar causada por la acumulación de ARN antisentido y posterior silenciamiento desviado de su diana de ARNm no pretendidos. Los presentes datos sobre sh8.2 también son coherentes con esto; sh8.2 no fue tóxico cuando se suministró a la misma dosis que sh2.4 y sh30.1. Y aunque la actividad de silenciamiento fue similar entre los tres ARNhc, los niveles de producto maduro para sh8.2 fueron significativamente inferiores.

Los inventores descubrieron que mover las secuencias HD2.4 y HD2.4mis, ambas cuales causaban toxicidad en el contexto de un ARNhc, a una estructura de miARN reducía significativamente la neurotoxicidad dentro del cuerpo estriado sin sacrificio en la eficacia de silenciamiento génico. Los inventores correlacionaron este efecto positivo con niveles inferiores en estado estacionario de ARN antisentido maduros procesados a partir del mi2.4 artificial respecto a sh2.4. Si esta disparidad en los niveles de expresión resulta de diferencias en la transcripción o estabilidad entre ARNhc y miARN artificiales sigue siendo desconocido. Sin embargo, lo último proporciona una explicación más probable ya que sh2.4 y mi2.4 se expresan a partir del mismo promotor U6 de ratón y solamente difieren en el tamaño en aproximadamente 100 nucleótidos.

Además de perfiles de seguridad mejorados, los miARN artificiales son susceptibles a transcripción mediada por Pol-II. Por el contrario, los ARNhc tienen flexibilidad de espaciado limitada para expresar ARNhc a partir de promotores basados en Pol II. Esta ventaja de los sistemas basados en miARN permite una expresión regulada y específica de célula de ARN inhibidores. Estas estrategias versátiles de expresión promueven la aplicación de miARN artificiales como herramientas biológicas y pueden limitar adicionalmente la toxicidad potencial en aplicaciones terapéuticas.

En algunas enfermedades, es posible abordar específicamente SNP ligados a enfermedad que existen en el transcrito mutante. Para HD, sin embargo, no se ha informado de SNP prevalentes. Como los trabajos previos mostraron que se requería una expresión mínima del 50% de huntingtina para contrarrestar la letalidad embrionaria observada en ratones nulos para huntingtina, es importante conocer las consecuencias de reducir la expresión de huntingtina en cerebro adulto para hacer progresar la iARN no específica de alelo como terapia contra HD. Los presentes datos con sh8.2 y mi2.4 son alentadores, y sugieren que el cerebro de mamífero puede tolerar más del 50% de reducción en el ARNm de HD durante 4 meses, el último punto temporal estudiado. La seguridad y eficacia a largo plazo de sh8.2 se están ensayando actualmente en un estudio que incluye lecturas histoquímicas, bioquímicas y del comportamiento en ratones CAG140 HD.

En resumen, los presentes experimentos muestran que se tolera la reducción de los niveles de ARNm de HDh en cerebro de mamífero adulto. Los inventores también hacen la importante observación de que la toxicidad de ARNhc después de su expresión en cerebro se mitiga moviendo las secuencias de ARN inhibidor a una estructura de miARN artificial. Por tanto, los enfoques basados en miARN son más adecuados para conseguir iARN en cerebro para abordar cuestiones básicas de investigación o desarrollar terapias contra enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Vectores de expresión y AAV

Se generaron casetes de expresión de ARNhc por PCR y se clonaron en vectores pCR-Blunt-II TOPO (Invitrogen™). Cada casete de expresión candidato de ARNhc consistía en un promotor U6 de ratón, un ARNhc que aborda secuencias de huntingtina, secuencias de control discordantes que contienen cuatro cambios de pares de bases respecto al ARNhc respectivo de huntingtina o β -galactosidasa de *E. coli* (shLacZ) y una secuencia terminadora de ARN polimerasa III (seis nucleótidos de timidina). Para miARN artificiales, se incluyeron secuencias de ARNip basadas en HD2.4 o HD2.4mis en una estructura de miARN artificial comparable a miR-30 humano, para generar mi2.4 y mi2.4mis (estructura general mostrada en la Figura 4A). Los troncos-bucles de miARN artificial se clonaron en un vector de expresión de U6 de ratón de modo que más de 30 nucleótidos (5' y 3') flanquearan el tronco-bucle en el producto transcrito.

Los plásmidos lanzadera de AAV pAAVsh2.4-GFP, pAAVsh2.4mis-GFP, pAAVsh8.2-GFP, pAAVsh30.1-GFP, pAAVmi2.4-GFP y pAAVmi2.4mis-GFP contienen los respectivos casetes de expresión de iARN dirigidos por el promotor U6 de ratón. Las lanzaderas de AAV también contenían un gen de GFP de *Renilla* humanizado (hrGFP) bajo el control de la región potenciadora/promotora del gen temprano inmediato de citomegalovirus de seres humanos, un casete de expresión quimérico de β -globina humana y eGFP seguido del sitio donante de corte y ajuste/sitio aceptor de corte y ajuste de inmunoglobulina humana, y un señal poli (A) de hormona bovina del crecimiento. Estas unidades transcripcionales están flanqueadas en cada extremo por secuencias de repetición terminar invertidas de 145 pb de AAV serotipo 2. Los plásmidos de empaquetado trans, pBSHSPR2C1, se construyeron del siguiente modo: se extrajo el ADN genómico de AAV1 (American Type Culture Collection) y se amplificó la secuencia codificante *cap* por PCR usando polimerasa *Pfx* (Invitrogen™). Se escindió el gen *cap* de AAV2 del plásmido auxiliar de AAV2 pBSHSPRC2.3 y de reemplazó con la secuencia *cap* amplificada de AAV1 usando un sitio de restricción *Swa* I en la unión intergénica *rep/cap* y un sitio *Bsr*GI diseñado por ingeniería justo cadena arriba de la señal poli(A) de AAV2. La construcción resultante de empaquetado trans, pBSHSPR2C1,

contiene el gen *rep* de AAV2 bajo el control de un promotor eucariota mínimo, y la ORF de *cap* de AAV1 posicionada entre la unión intergénica *rep/cap* de AAV2 y la señal poli(A) de AAV2. El plásmido pAd auxiliar 4.1 expresa los genes E2a, E4-orf6 y VA de adenovirus tipo 5 (Ad5) para amplificación de AAV.

- 5 Se produjeron vectores AAV recombinantes mediante un método convencional de transfección con fosfato de calcio en células HEK 293, usando los plásmidos Ad auxiliares, de empaquetado trans y lanzadera AAV. Los títulos de vector se determinaron por PCR a tiempo real y fueron entre 5 y 20×10^{12} partículas resistentes a DNasa (DRP)/ml. La infectividad del vector se evaluó en un ensayo TCID50 usando la línea celular B50 basada en HeLa.

10 Animales

Todos los protocolos en animales fueron aprobados por el ACUCA en la Universidad de Iowa. Se criaron ratones knock-in heterocigóticos CAG140 y camadas de tipo silvestre y se mantuvieron en el vivario de animales en la Universidad de Iowa. Los ratones se genotiparon y se identificó la longitud de repetición por reacciones diferentes de PCR usando cebadores que flanquean la repetición CAG. Los ratones se alojaron en grupos de dos o tres por jaula y en un entorno de temperatura controlada en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Se proporcionó comida y agua ad libitum.

20 Inyecciones de AAV

- Se inyectó a ratones knock-in CAG140 o de tipo silvestre AAVARNhc o AAV-miARN (al título indicado) a las 5 semanas de edad y se sacrificaron a los 4 meses después de la inyección. Los procedimientos fueron los siguientes: en el estudio inicial, se hicieron inyecciones de 5 μ l de AAVsh2.4GFP, AAV30.1sh-GFP, AAVsh8.2-GFP o AAV-GFP de forma bilateral en el cuerpo estriado (coordenadas: 0,86 mm rostral hasta bregma, \pm 1,8 mm lateral hasta línea central, 3,5 mm ventral hasta la superficie craneal). Para el estudio de comparación de miARN/ARNhc, se hicieron inyecciones de 5 μ l de vector de forma unilateral. Las tasas de inyección para todos los estudios fueron 0,2 μ l/min. Los ratones usados en análisis histológicos se anestesiaron con una mezcla de ketamina/xilazina y se perfundieron por vía transcardiaca con 20 ml de solución salina fría al 0,9%, seguido de 20 ml de paraformaldehído al 4% en tampón PO_4 0,1 M. Se retiraron los cerebros, se post-fijaron durante una noche, y se recogieron secciones de 40 μ m de grosor. Los ratones usados para análisis moleculares se perfundieron con 20 ml de solución salina fría al 0,9%, se retiraron los cerebros y se bloquearon en porciones coronales de 1 mm de grosor. Se tomaron perforaciones tisulares usando un cortador tisular (1,4 mm de diámetro). Todas las perforaciones tisulares se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

35 Estudios moleculares

- Para selección de ARNhc *in vitro*, se transfectaron plásmidos de expresión de ARNhc (Lipofectamina 2000, Invitrogen™) en células HEK 293 humanas o células C2C12 de ratón, que expresan de forma natural huntingtina humana o de ratón de longitud completa, respectivamente. Se evaluaron los niveles de huntingtina por dot blot de proteínas (anticuerpo primario anti-huntingtina MAB2166, 1:5000; Chemicon) o transferencia de western (control de carga de proteína, anti- β Catenina, 1:4,000, AbCam). También se evaluó el silenciamiento por QPCR usando un conjunto de cebador/sonda TaqMan® específico de huntingtina humana con normalización a un conjunto de cebador/sonda de GAPDH humano. También se usó esta estrategia de QPCR para evaluar el silenciamiento de HD mediado por sh2.4 y mi2.4 en la Fig. 40B.

- Para análisis de QPCR *in vivo*, se diseccionó tejido del cuerpo estriado GFP-positivo y se evaluó la expresión génica relativa usando conjuntos de cebador/sonda TaqMan® para HDh, CD11b, y beta-actina de ratón. Todos los valores se cuantificaron usando el método $\Delta\Delta\text{C}_T$ (que normaliza a beta-actina) y se calibraron a cuerpos estriados inyectados con AAV-GFP (estudio de exploración) o cuerpos estriados no inyectados (estudio de comparación de miARN - ARNhc).

- Para análisis de transferencia de Northern, se diseccionó tejido de cuerpo estriado GFP-positivo. Se recogió el ARN por reactivo TRIzol® (Invitrogen™) y se resolvió el ARN (1 a 5 μ g y 15 μ g para estudios *in vivo* e *in vitro*, respectivamente) en geles de poli(acrilamida/urea) al 15%, y se visualizó el ARN por tinción con bromuro de etidio y exposición a UV para evaluar la carga y la calidad del ARN. Las muestras después se transfirieron a membrana Hybond™-N+/XL (Amersham Pharmacia) y se reticularon por UV. Las transferencias se sondearon con oligonucleótidos marcados con ^{32}P a 30-36°C durante una noche, se lavaron en SSC 2X a 30-36°C, y se expusieron a la película.

- Para análisis de transferencia de Western *in vivo*, se diseccionó tejido de cuerpo estriado GFP-positivo, se lisó en 150 μ l de tampón de lisis y se cuantificó el nivel de proteínas con el ensayo de proteínas DC (Bio-Rad). Se separaron 10 μ g de proteína total en un gel de SDS-poli(acrilamida) al 8% antes de transferir a una membrana de PVDF de 0,45 μ m. La membrana se bloqueó con leche al 2% en PBS-Tween 20 (0,05%) y se incubó con un anticuerpo anti-huntingtina (1:5000, Chemicon) o un anticuerpo anti- β -actina (1:10,000, Sigma) seguido de un

anticuerpo secundario de cabra conjugado anti-ratón (1:10,000, Jackson ImmunoResearch) y sustrato ECL-Plus (Amersham Biosciences) y después se expuso a la película.

Análisis inmunohistoquímicos

5 Se procesaron secciones cerebrales coronales de flotación libre de cuarenta micrómetros de grosor para visualización inmunohistoquímica de neuronas del estriado (DARPP-32, 1:100, Cell Signaling Technology) y microglía (Iba1, 1:1000, WAKO) usando el procedimiento de anticuerpo marcado con biotina. Las incubaciones con anticuerpo primario fueron durante 24 horas a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron en anticuerpos secundarios de cabra anti-IgG biotinilada de conejo (1:200, Vector Laboratories, 1 h a temperatura ambiente). En todos los procedimientos de tinción, la eliminación del anticuerpo primario sirvió como control. Las secciones se montaron en portaobjetos Superfrost™ Plus y se cubrieron con Gelmount (Biomed). Las imágenes se capturaron usando un microscopio óptico Olympus BX60 y cámara digital DP70, junto con el software Olympus DP Controller.

15 Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software estadístico Sigma Stat. Los análisis de QPCR para la expresión de huntingtina y CD11b se realizaron usando un análisis de un factor de la varianza (ANOVA), como fue el análisis de densitometría de transferencia de Northern. Tras un efecto significativo, se realizaron análisis post-hoc de Bonferroni para evaluar diferencias significativas entre grupos individuales. Se realizó análisis de densitometría de transferencia de Western usando un ensayo t de Student bilateral. En todos los casos, $P < 0,05$ se consideró significativo.

Preparación de la Figura

25 Todas las fotografías se formatearon con el software Adobe® Photoshop®, todos los gráficos se hicieron con el software Prism Graph y todas las figuras se construyeron con el software Adobe® Illustrator.

Ejemplo 7

30 Silenciamiento mediado por iARN de genes

Los inventores han demostrado previamente que los genes pueden silenciarse de un modo específico de alelo. También demostraron que el suministro mediado por virus de ARNip puede reducir específicamente la expresión de genes diana en diversos tipos celulares, tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta estrategia entonces se aplicó para reducir la expresión de una proteína de enfermedad por poliglutamina neurotóxica. La capacidad de los vectores virales de transducir células de forma eficaz *in vivo*, acoplada con la eficacia de los ARNip expresados de forma viral aquí mostrados, amplía la aplicación de ARNip a terapias basadas en virus y experimentos de direccionamiento *in vivo* que aspiran a definir la función de genes específicos.

40 La enfermedad de Huntington (HD) es una de varias enfermedades neurodegenerativas dominantes provocadas por una mutación de tóxica similar aumento de función en la proteína de enfermedad: la expansión de un tramo que codifica poliglutamina (poliQ). Está bien establecido que para HD y otras enfermedades por poliglutamina, la longitud de la expansión se correlaciona de forma inversa con la edad de aparición de la enfermedad. Los modelos animales para HD han proporcionado importantes indicios sobre el modo en que la huntingtina mutante (htt) induce la patogénesis. Actualmente, no existe tratamiento neuroprotector para HD. La interferencia de ARN ha surgido como enfoque candidato principal para reducir la expresión de genes de enfermedad por direccionamiento al ARNm codificante para su degradación.

50 Aunque el efecto de una reducción parcial de htt de tipo silvestre en neuronas adultas es desconocido, es ventajoso abordar la htt mutante solamente para su degradación, si es posible. La iARN específica de alelo de enfermedad se diseña usando enfoques que conducen al silenciamiento específico de alelo para otros modelos de enfermedad neurogénica. Esto permite un silenciamiento dirigido del alelo expandido mutante que causa enfermedad, dejando el alelo normal intacto.

55 La expresión constitutiva de ARNhc puede prevenir los fenotipos neuropatológicos y de comportamiento en un modelo de ratón de ataxia espinocerebelosa tipo I, una enfermedad por poliQ relacionada. Sin embargo, la expresión constitutiva de ARNhc puede no ser necesaria, particularmente para patologías que tardan muchos años en desarrollarse pero pueden eliminarse en unas pocas semanas o meses. Por esta razón, y para reducir los efectos a largo plazo que pueden surgir si se aprecia silenciamiento no específico o activación de respuestas de interferón, la expresión controlada puede ser muy importante. Para regular la iARN para aplicación a enfermedades, se han desarrollado vectores sensibles a doxiciclina para un silenciamiento controlado *in vitro*.

65 La mayoría de los eucariotas codifican una cantidad sustancial de ARN no codificantes pequeños llamados micro ARN (miARN). El mir-30 es un miARN humano de 22 nucleótidos que puede procesarse de forma natural a partir de un transcrito más largo que alberga el precursor de tronco-bucle de miR-30 propuesto. El mir-30 puede inhibidor de

forma traduccional un ARNm que alberga sitios diana artificiales. El tronco del precursor de mir-30 puede sustituirse con un tronco heterólogo, que puede procesarse para producir nuevos miARN y puede bloquear la expresión de ARNm endógenos.

5 Son posibles dos estrategias para abordar una secuencia particular, tal como el gen implicado en la enfermedad de Huntington (Fig. 42A y 42B). Se pueden desarrollar moléculas de iARN no específicas de alelo, y se han desarrollado candidatos basados en ARN inhibidores de 8.2. Como alternativa, pueden desarrollarse moléculas de iARN específicas de alelo. Los inventores han trabajado para desarrollar moléculas de iARN que abordan varios polimorfismos clave de un único nucleótido (SNP). Estas moléculas de iARN, sin embargo, puede limitarse al
10 tratamiento de familias/pacientes específicos.

En otro enfoque, que es el enfoque usado en la presente invención, los inventores abordaron la región de expansión. Este enfoque tiene la ventaja de ser capaz de tratar poblaciones HD completas, y no solamente aquellas con SNP específicos. Estas moléculas de iARN son diferentes porque en lugar de abordar un SNP para especificidad de alelo, estas secuencias aprovechan la integridad estructural en los sitios que flanquean la región de expansión. Los datos
15 de ARNip muestran que son eficaces. Los presentes inventores también los han movido a vectores de expresión de miARN, que también fueron eficaces.

Los inventores han generado y ensayado las siguientes moléculas de iARN:

20

ARNip	Secuencia
HDAS 07	AUGAAGCCUUCGAGUCCCUC (SEC ID N° 215)
HDAS 18	GGCGACCCUGGAAAAGCUGAU (SEC ID N° 216)
HDAS 19	UGGCGACCCUGGAAAAGCUGA (SEC ID N° 217)
HAS 20	AUGGCGACCCUGGAAAAGCUG (SEC ID N° 218)

Secuencia miHD7A1

**AAAACUCGAGUGAGCGCUGAAGGCCUUCGAGUCCCUCACCG
UAAAGCCACAGAUGGGUGAGGGACUCGAAGGCCUUCAUCGCCUACU
AGUAAAA (SEC ID N°: 219)**

25

Secuencia miHD7A2

**AAAACUCGAGUGAGCGCUGAAGGCCUUCGAGUCUUUUACC
GUAAAGCCACAGAUGGGUGAGGGACUCGAAGGCCUUCAUCGCCUAC
UAGUAAAA (SEC ID N°: 220)**

30

Secuencia miHD7B1

**AAAACUCGAGUGAGCGCAUGAAGGCCUUCGAGUCCCUCCCG
UAAAGCCACAGAUGGGGAGGGACUCGAAGGCCUUCAUCCGCCUACU
AGUAAAA (SEC ID N°: 221)**

Secuencia miHD7B2

**AAAACUCGAGUGAGCGCAUGAAGGCCUUCGAGUCUUUUCC
GUAAAGCCACAGAUGGGGAGGGACUCGAAGGCCUUCAUCCGCCUAC
UAGUAAAA (SEC ID N°: 222)**

35

Las diferentes tipografías muestran las diversas partes del miARN. En orden secuencial, la secuencia de tronco del miARN se muestra en **negrita**, después la hebra con sentido en tipo normal, después la secuencia de bucle en **cursiva negrita**, después la hebra antisentido en tipo normal, y por último, parte de la secuencia de tronco en **negrita**.

5 Los inventores generaron construcciones para evaluar el silenciamiento específico de alelo de Htt (Fig. 43A y 43B). Se generaron dos plásmidos que expresaban huntingtina de tipo silvestre de longitud completa (Fig. 43A, pCMV-FLHtt 18Q-Flag) o mutante (Fig. 43B, pCMV-FLHtt 83Q-V5). La huntingtina de longitud completa de tipo silvestre y mutante se expresan bajo el control del promotor CMV y cada ADNc tiene marcas epitópicas distintas para diferenciar su expresión por transferencia de Western. Para normalizar las eficacias de transfección se incluyeron luciferasa de Renilla (htt WT) o luciérnaga (htt mutante) en el mismo plásmido. Este diseño permitió la evaluación de la especificidad de alelo en la misma célula después de co-transfección.

15 Los resultados de transferencia de Western y Q-PCR indican que los ARNip candidatos eran específicos de alelo en el direccionamiento a Htt mutante, pero no a Htt de tipo silvestre (Fig. 44A-44C). Se co-transfectaron células HEK293 con plásmidos que expresaban huntingtina de tipo silvestre y mutante y con diferente secuencia de ARNip. Se obtuvieron ARN total y lisados de proteína 24 horas después de la transfección. Después de selección por Q-PCR y transferencia de Western, se observó que algunas de las secuencias de diseño de ARNip silenciaban de forma preferente el alelo mutante. La Fig. 44A muestra Htt de tipo silvestre y la Fig. 44B muestra Htt mutante. Como se observa en la Fig. 44C, el número de secuencia de ARNip 7 (S7) redujo htt mutante en un 40% y la huntingtina de tipo silvestre en un 6%.

25 Los inventores descubrieron que los ARNip de LNP formulados estaban distribuidos ampliamente después de infusión intraestriado, que los ARNip de LNP formulados reducían Htt en cerebro de ratón adulto a dosis biológicamente relevante, y que los ARNip dirigidas a secuencias que abordan la expansión proporcionaban silenciamiento específico de alelo.

30 Los inventores también descubrieron que las lanzaderas de miARN para silenciamiento específico de alelo de htt podían usarse de forma eficaz (Fig. 45). Se generaron secuencias de miARN basadas en la secuencia de ARNip 7 (S7). Para evaluar la especificidad de silenciamiento, se co-transfectaron células HEK293 con los plásmidos de huntingtina de tipo silvestre y mutante y mi7A1, mi7A2, mi7B1, mi7B2 o miGFP como control. Las células se recogieron 24 horas después de la transfección y se determinó el silenciamiento de Htt de tipo silvestre y mutante por transferencia de Western. Mi7A1 y mi7A2 tuvieron el perfil de silenciamiento más preferente, el último el más beneficioso.

35 La secuencia mi7A1 silencia de forma muy eficaz huntingtina de tipo silvestre o mutante. Esto se debe posiblemente a un exceso de producción de mi7A1. Se comparó la especificidad de silenciamiento de mi7A1 a dosis altas y bajas dosis. Se transfectaron células HEK293 con dos cantidades diferentes de mi7A1 y se obtuvieron lisados de proteína 24 horas después de la transfección. Se determinó el silenciamiento tanto de huntingtina de tipo silvestre como mutante por transferencia de western con anticuerpos específicos contra las marcas epitópicas (Fig. 46A y 46B). Los datos muestran que el silenciamiento preferente para la huntingtina mutante se consigue cuando mi7A1 se transfecta a una dosis baja. La Fig. 46A muestra Htt normal, y la Fig. 46B muestra Htt mutante.

45 Los inventores también evaluaron la preferencia de hebra de lanzaderas de miR (Fig. 47). Se introdujeron diferentes mutaciones en el extremo 3' de la hebra con sentido de las secuencias mi7 (mi7A2 y mi7B2) para promover la carga de la hebra antisentido en el RISC. Para determinar la hebra que se cargaba de forma preferente se diseñaron varias construcciones indicadoras de luciferasa basadas en el vector psichex2. Se co-transfectaron células HEK293 con lanzadera mi7 y también una construcción de indicador para cada hebra y 24 horas después se obtuvieron los extractos celulares. Las secuencias 7A1 y 7A2 mostraron excepcional preferencia de hebra.

50 El uso de los términos "un" y "una" y "el" y "la" y referentes similares en el contexto de describir la invención debe entenderse cubriendo tanto el singular como el plural, salvo que se indique otra cosa en este documento o el contexto lo contradiga claramente. Las expresiones "que comprende", "que tiene", "que incluye", y "que contiene" deben entenderse como expresiones indefinidas (es decir, que significan "incluyendo, aunque sin limitación") salvo que se indique otra cosa. La recitación de intervalos de valores en este documento pretende simplemente servir como método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo, salvo que se indique otra cosa en este documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se recitara individualmente en este documento. Todos los métodos descritos en este documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado salvo que se indique otra cosa en este documento o el contexto lo contradiga claramente.

60

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ácido nucleico que codifica un transcrito de miARN primario artificial (pri-miARN) que consiste en, en orden de posición, una región flanqueante 5', una primera región de ARNip, una región de bucle, una segunda región de ARNip, y una región flanqueante 3', en el que la región flanqueante 5' comprende:
 - (a) una secuencia de unión 5' unida de forma contigua a la primera región de ARNip, en el que la secuencia de unión 5' consiste en 5-7 nucleótidos,
 - 10 (b) una secuencia de abultamiento 5' posicionada cadena arriba de la secuencia de unión 5' que consiste en 1-10 nucleótidos, y
 - (c) una secuencia espaciadora 5' posicionada cadena arriba de la secuencia de abultamiento 5', en el que la secuencia espaciadora 5' es UGGUACCGUU (SEC ID N° 180).
- 15 2. El ácido nucleico de la reivindicación 1, en el que la secuencia de unión 5' codifica GUGASSS, en el que S es un nucleótido G o C, preferiblemente en el que la secuencia de unión 5' codifica GUGAGCG.
3. El ácido nucleico de la reivindicación 2, en el que la secuencia de abultamiento 5' comprende un sitio de clonación, preferiblemente en el que el sitio de clonación codifica un sitio XhoI.
- 20 4. El ácido nucleico de la reivindicación 1, en el que la región flanqueante 5' comprende adicionalmente una secuencia cadena arriba 5' posicionada cadena arriba de la secuencia espaciadora 5', preferiblemente en el que la secuencia cadena arriba 5' es de aproximadamente 30-2000 nucleótidos de longitud.
- 25 5. El ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la región flanqueante 3' comprende una secuencia de unión 3' que se une de forma contigua a la segunda región de ARNip, preferiblemente en el que la secuencia de unión 3' consiste en 5-7 nucleótidos, preferiblemente en el que la secuencia de unión 3' es al menos aproximadamente un 85% complementaria a la secuencia de unión 5', preferiblemente en el que la secuencia de unión 3' codifica CGCYUAC, en el que Y es C o U, preferiblemente en el que la secuencia de unión 3' codifica CGCCUAC.
- 30 6. El ácido nucleico de la reivindicación 5, en el que la región flanqueante 3' comprende adicionalmente una secuencia de abultamiento 3' posicionada cadena abajo de la secuencia de unión 3', preferiblemente en el que la secuencia de abultamiento 3' comprende un sitio de clonación, preferiblemente en el que el sitio de clonación codifica un sitio SpeI/XbaI o un sitio SpeI.
- 35 7. El ácido nucleico de la reivindicación 2, en el que la secuencia de abultamiento 5' codifica UAAACUCGA.
8. El ácido nucleico de la reivindicación 6, en el que la secuencia de abultamiento 3' consiste en aproximadamente 1-10 nucleótidos, preferiblemente en el que la secuencia de abultamiento 3' codifica UAG.
- 40 9. El ácido nucleico de la reivindicación 6 o 8, en el que la secuencia de abultamiento 5' es complementaria a la secuencia de abultamiento 3' en solamente un nucleótido en cada extremo de la secuencia de abultamiento.
- 45 10. El ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 6, 8 o 9, en el que la región flanqueante 3' comprende adicionalmente una secuencia espaciadora 3' posicionada cadena abajo de la secuencia de abultamiento 3', preferiblemente en el que la secuencia espaciadora 3' consiste en 10-12 nucleótidos, preferiblemente en el que la secuencia espaciadora 3' es AGCGGCCGCCA, preferiblemente en el que la secuencia espaciadora 3' es al menos aproximadamente un 70% complementaria a la secuencia espaciadora 5'.
- 50 11. El ácido nucleico de la reivindicación 10, en el que la región flanqueante 3' comprende adicionalmente una secuencia cadena abajo 3' posicionada cadena abajo de la secuencia espaciadora 3', preferiblemente en el que la secuencia cadena arriba 5' no aparea significativamente con la secuencia cadena abajo 3', preferiblemente en el que la secuencia cadena abajo 3' es de aproximadamente 30-2000 nucleótidos de longitud.
- 55 12. El ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que la región de bucle es de 15-19 nucleótidos de longitud, preferiblemente en el que la región de bucle es de 17 nucleótidos de longitud.
- 60 13. El ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la región de bucle codifica CUNNNNNNNNNNNNNNNNGG o CCNNNNNNNNNNNNNNNGG, preferiblemente en el que la región de bucle codifica CUGUGAAGCCACAGAUGGG o CCGUGAAGCCACAGAUGGG.
14. Un ARN codificado por el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
- 65 15. Un casete de expresión que comprende un promotor unido de forma contigua al ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

16. Un vector que comprende el casete de expresión de la reivindicación 15.

17. El vector de la reivindicación 16, en el que el vector es un vector de virus adeno-asociado (AAV).

5 18. Un ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, el casete de expresión de la reivindicación 15, el vector de la reivindicación 16 o 17 para uso en terapia que provoca interferencia de ARN de baja toxicidad.

19. Un ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, el casete de expresión de la reivindicación 15, el vector de la reivindicación 16 o 17 para su uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

10

Figura 1

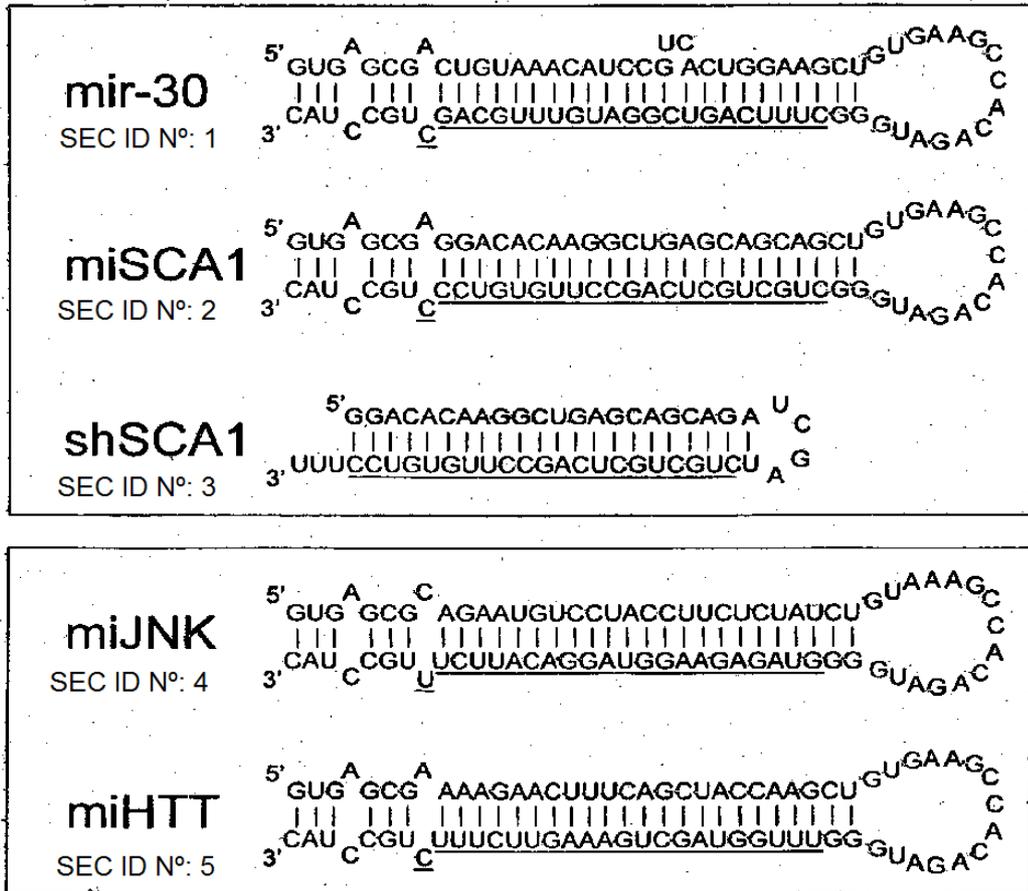


Fig. 2

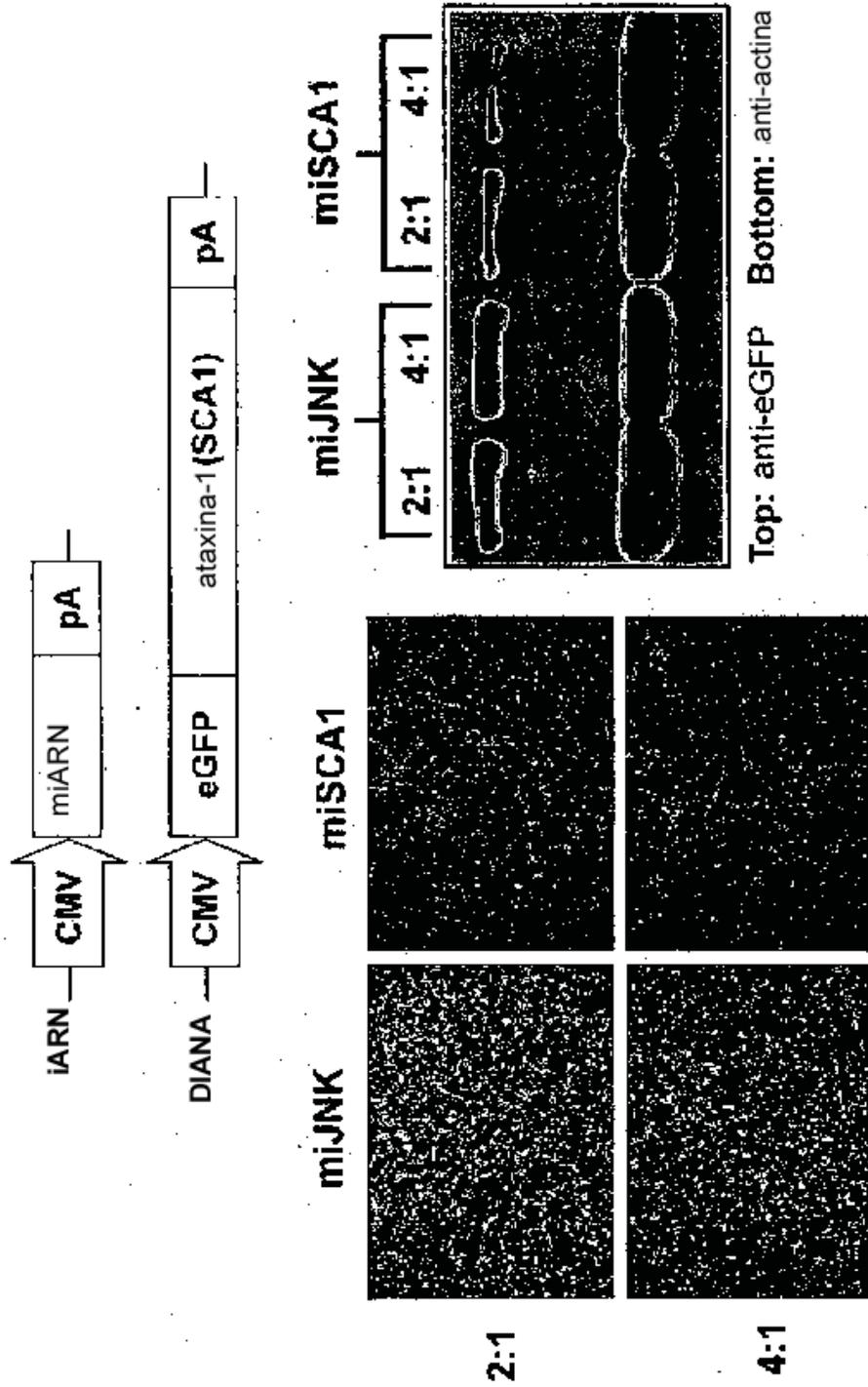


Fig. 3

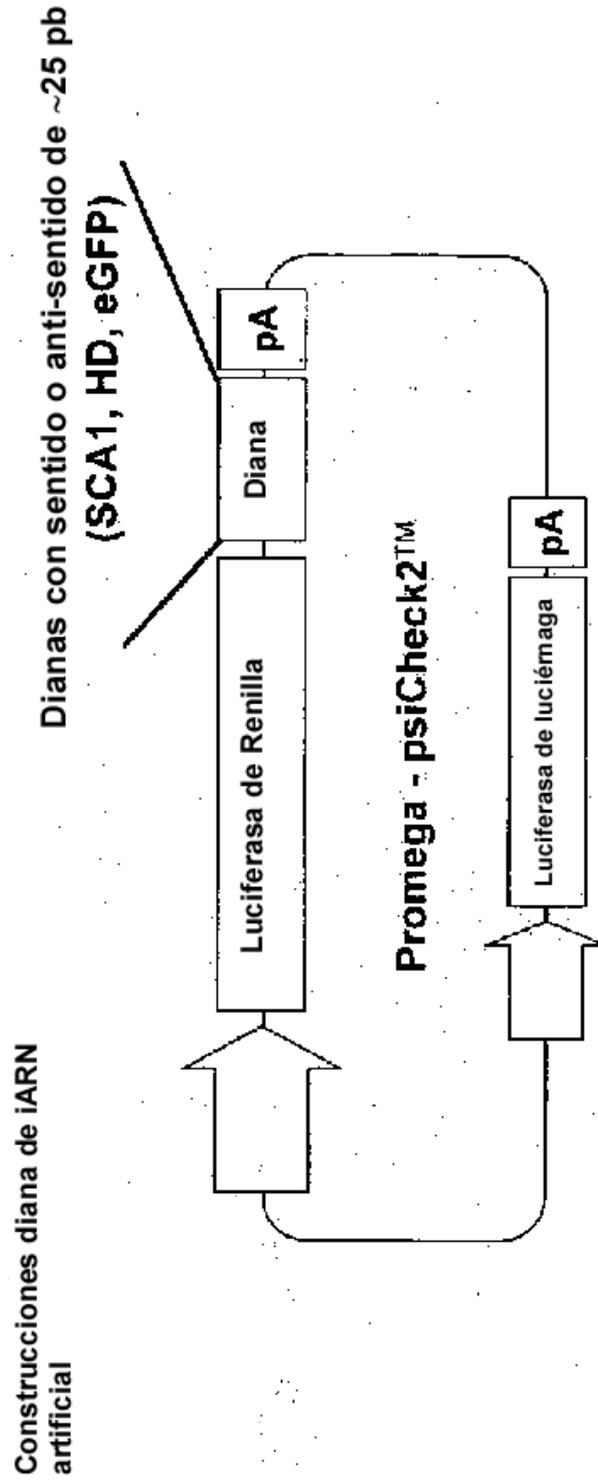


Fig. 4A

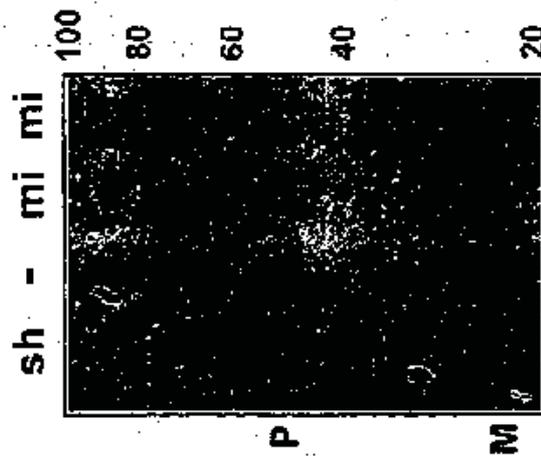


Fig. 4B

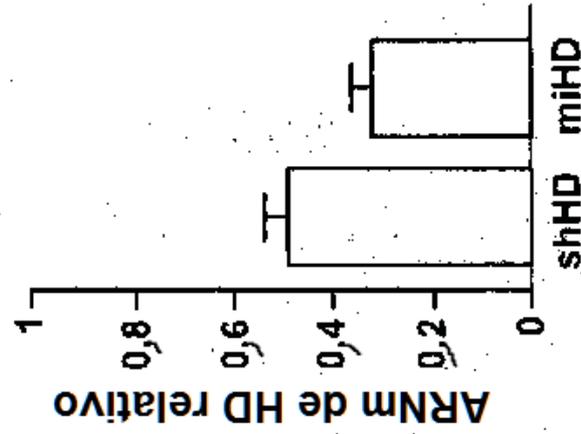


Fig. 4C

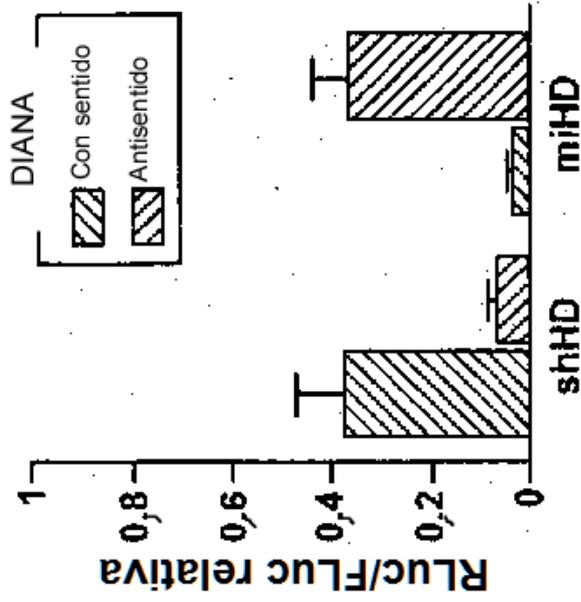


Fig. 5

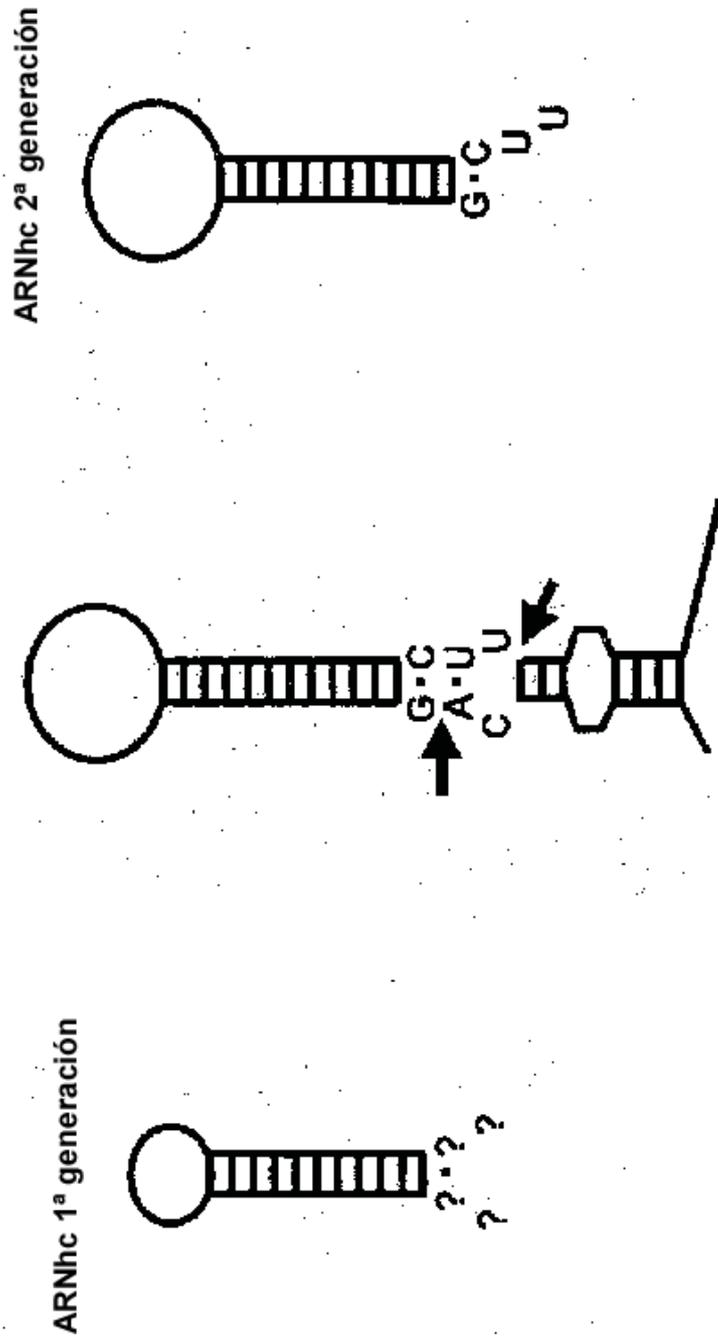


Fig. 6B

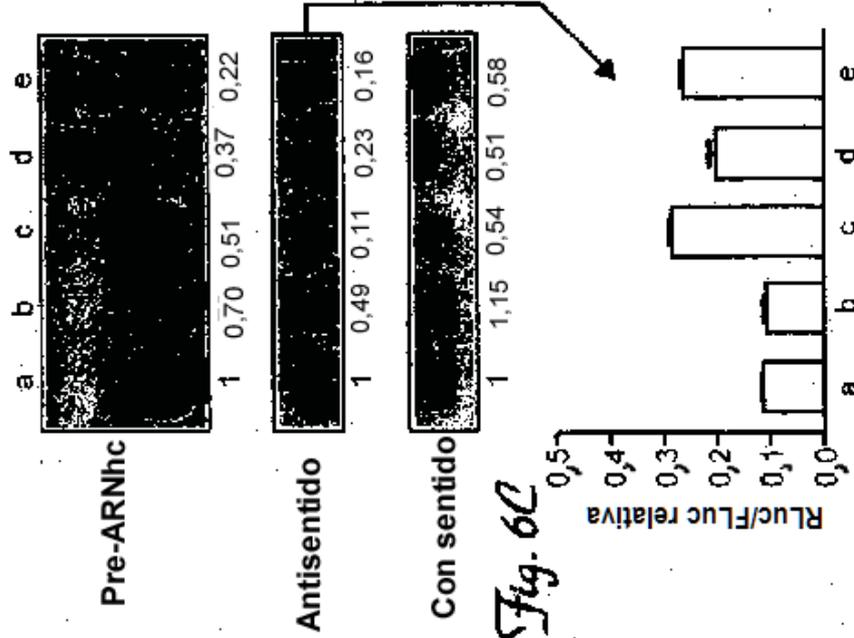


Fig. 6A

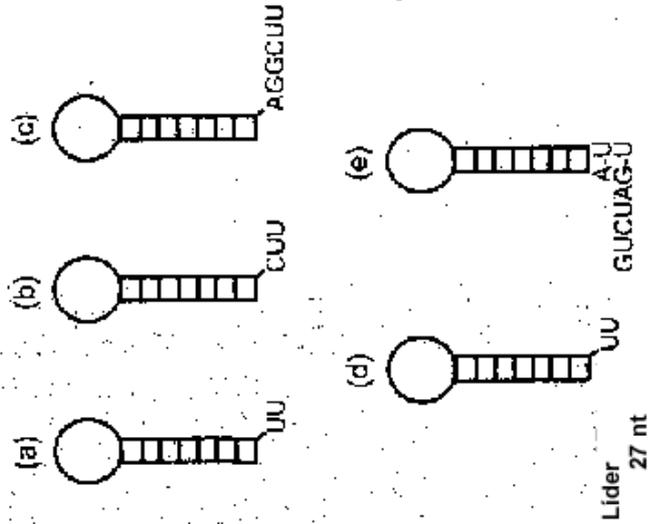


Fig. 6C

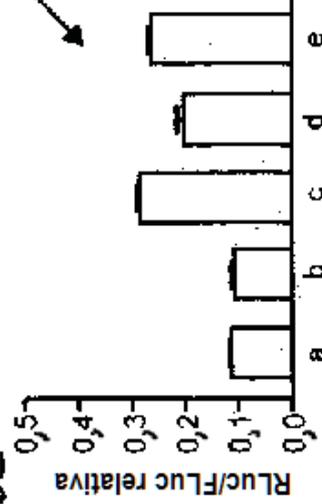


Fig. 7B

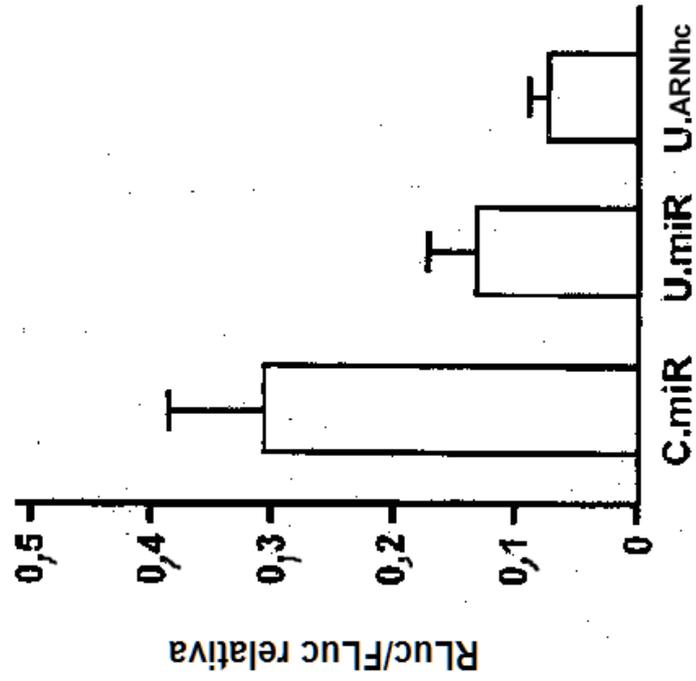


Fig. 7A

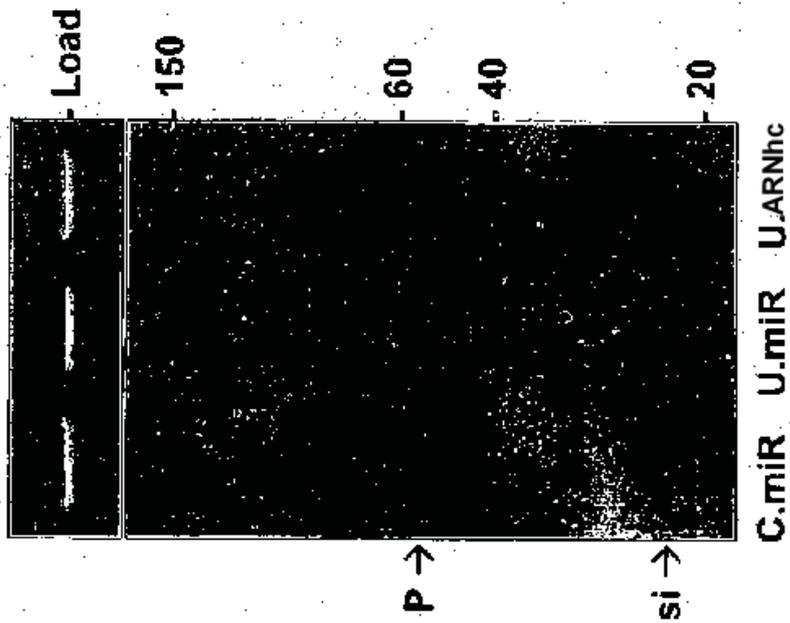


Fig. 8

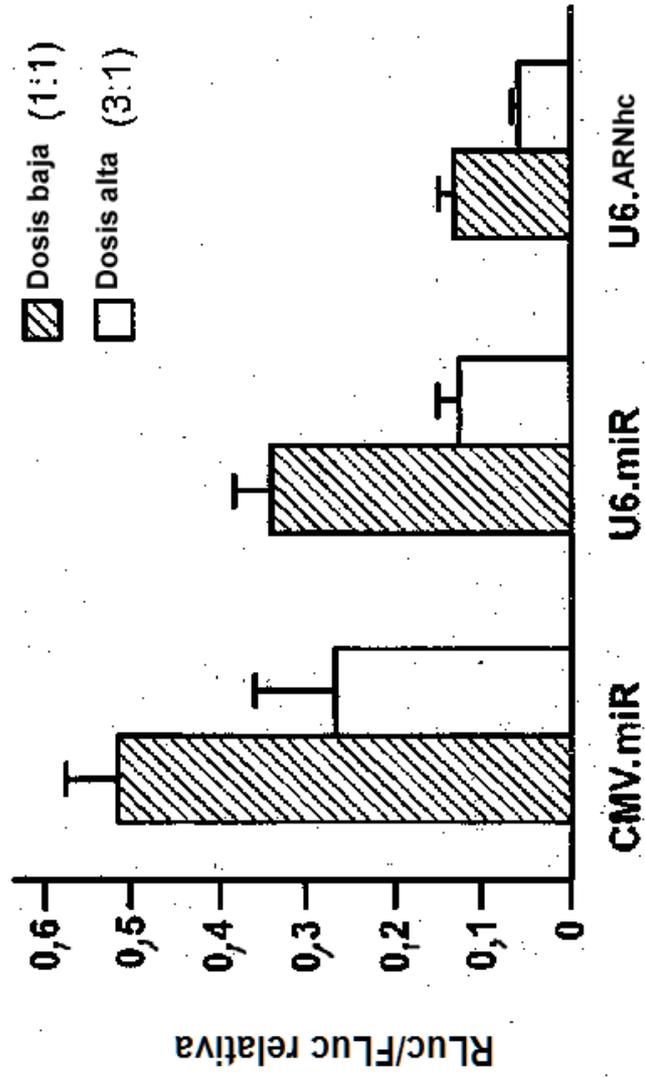
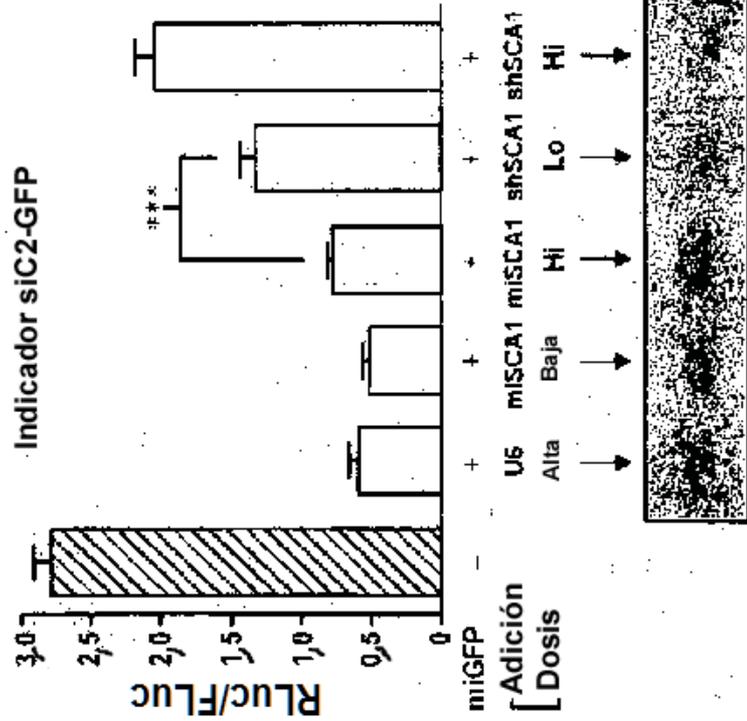


Fig. 9A



Análisis de transferencia de Northern para procesamiento de miGFP

Fig. 9B

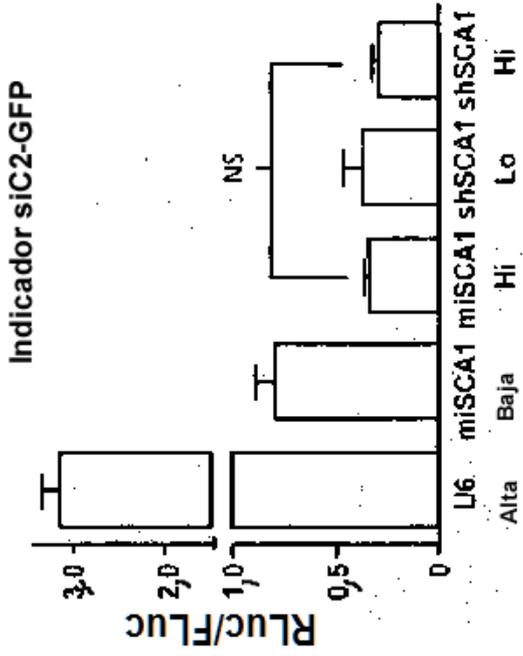


Fig. 10A

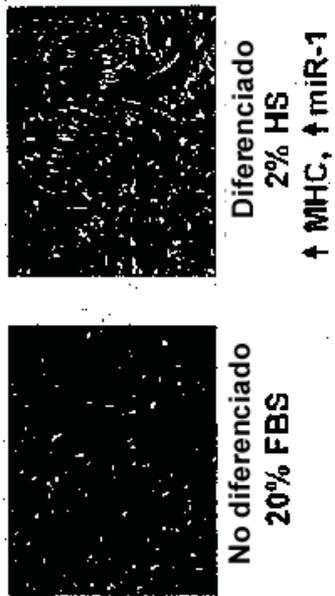


Fig. 10B

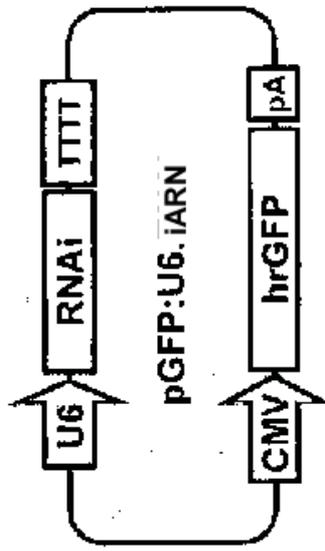


Fig. 10C

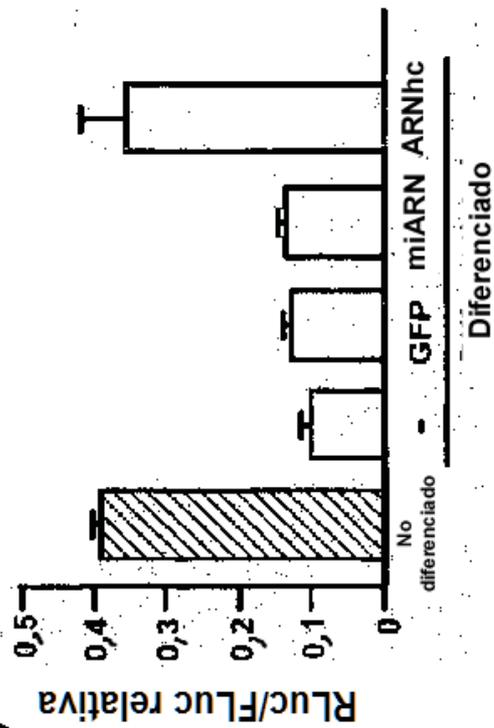


Fig. 10D

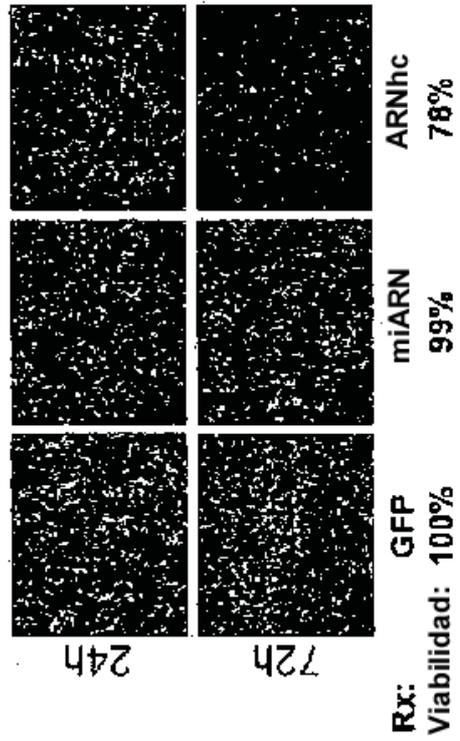
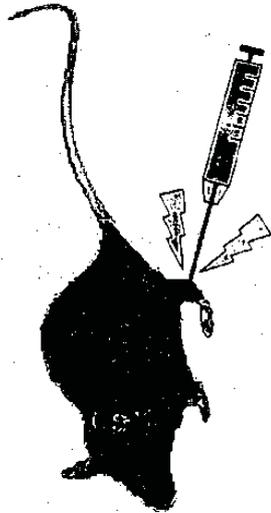
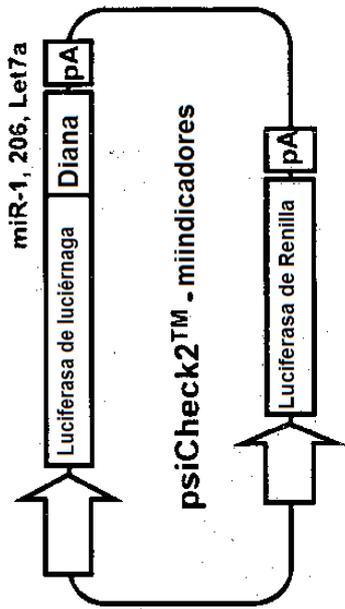


Fig. 11



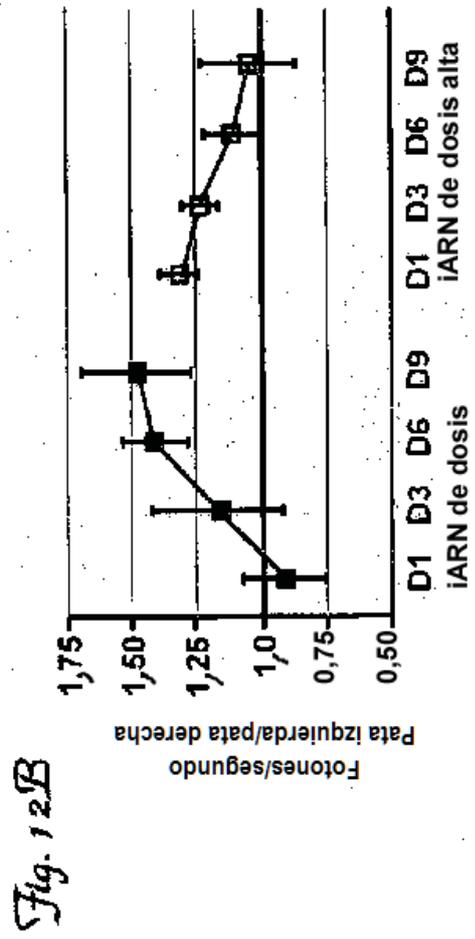
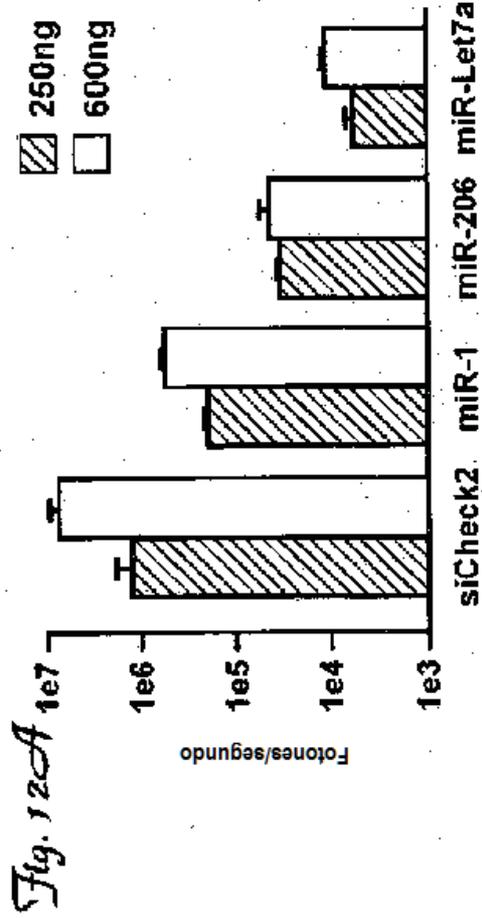


Fig. 13B

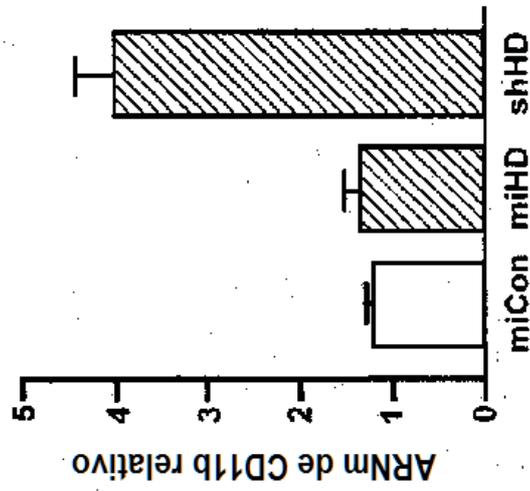


Fig. 13A

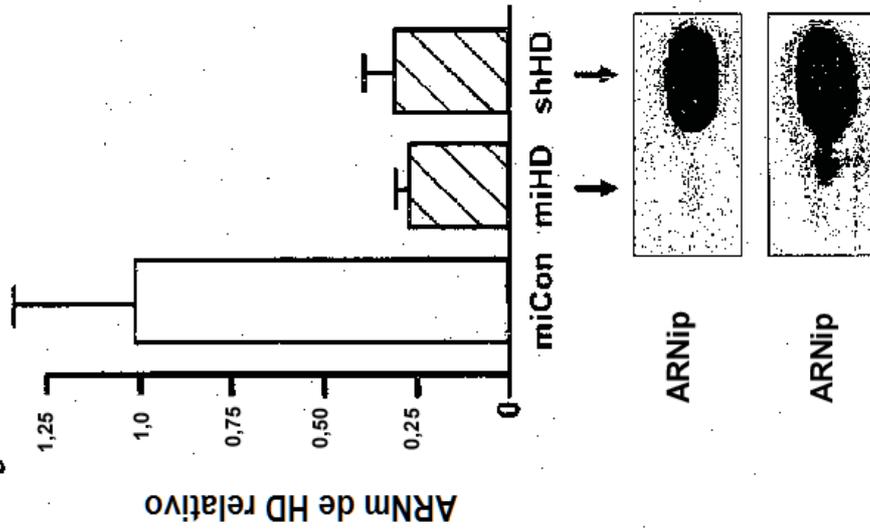


Fig. 14

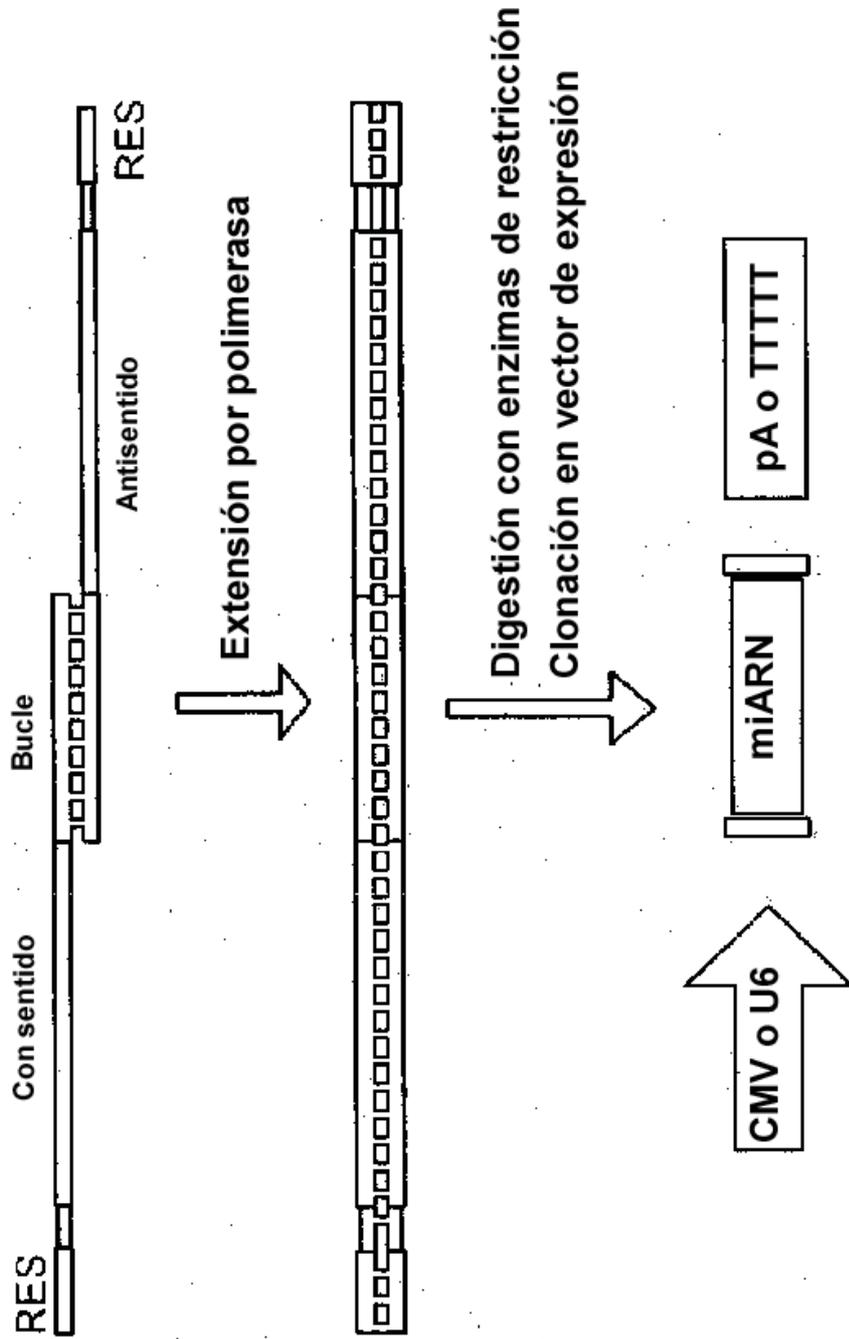
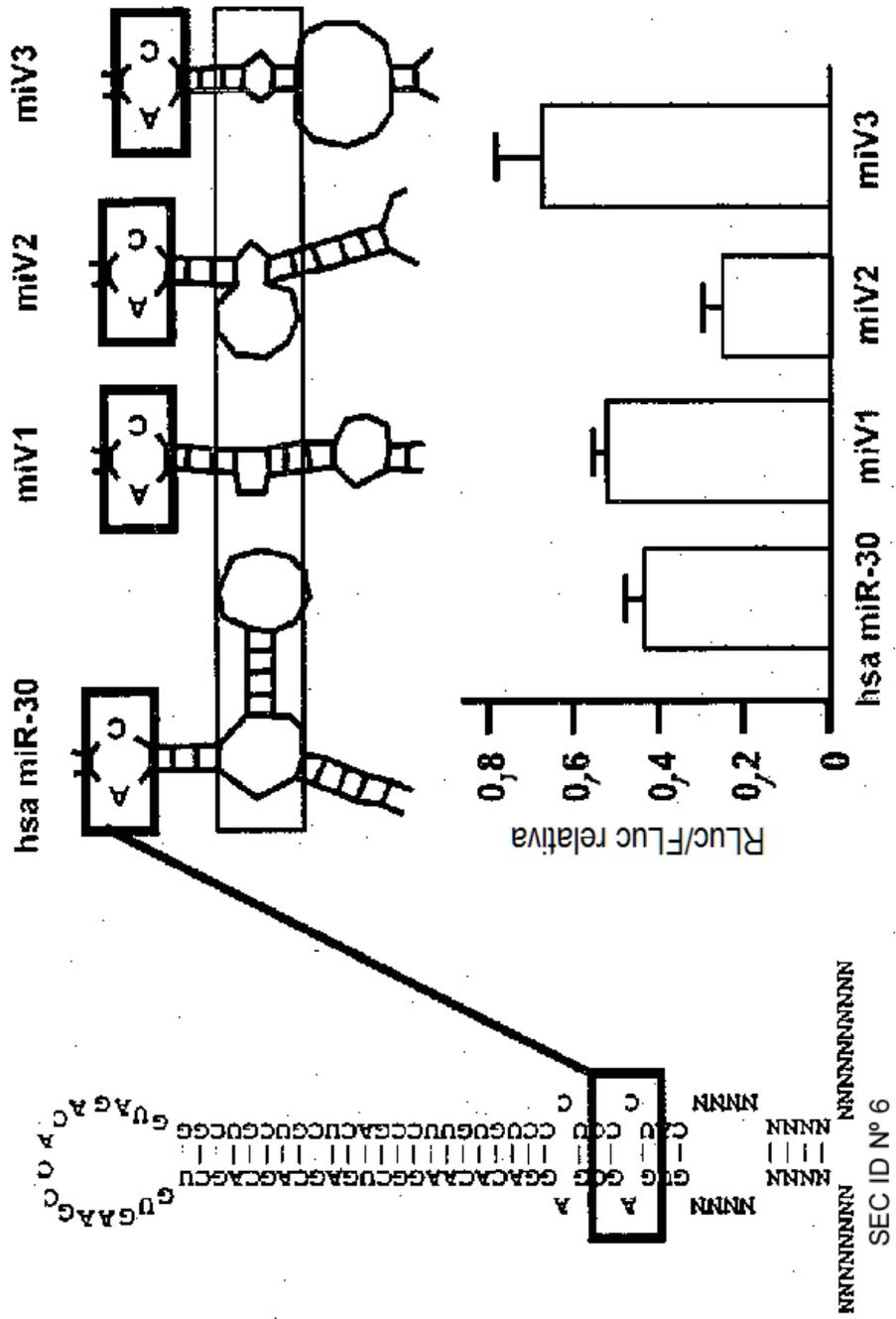


Fig. 15



<p>Promotor U6</p>	<p>+1 ...CCCTTGGAGAAACCCCTTGTTC</p>	<p>SEC ID N° 7</p>
<p>Secuencia flanqueante de miARN</p>		
<p>Variante 1</p>	<p>U6+1 ...GCGTTTACTGAAACCGGTCAGATGGTACCGGTTTAAA-CTCGAG-miRNA-CTCGAG-miRNA-ACTAGT-TCATAGAGCGGGCCGCCAGGGGGAGATCCAGACACA...</p>	<p>XhoI SpeI SEC ID N° 8 SEC ID N° 223</p>
<p>Variante 2</p>	<p>U6+1 ...GCGTTTACTGAAACCGGTCAGATGGTACCGGTTTAAA-CTCGAG-miRNA-CTCGAG-miRNA-ACTAGA-GCGGCCGCCACAGGGGGAGATCCAGACATGATGA...</p>	<p>XhoI SpeI/XbaI SEC ID N° 9 SEC ID N° 224</p>
<p>Variante 3</p>	<p>U6+1 ...GCGTTTACTGAAACCGGTCAGATGGTACCGGTTTAAA-CTCGAG-miRNA-CTCGAG-miRNA-ACATAATCAGCCCATACCACATTTCATAGAGGTTTAA...</p>	<p>XhoI SpeI/XbaI SEC ID N° 10 SEC ID N° 225</p>

Fig. 16-1A

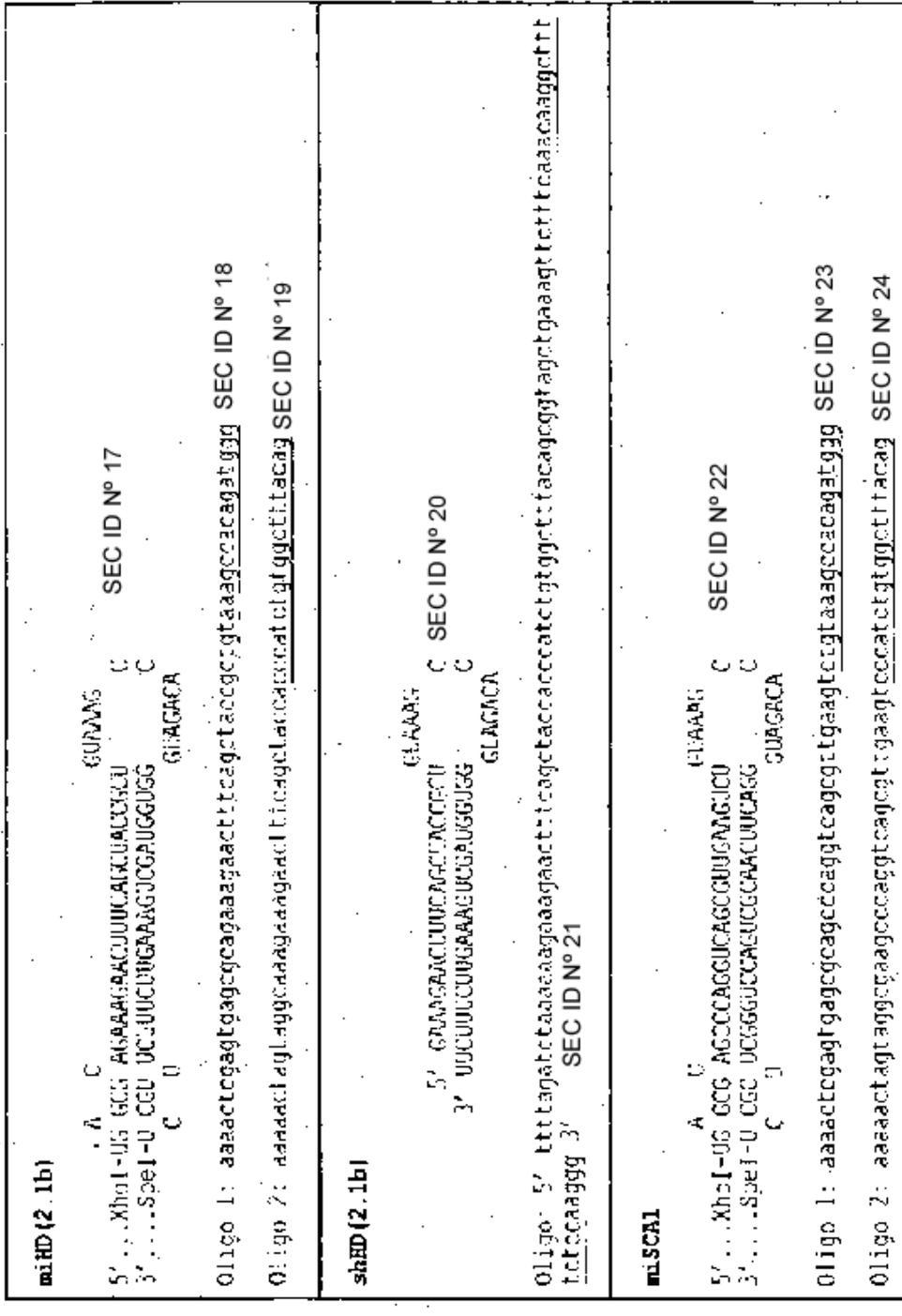


Fig. 16-20A

Fig. 16-2B

<p>shSCAL</p> <p>5' CCCAGGUCAGCGUUGAAGUCU C GUUAG SEC ID N° 25 3' UUCGGUUCAGUCCACUUCAGG C GUAGACA</p> <p>Oligo: ttttagatctaaataaaggcccaggctcacccttcaacatctctgtggctttacagacttcaacgctgaact <u>ggcaacaaagggtttctctcttggg</u> SEC ID N° 26</p>	<p>sh1913</p> <p>A C 5' ...XhoI-US GCG ACCCCAGGUCGGGUCGUAACUCU C GUUAG SEC ID N° 27 3' ...SpeI-U CGC UCCGGUUCAGUCCACUUCAGG C C U GUAGACA</p> <p>Oligo 1: aaaactcaggtgagggcagcccaggctcagcgttgaagctctatataaggacagatng SEC ID N° 28</p> <p>Oligo 2: aaaactagtagctaaagcccaggctcagcgttgaagct</p> <p>SEC ID N° 29</p>	<p>sh1913</p> <p>GUUAG SEC ID N° 30 5' GCCCAGGUCAGCGUUGAAGUCU C 3' UUCGGUUCAGUCCACUUCAGG C GUAGACA</p> <p>Oligo: 5' ttttagatctaaataaaggcccaggctcacccttcaacatctctgtggctttacagacttcaacgctgaact <u>ggcaacaaagggtttctctcttggg</u> SEC ID N° 31</p>
---	--	--

Fig. 16-3A

<p>miRFP</p> <p>A: C</p> <p>5' ...XhoI-UG GCG AGCACAACCGGAGUACAALUCU GUANNG SEC ID N° 32</p> <p>3'SpeI-U CCC UCCUUBUCGACCUCARUINIGAGG C</p> <p>C: U GUAGACA</p> <p>Oliqo 1: <u>aaaacctcagtgtagcagcacaagctgagatcaattctctgLaagggcacaagatggg</u> SEC ID N° 33</p> <p>Oliqo 2: <u>aaaacctcagtgtagcagcacaagctgagatcaattctctgLaagggcacaagatggg</u> SEC ID N° 34</p>	<p>shcFP</p> <p>GUANNG</p> <p>5' GCACACGCCGGGSUACAAUUCU C SEC ID N° 35</p> <p>3' UUCUGLUCGACACGACUAGUIGAGG C</p> <p>GUAGACA</p> <p>Oliqo: 5' <u>Utttagatctaaagaaagcccaacctggagtagcaacaccatctctgtagctttcacagaattctactccagcttctgcaadcaaggtccttctcccaaggg</u> 3' SEC ID N° 36</p>	<p>Variante mi1913-miR30</p> <p>A: C</p> <p>5' ...XhoI-UA AUUGUCUUGA---c-----AGUG GCG AGCACAACCGGAGUACAALUCU GUANNG SEC ID N° 37</p> <p>3'SpeI-U UAACGAGGAU UUCAU C U</p> <p>C: U CUGUINIGACUACUAGUINIGAGG C</p> <p>GUAGACA</p> <p>C-G</p> <p>G-C</p> <p>G-C</p> <p>G-C</p> <p>G-C</p> <p>A G</p> <p>A G</p> <p>C A</p> <p>U U C</p>
--	---	---

Oligo 1: aaaactcgagtagatattgctctttgacacagtaggggagggccagggtcagggcttggaggtctggtabuyccacacagatggg SEC ID N° 38
 Oligo 2: aaaactcagtaattgctctctcctcaaaatgagcccttgaatctgggggagtaggggaaagcccaaggtcagggcttggaggtcccccattctgg
ctttacag SEC ID N° 39

Oligos indicadores de luciferasa de iARN sicheck2™

Renilla directo: aagcctcagcagctgctccag SEC ID N° 40

Cebadores inversos de diana de iARN a continuación

SCA1 -Con sentido (pretendido): ttttctctcgagtcacaacttcaaaagctcaaaagctgacccaggcggcagtcgcccctagattactgctctcg SEC ID N° 41

SCA1 -AS (No pretendido): UUUctctcagcccaaggtccaggttgaagUUUctcggcctccctcagaattactgctctcg SEC ID N° 42

HD2.1 - Con sentido (pretendido): ttttctctcgagttcttctgtaqctcaaaqttctttctttggatcccctagaaattactgctctcg SEC ID N° 43

HD2.1 -AS (No pretendido) ttttctctcgagtagagagaacttctcagctaccaaagagcagcagccctcagaaattactgctctcg SEC ID N° 44

FD -Con sentido (pretendido): ttttctctcgagacacaalgaattcaaccgggtctttgggatccctcagaattactgctctcg SEC ID N° 45

FD -AS (No pretendido): ttttctctcgatccacctgtgaattcaattctctctgggatcccctcagaattactgctctcg SEC ID N° 46

Oligos indicadores de luciferasa de iARN sicheck2™, continuación

GrP -Con sentido (pretendido): ttttctctcgagtagttgtagcccaagcttggcggcaatcgcaatcgaaattactgctctcg SEC ID N° 47

GrP -AS (No ttttctctcgagggtagcaagctggagttccactactgagttcggcttagaaattactgctctcg SEC ID N° 48

Fig. 16-3B

miHD2.4
 A C GUAAG
 5' ...XhoI-UG GCG GACCGUGICAAACAUUGUUUACC C
 3' ...SpeI-U CCC CUGGCACACUAGUACAGCAUGG C
 C A GUAGACA

SEC ID N° 49

miHD2.4.2
 A C GUAAG
 5' ...XhoI-UG GCG ACCGUGUGEAUAUCAUUGUCUUMCU C
 3' ...SpeI-U CCG UGGCACACUAGUACAGCAUGG C
 C A GUAGACA

SEC ID N° 50

miHD8.2
 A C GUAAG
 5' ...XhoI-UG GCG AGCAGCUGUCCAGGUUUUAGCU C
 3' ...SpeI-U CCC UCGUGCAACAGGUCCAAAUUUGG C
 C A GUAGACA

SEC ID N° 51

miHD8.2.2
 A C GUAAG
 5' ...XhoI-UG GCG AGACCAGCUGUCCAGGUUUUACU C
 3' ...SpeI-U CXC UCUUCUCUCCNACAGGUCCAAUUGG C
 C A GUAGACA

SEC ID N° 52

Fig. 16-4A

miHD8.2.3.

5' ... XhoI-UG GCG AGAGCAGCUGUCUCCAGGUUUACU GUAAAG SEC ID N° 53
 3' ... SpeI-U CGC UCUUGUGGAAACAGGUCCTAAATGG C
 C C GUAGACA

miSCA1-2225

5' ... XhoI-UG GCG GCGAAGCUGAAGUUUCCAGAACU GUAAAG SEC ID N° 54
 3' ... SpeI-U CGC CCGGUCGACUUCACAAAGGUCUUGG C
 C A GUAGACA

miSCA1-1399

5' ... XhoI-UG GCG CGGCCAGCAGCAGCAAUCAUCC GUAAAG SEC ID N° 55
 3' ... SpeI-U CGC GCCGGUCGUCGUUCGUUAGUGGG C
 C A GUAGACA

shHD2.1

Sitio diana de ARNm:

5' AAC AAA GAA CTT TCA GCT ACC 3' SEC ID N° 56

Fig. 16-4B

Horquilla 2.1

Hebra con sentido	Bucle de Hind III	Hebra antisentido	SEC ID N° 57
5' AAG AAA GAA CTT TCA GCT ACC (GAAGCTTG) GGT AGC TGA AAG TTC TTT CTT 3'			
Hebra con sentido	Bucle de Hind III	Hebra antisentido	SEC ID N° 58
5' G AAG AAA GAA CTT TCA GCT ACC (GAAGCTTG) GGT AGC TGA AAG TCC CTT CTT 3'			
Hebra con sentido	Bucle de microARN	Hebra antisentido	SEC ID N° 59
5' AAG AAA GAA CTT TCA GCT ACC (CTTCTCTGTC) GGT AGC TGA AAG TTC TTT CTT 3'			
Hebra con sentido	Bucle de microARN	Hebra antisentido	SEC ID N° 60
5' G AAG AAA GAA CTT TCA GCT ACC (CTTCTCTGTC) GGT AGC TGA AAG TTC TTT CTT 3'			
Hebra con sentido	Bucle de microARN	Hebra antisentido	SEC ID N° 61
5' AAG AAA GAA CTT TCA GCT ATT A (CTTCTCTGTC) T GGT AGC TGA AAG TTC TTT CTT 3'			
Hebra con sentido	Bucle de microARN	Hebra antisentido	SEC ID N° 62
5' G AAG AAA GAA CTT TCA GCT ATT A (CTTCTCTGTC) T GGT AGC TGA AAG TTC TTT CTT 3'			
Hebra con sentido	Bucle de Hind III	Hebra antisentido	SEC ID N° 63
5' AAG AAA GAA CTT TCA GCT ATT A (GAAGCTTG) T GGT AGC TGA AAG TTC TTT CTT 3'			
Hebra con sentido	Bucle de Hind III	Hebra antisentido	SEC ID N° 64
5' G AAG AAA GAA CTT TCA GCT ATT A (GAAGCTTG) T GGT AGC TGA AAG TTC TTT CTT 3'			

Fig. 16-5A

shHD2.4
 5' GAC CGT GTG AAT CAT IGT CTA 3' SEC ID N°: 65

shHD2HD2.4 hairpin
 Hebra con sentido Bucle de microARN Hebra antisentido
 5' GAC CGT GTG AAT CAT TGT CTA (CTTCCTGTCA) TAG ACA ATG ATT CAC ACC GTC 3' SEC ID N°: 66

shHD8.2
 Sitio diana de ARNm:
 5' CAG CTT GTC CAG CTT TAT GAA 3' SEC ID N°: 67

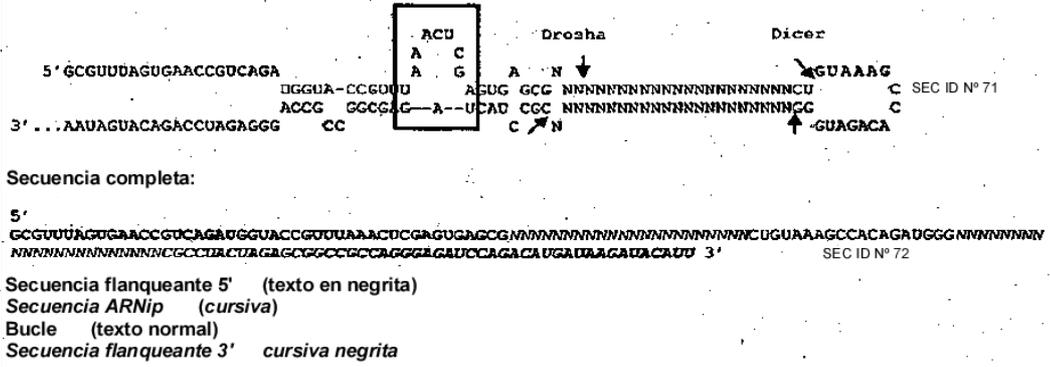
Hebra con sentido Bucle de microARN Hebra antisentido
 5' CAG CTT GTC CAG GTT TAT GAA (CTTCCTGTCA) TTC ATA AAC CTG GAC AAG CTG 3' SEC ID N°: 68

shHD3U.1
 Sitio diana de ARNm:
 5' GCA TAC CTG AAA TCC TGC TTT 3' SEC ID N°: 69

Hebra con sentido Bucle de microARN Hebra antisentido
 5' GGA TAC CTG AAA TCC TGC TTT (CTTCCTGTCA) AAA GCA GGA TTT CAG GTA TCC 3' SEC ID N°: 70

Fig. 16-5B

Figura 17



SEC ID N° 74
miARN artificial

Fig. 18A
SEC ID N° 73
ARNhc 1^a gen.

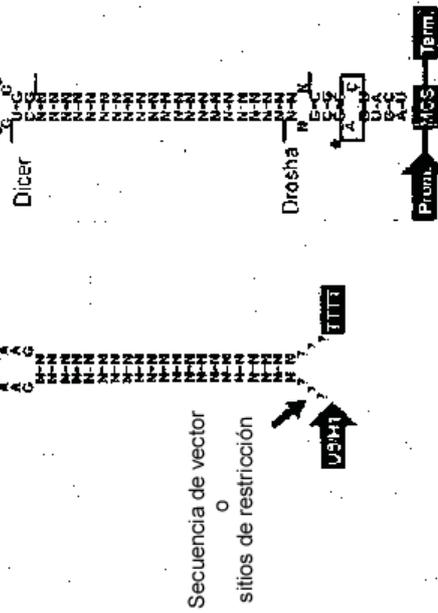


Fig. 18B

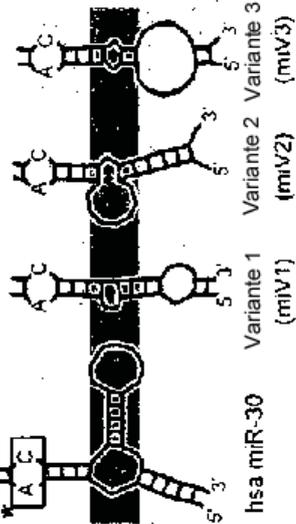


Fig. 18C

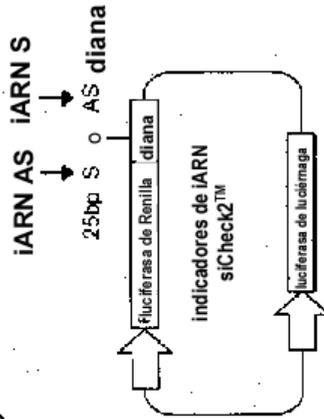


Fig. 18D

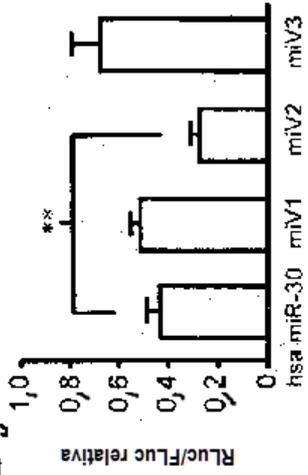


Fig. 18E



Fig. 19

miHD2.4
 A C G UAAAAG
 5'...XhoI-UG GCG GACCGUGUGAAUCAUUGUUACU C
 3'...SpeI-U CGC CUGGCACACUAGUAACAGAUGG C
 C A GUAGACA

SEC ID N° 75

miHD2.4.2
 A C G UAAAAG
 5'...XhoI-UG GCG ACCGUGUGAAUCAUUGUCUAACU C
 3'...SpeI-U CGC UGGCACACUAGUAACAGAUGG C
 C A GUAGACA

SEC ID N° 76

miHD8.2
 A C G UAAAAG
 5'...XhoI-UG GCG AGCAGCUUGUCCAGGUUUUGCU C
 3'...SpeI-U CGC UCGUCGAACAGGUCCAAAUGG C
 C A GUAGACA

SEC ID N° 77

miHD8.2.2
 A C G UAAAAG
 5'...XhoI-UG GCG AGAGCAGCUUGUCCAGGUUUACU C
 3'...SpeI-U CGC UCUCGUCGAACAGGUCCAAAUGG C
 C A GUAGACA

SEC ID N° 78

miHD8.2.3
 A A G UAAAAG
 5'...XhoI-UG GCG AGAGCAGCUUGUCCAGGUUUACU C
 3'...SpeI-U CGC UCUCGUCGAACAGGUCCAAAUGG C
 C C GUAGACA

SEC ID N° 79

miSCA1-2225
 A C G UAAAAG
 5'...XhoI-UG GCG GGCGAACUGAAGUUCCAGAACU C
 3'...SpeI-U CGC CGGCUUGACUCAAAGGUUUUGG C
 C A GUAGACA

SEC ID N° 80

miSCA1-1399
 A C G UAAAAG
 5'...XhoI-UG GCG CGGCCAGCAGCAAGCAAUCAUCC C
 3'...SpeI-U CGC GCCGGUCGUCGUUCGUUAGUGGG C
 C A GUAGACA

SEC ID N° 81

Fig. 20A



Fig. 20B

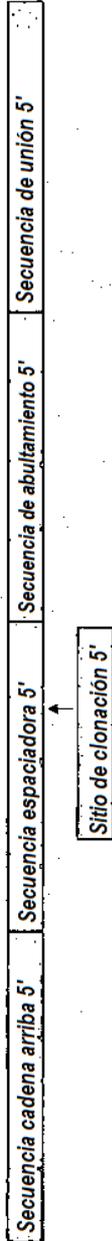


Fig. 20C



Fig. 20D

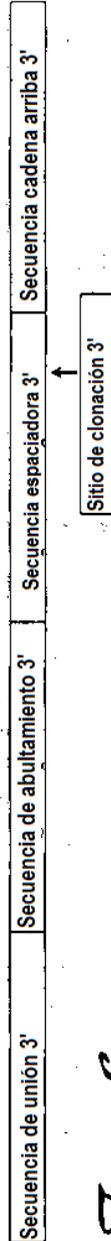


Fig. 20E

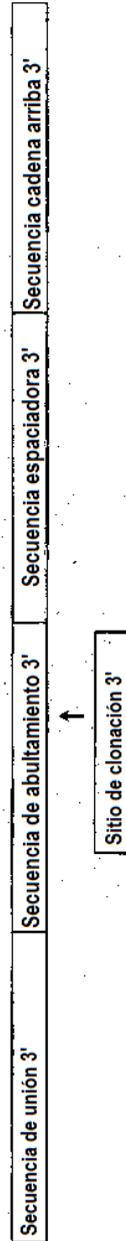


Fig. 205

<p>Flancos 5' y 3' cada uno de 5-5000 nt</p> <p>5'-...NNNNN</p> <p>3'-...NNNNN</p>	<p>Abultamiento 2-15 pb (0-50%)</p> <p>NNNNNNNNNN</p> <p>NNNNNNNNNN</p>	<p>Espaciador 9-12 pb (60-100%)</p> <p>NNNNN NNNN N N</p> <p>NNNNN NNNN N N</p> <p>NNNNN NNNN N N</p>	<p>Región de ARNip (S y A) 20-30 pb (70-100%)</p> <p>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN</p> <p>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN</p> <p>NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN</p>	<p>Bucle 4-20 pb (0-50%)</p> <p>NNNNN N N N N N</p> <p>NNNNN N N N N N</p> <p>NNNNN N N N N N</p>
--	---	---	---	---

Fig. 21A

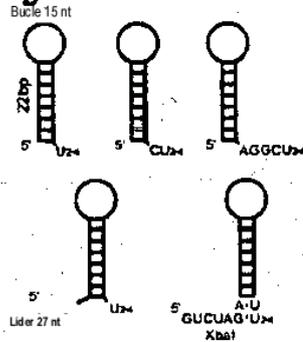


Fig. 21B

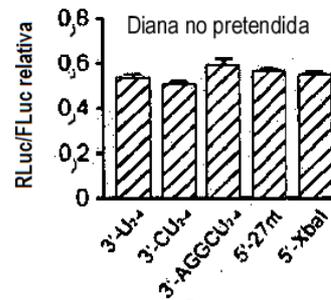
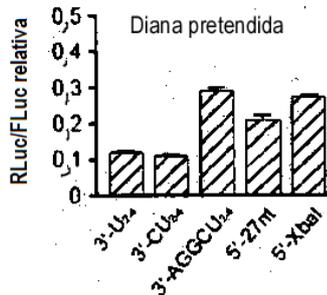
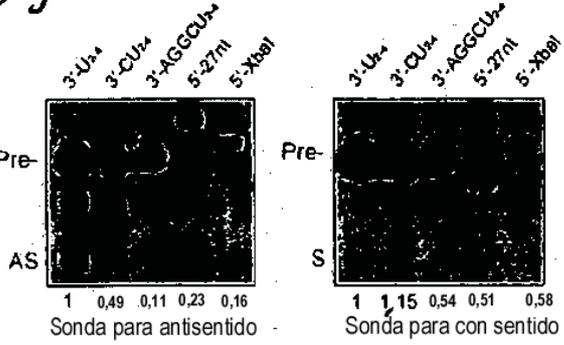


Fig. 21C

Fig. 21D

Fig. 22A

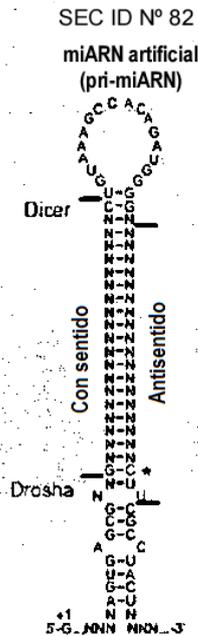
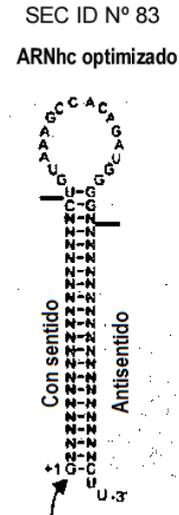


Fig. 22B



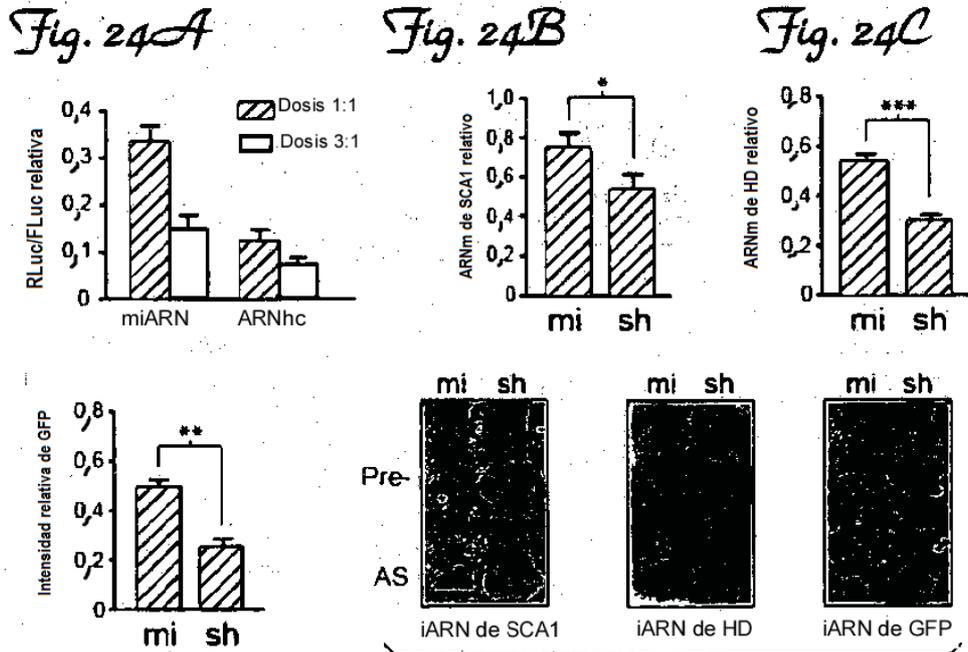
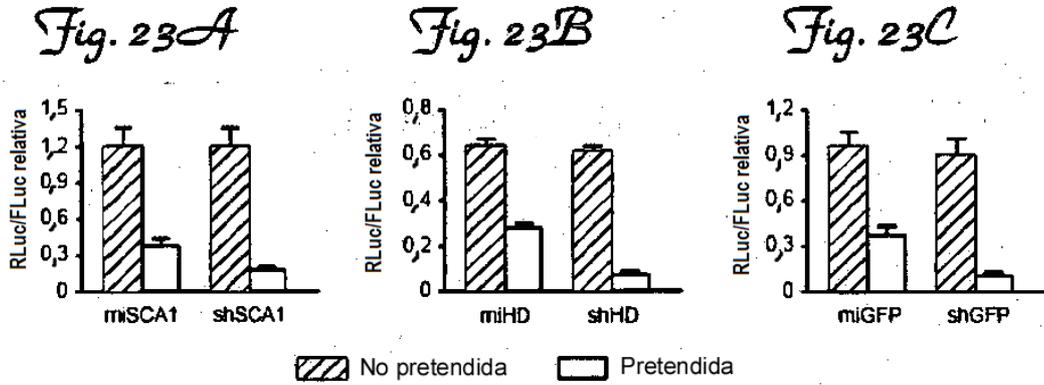


Fig. 24D

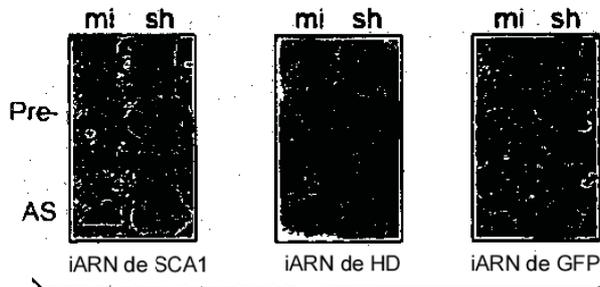
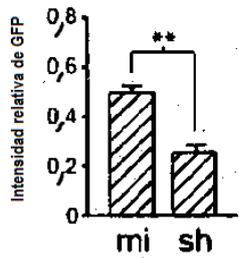


Fig. 24E

Fig. 25A

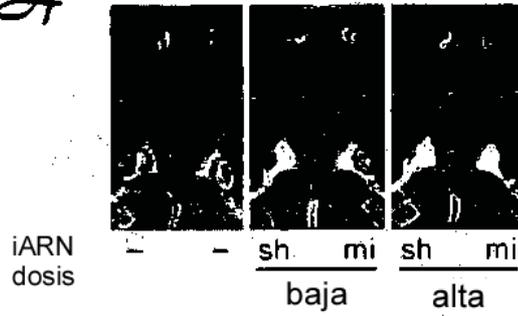


Fig. 25B

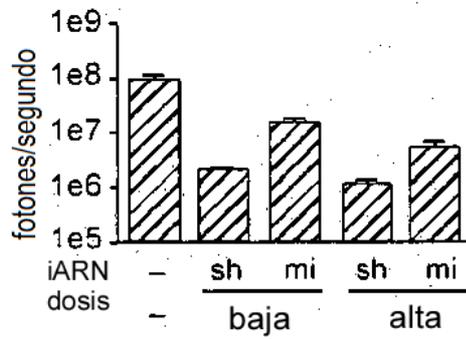


Fig. 26A

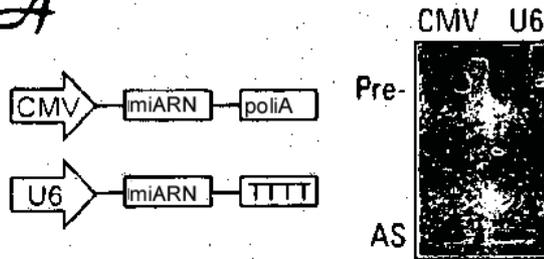


Fig. 26B

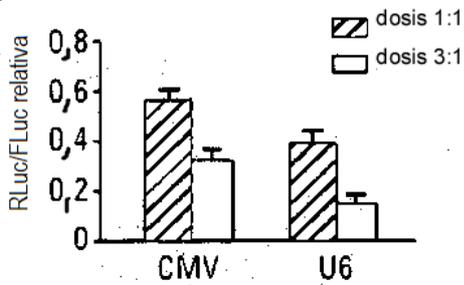
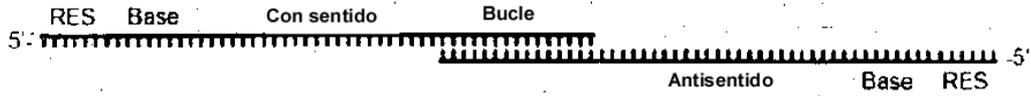


Fig. 27

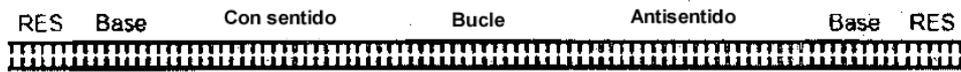
Possible shSCA1 AS	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGCUU-UU...	SEC ID N° 84
3' RACE Cebador AS	5' -ACUUCAACGCUGACCU	SEC ID N° 85
3' RACE Sec 1	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGC	SEC ID N° 86
3' RACE Sec 2	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGC	SEC ID N° 87
3' RACE Sec 3	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGC	SEC ID N° 88
3' RACE Sec 4	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGCU	SEC ID N° 89
3' RACE Sec 5	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGCU	SEC ID N° 90
shSCA1 AS 3' RACE Sec 6	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGCU	SEC ID N° 91
3' RACE Sec 7	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGCUU	SEC ID N° 92
3' RACE Sec 8	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGCUU	SEC ID N° 93
3' RACE Sec 9	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGCUU	SEC ID N° 94
3' RACE Sec 10	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGCUU	SEC ID N° 95
3' RACE Sec 11	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGCUU	SEC ID N° 96
3' RACE Sec 12	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGCUU	SEC ID N° 97
Possible miSCA1 AS	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGCUU-UG...	SEC ID N° 98
3' RACE Cebador AS	5' -ACUUCAACGCUGACCU	SEC ID N° 99
3' RACE Sec 1	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGC	SEC ID N° 100
3' RACE Sec 2	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGC	SEC ID N° 101
3' RACE Sec 3	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGC	SEC ID N° 102
3' RACE Sec 4	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGC	SEC ID N° 103
3' RACE Sec 5	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGCU	SEC ID N° 104
miSCA1 AS 3' RACE Sec 6	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGCU	SEC ID N° 105
3' RACE Sec 7	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGCUU	SEC ID N° 106
3' RACE Sec 8	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGCUU	SEC ID N° 107
3' RACE Sec 9	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGCUU	SEC ID N° 108
3' RACE Sec 10	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGCUU	SEC ID N° 109
3' RACE Sec 11	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGCUU	SEC ID N° 110
3' RACE Sec 12	5' -ACUUCAACGCUGACCUGGGCUU	SEC ID N° 111
Possible shCA1 S	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGUC-UG	SEC ID N° 112
3' RACE Cebador S	5' -CCAGGUCAGCGUUGA	SEC ID N° 113
3' RACE Sec 1	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGU	SEC ID N° 114
3' RACE Sec 2	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGU	SEC ID N° 115
shSCA1 S 3' RACE Sec 3	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGUC	SEC ID N° 116
3' RACE Sec 4	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGUC	SEC ID N° 117
3' RACE Sec 5	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGUC	SEC ID N° 118
3' RACE Sec 6	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGUC	SEC ID N° 119
3' RACE Sec 7	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGUC	SEC ID N° 120
3' RACE Sec 8	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGUC	SEC ID N° 121
3' RACE Sec 9	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGUCU	SEC ID N° 122
Possible miSCA1 AS	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGUC-UG	SEC ID N° 123
3' RACE Cebador S	5' -CCAGGUCAGCGUUGA	SEC ID N° 124
3' RACE Sec 1	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGU	SEC ID N° 125
3' RACE Sec 2	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGU	SEC ID N° 126
3' RACE Sec 3	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGU	SEC ID N° 127
miSCA1 S 3' RACE Sec 4	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGUC	SEC ID N° 128
3' RACE Sec 5	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGUC	SEC ID N° 129
3' RACE Sec 6	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGUC	SEC ID N° 130
3' RACE Sec 7	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGUC	SEC ID N° 131
3' RACE Sec 8	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGUC	SEC ID N° 132
3' RACE Sec 9	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGUC	SEC ID N° 133
3' RACE Sec 10	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGUC	SEC ID N° 134
3' RACE Sec 11	5' -GCCCAGGUCAGCGUUGAAGUCU	SEC ID N° 135

Fig. 28

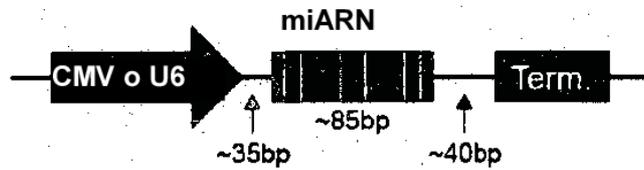
Etapa 1: hibridar oligos de ADN



Etapa 2: extensión con polimerasa



Etapa 3: Digestión de restricción y clonación en vector de expresión



Etapa 4: expresión de miARN

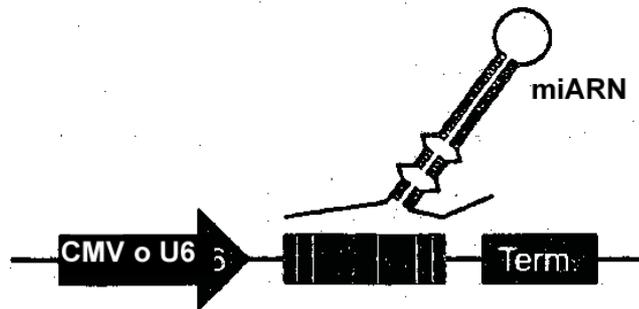


Fig. 29



Fig. 30A

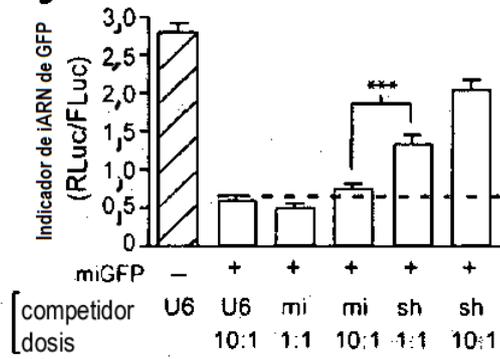


Fig. 30B

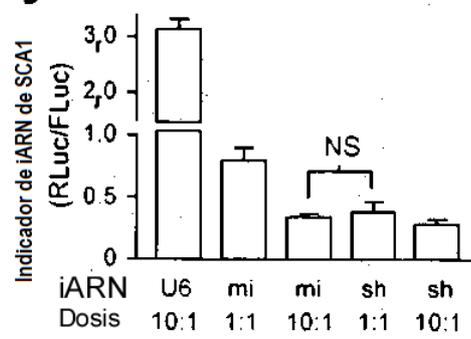


Fig. 30C

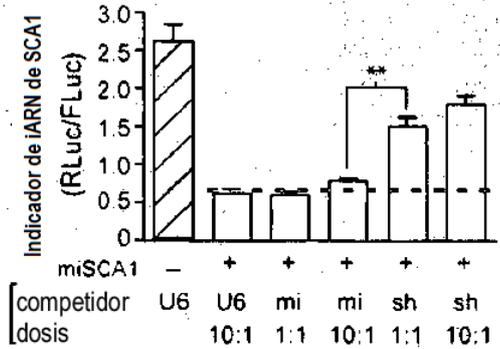


Fig. 30D

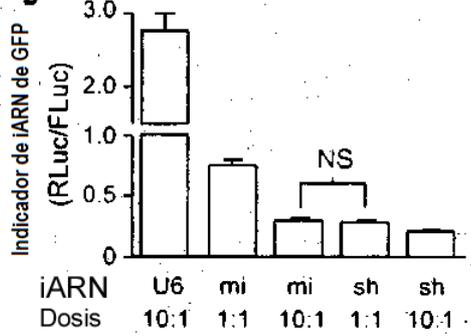


Fig. 30E

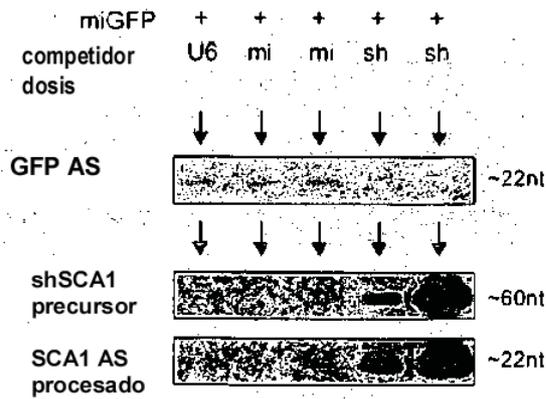


Fig. 31A

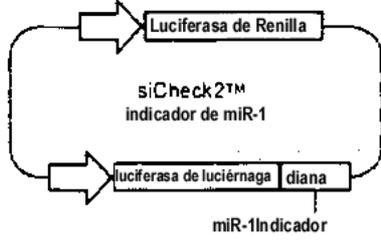


Fig. 31B

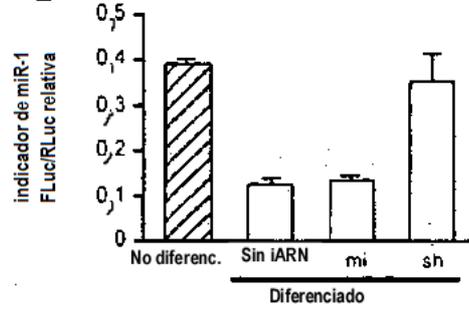


Fig. 31C

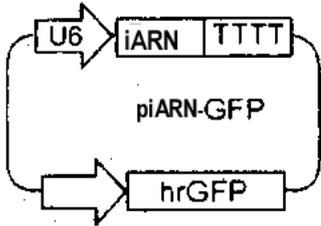


Fig. 31D

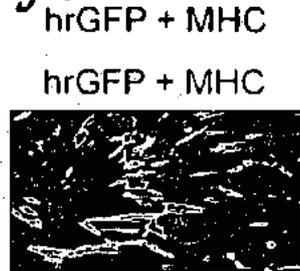


Fig. 31E

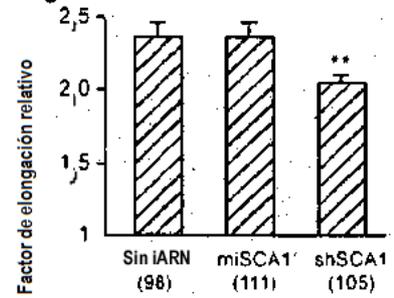


Fig. 32

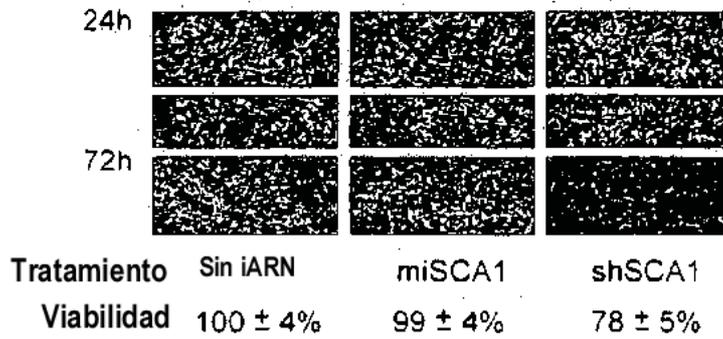


Fig. 33

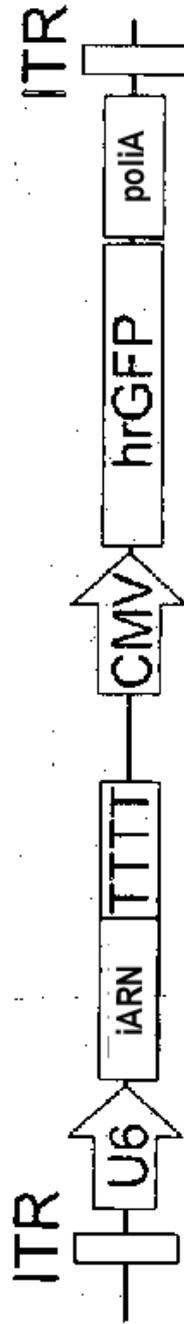


Fig. 34-1

ARNhc que abordan huntingtina humana y de ratón

ARNhc ^a	Secuencia
sh1.1	GCGAGUCGGCCCGAGGCCUCCUUCGUCAGCCGGGCUCCGGA SEC ID N° 140
sh1.4	AAAAGCUGAUGAAGGCCUUCGUUUUUUCGACUACUUCGGAA SEC ID N° 141
sh1.8	UGAGGAGCCGCUGCACCGACC UUAUCUCUCGGCGACGUGGCU SEC ID N° 142
sh1.9	GCCGCUGCACCGACCAAAGAAUUCCGGCAGCGUGGCUGGUUUC SEC ID N° 143
sh1.10	GCAGCAGCAGCAGCAACA GCCUUCGUUCGUCGUCGUUGUC SEC ID N° 144
sh1.11	AUGGCGACCCUGGAAAAGCUGUUUACCGCUGGGACC UUUUCG SEC ID N° 145
sh1.12	AAGCUGAUGAAGGCCUUCGAGUUUUCGACUACUUCGGGAGC SEC ID N° 146
sh1.13	GUCAGGUUCUGCUUUUAACUUUCGAGUCCAAGACGAAAUG SEC ID N° 147
sh2.1 ^b	AAGAAAGACUUUCAGCUACCUUUUCUUUCUUGAAAAGUCGAU SEC ID N° 148
sh2.2	AGAACUUUCAGCUACCAAGAAUUUCUUGAAAAGUCG AUGGUUC SEC ID N° 149
sh2.3	AAGAAAGACCGUGUGAAUCAUUUUUCUUUCUGGCACACUUAG SEC ID N° 150
sh2.4	<i>GACCGUGUGAAUCAUUGUCUAUU CAGGCACA CUUAGUAAACAG</i> SEC ID N° 151
sh2.5	GUCUGACAUAUGUGAAAACAUUUCAGACUGUUAUACACUUUU SEC ID N° 152
sh2.6	UGGCACAGUCUGUCAGAAUUUUUACCGUGUCAGACAGUCUUU SEC ID N° 153
sh3.1	GGGCAUCGCUAUGGAACUGUUUUCCCGUAGCGAUACCUUGAC SEC ID N° 154
sh3.2	AAUGCCUCACAAAGUUAUCAUUUUACGGAGUUGUUUCAUA SEC ID N° 155
sh4.1	AGCUUUGAUGGAUUCUAAUCUUUCGAAACUACCUAAGAUUA SEC ID N° 156
sh8.2	<i>CAGCUUGUCCAGGUUUAUGAAUUGUCGAACA GGUCCAAAUAAC</i> SEC ID N° 157

Fig. 34-2

ARNhc ^a	Secuencia
sh12.1	CCUGCCAUGGACCUGAAUGAUUUGGACGGUACCUGGACUUAC SEC ID N° 158
sh17.1	CAUCUUGAACUACAUCGAUCAUUGUAGAACUUGAUGUAGCUA SEC ID N° 159
sh17.2	AAUACAUCGAUCAUGGAGACUUUUGAUGUAGCUAGUACCUUC SEC ID N° 160
sh28.1	CAAACUGCAUGAUGUCCUGAAUUGUUUGACGUACUACAGGAC SEC ID N° 161
sh30.1	GGAUACCUGAAAUCCUGCUUUUUCCUAUGGACUUUAGGACGA SEC ID N° 162
sh32.1	CGUGCAGAUAAAGAAUGCUAUUUUGCACGUCUAUUUUUACGAU SEC ID N° 163
sh34.1	AAGUGGGCCAGUUCAGGGAAUUUUUACCCCGGUCAGUCCCU SEC ID N° 164
sh34.2	GUUCAGGGAAUCAGAGGCAUUUUCAAGUCCCUAGUCUCCGU SEC ID N° 165
sh35.1	CAUCAUGGCCAGUGGAAGGAAUUGUAGUACCGGUCACCUUCC SEC ID N° 166
sh37.1	CAGCAGUGCCACAAGGAGAAUUUGUCGUCACGGUGUCCUCU SEC ID N° 167
sh38.1	UGAAGCCCUUGGAGUGUUAAAUAUACUUCGGGAACCUCACAAU SEC ID N° 168
sh38.2	AGCCUUGGAGUGUUAAAUAUACUUCGGGAACCUCACAAUUA SEC ID N° 169
sh40.1	CUGGAAUGUCCGGAGAAUCAUUGACCUUACAAGGCCUCUUA SEC ID N° 170
sh42.1	UUCUCUUCUGUGAUUAUGUCUUUAAGAGAAGACAUAAUACA SEC ID N° 171
sh58.1	GACGAGGAAGAGGAGGAGGCCUUCUGUCUCCUUCUCCUCCUCC SEC ID N° 172
sh58.2	AAGAGGAGGAGGCCGACGCCUUUUUUCUCCUCCUCCGGCUGCG SEC ID N° 173
sh63.1	GUCCACCCCUCCAUCAUUUAUUUCAGGUGGGGGAGGUAGUAA SEC ID N° 174

Fig. 35A



Fig. 35B

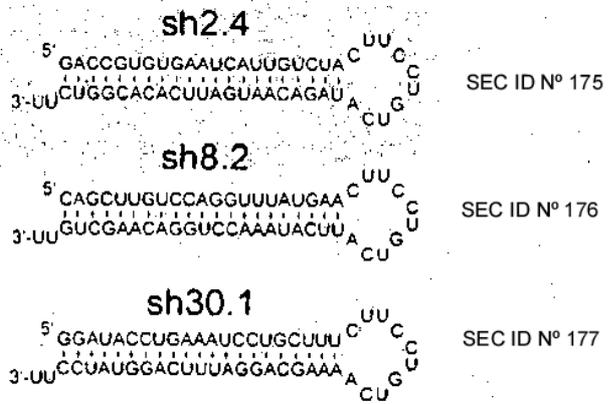


Fig. 35C

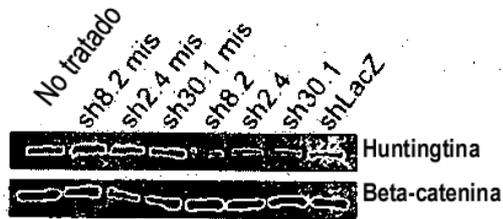


Fig. 36A

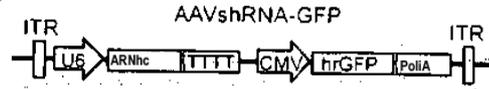


Fig. 36B



Fig. 36C

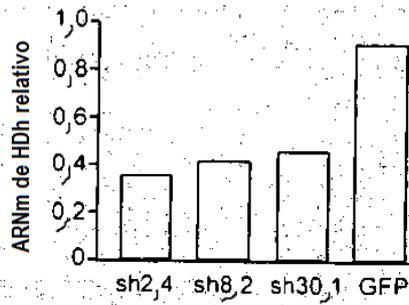


Fig. 36D

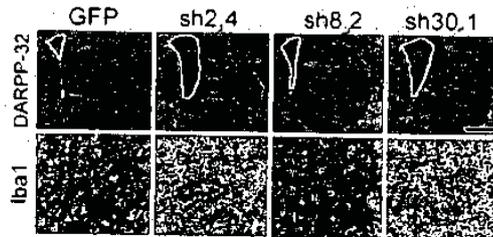


Fig. 37

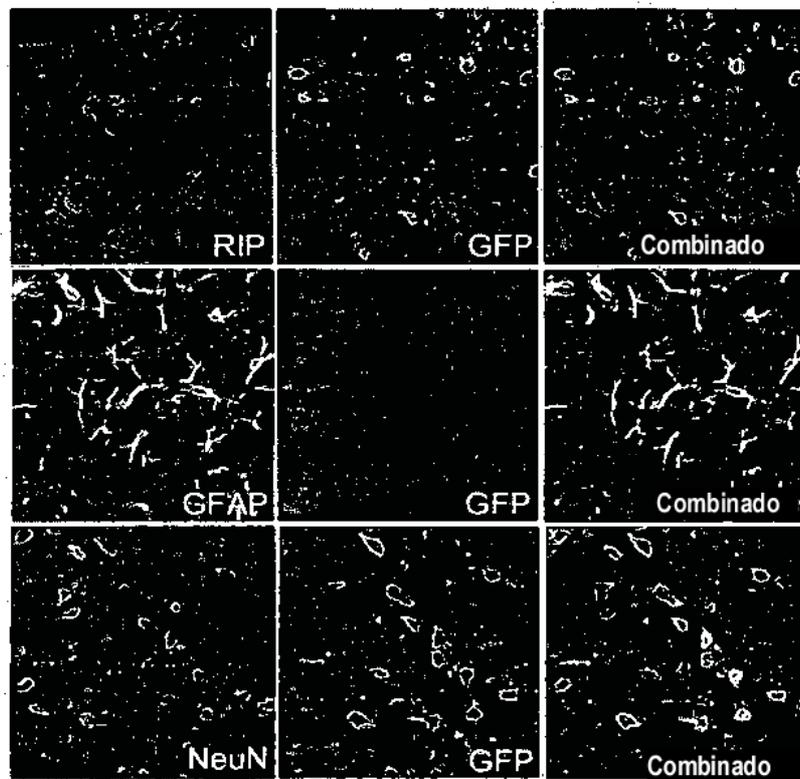


Fig. 38A

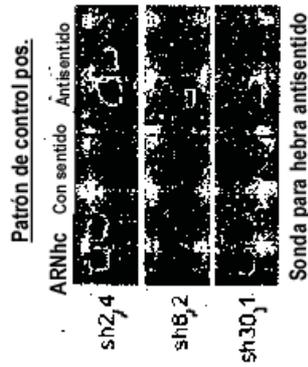


Fig. 38B

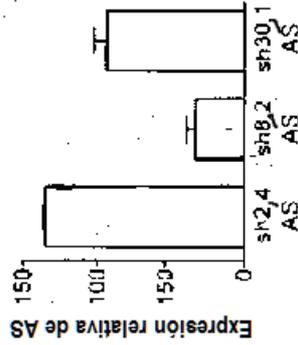


Fig. 40A

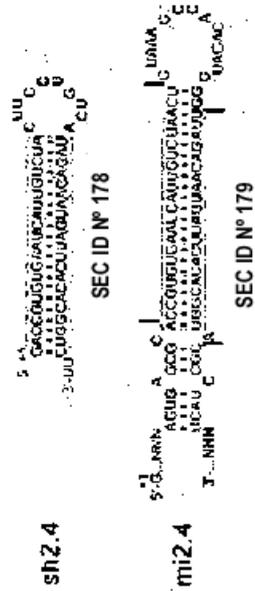


Fig. 40B



Fig. 40C

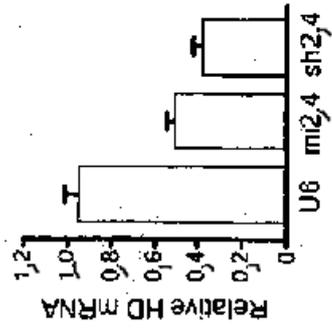


Fig. 39A

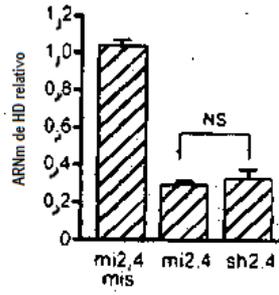


Fig. 39B

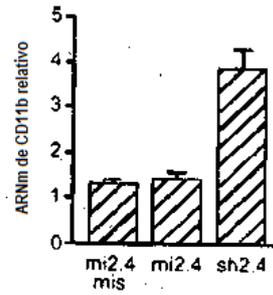


Fig. 39C



Fig. 39D

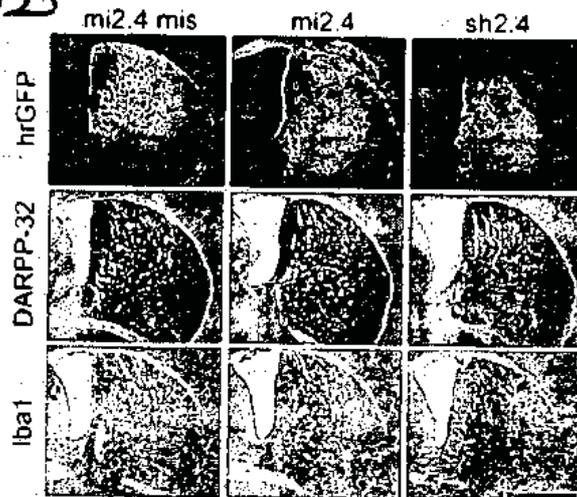
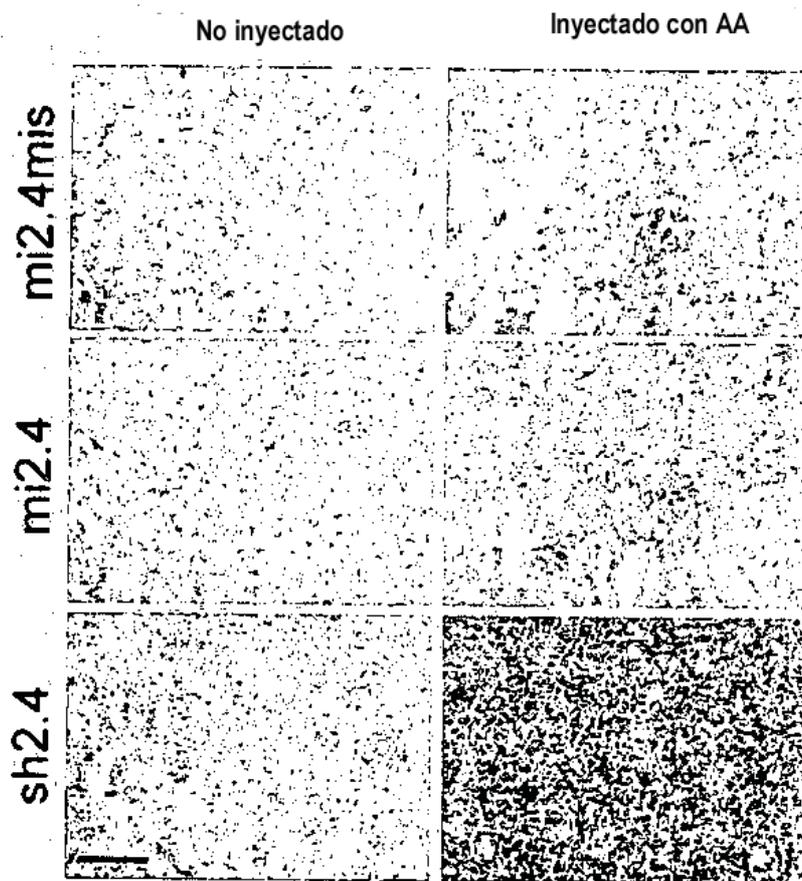


Fig. 41



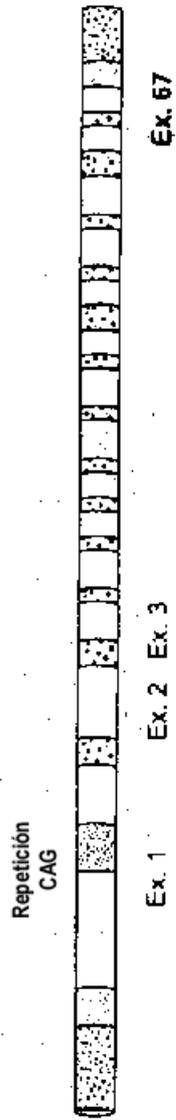


Fig. 42A

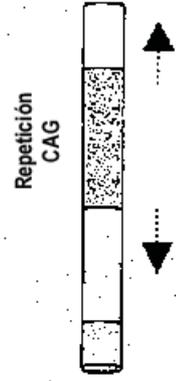


Fig. 42B

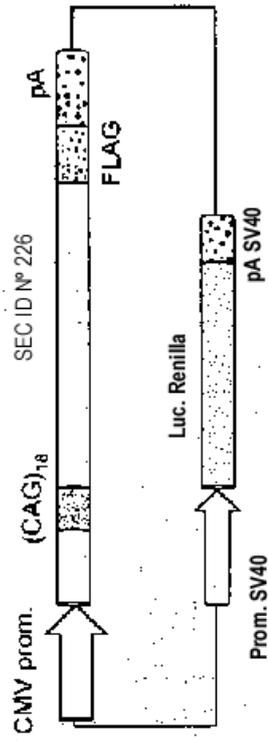


Fig. 43A

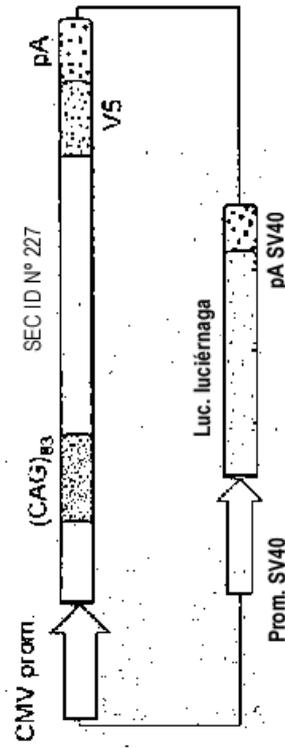


Fig. 43B

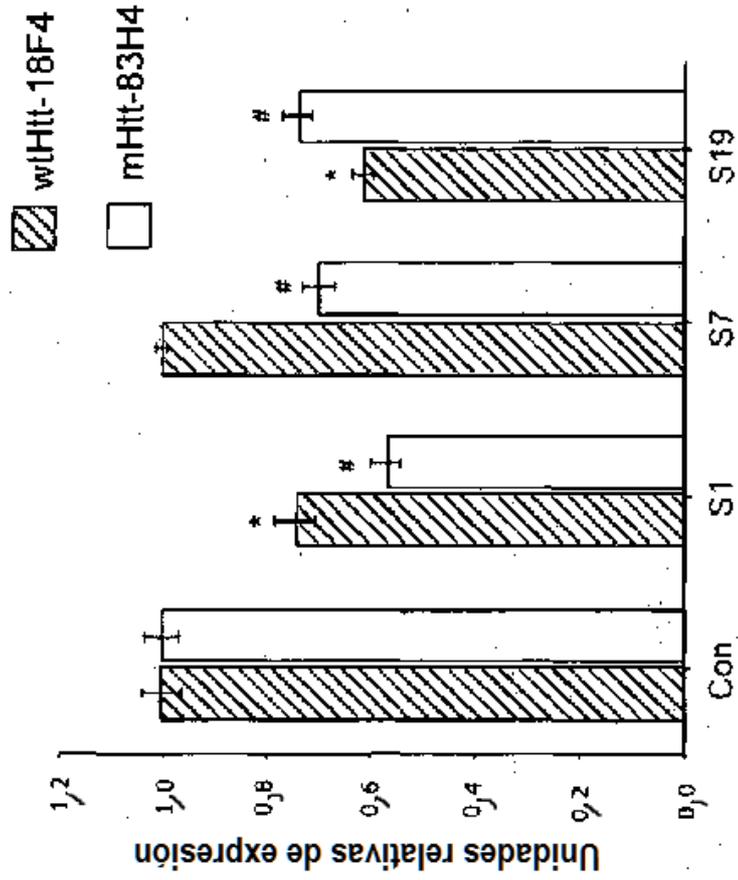


Fig. 44C

Fig. 44A

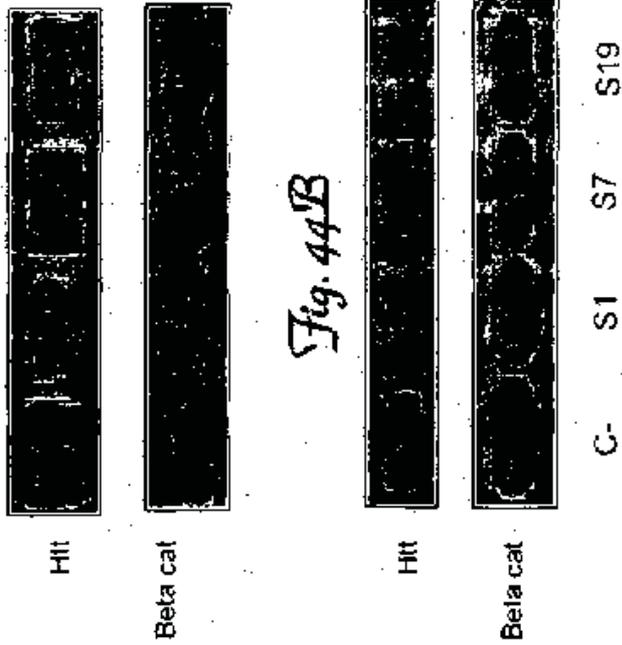


Fig. 44B

Fig. 45

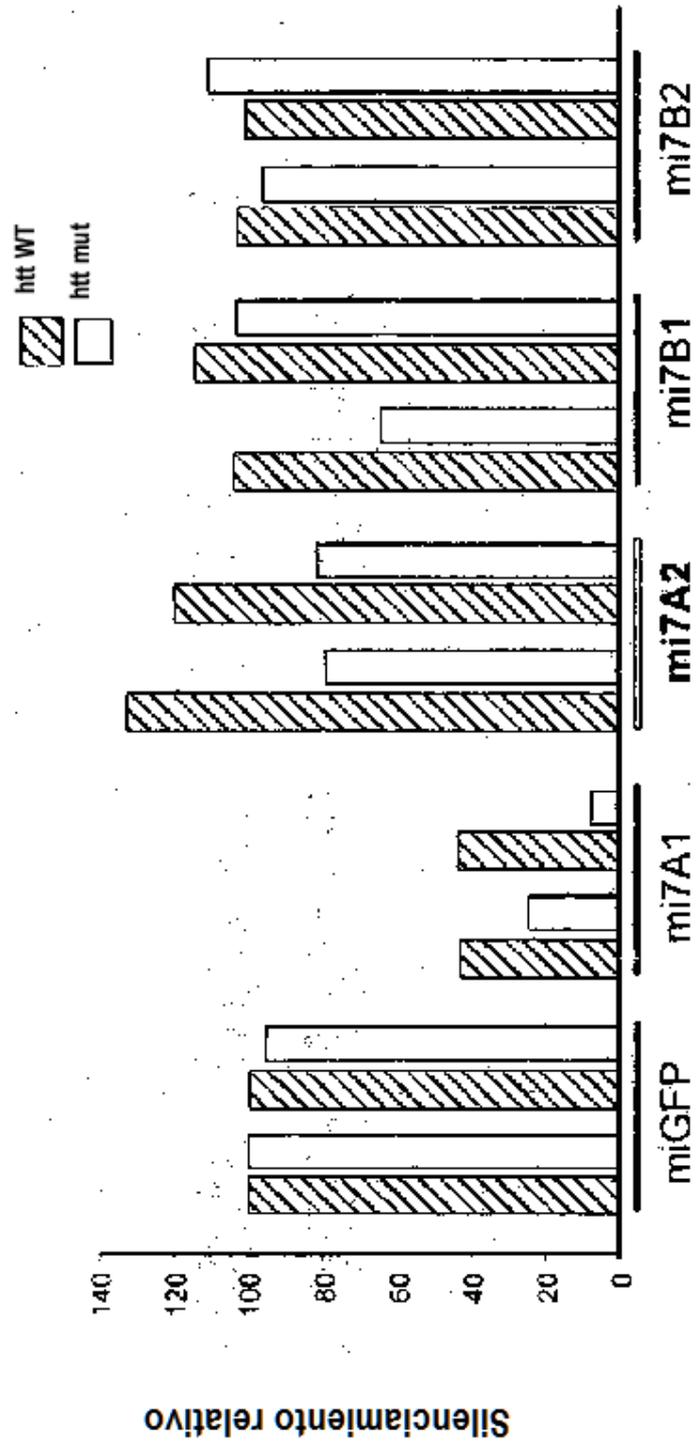


Fig. 46B



Fig. 46A

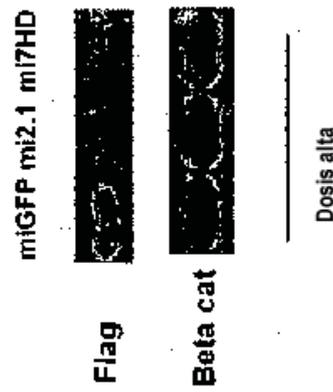


Fig. 47

