

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 014**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

A01K 67/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2002** **E 10183024 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016** **EP 2360251**

54 Título: **Producción in vivo de ARN de interferencia pequeños que median el silenciamiento génico**

30 Prioridad:

12.07.2001 US 305185 P

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

18.04.2017

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS (100.0%)
225 Franklin Street, 12th Floor
Boston, MA 02110, US

72 Inventor/es:

ZAMORE, PHILLIP D.;
HUTVANGER, GYORGY;
MCLACHLAN, JUANITA;
MELLO, CRAIG C. y
GRISHOK, ALLA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 609 014 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

Producción in vivo de ARN de interferencia pequeños que median el silenciamiento génico

Campo técnico

Esta invención se refiere a ácido ribonucleico de interferencia (ARNi), y más particularmente al ARNi in vivo

5 Antecedentes

El ARNi es el silenciamiento post-transcripcional específico de secuencia de la expresión de un gen por ARN bicatenario. El ARNi está mediado por 21 a 25 nucleótidos, moléculas de ARN de doble cadena denominadas ARNs de interferencia pequeños (ARNsi) que se derivan por escisión enzimática de ARN de doble cadena largo en células. Los ARNs si también se pueden sintetizar químicamente o enzimáticamente fuera de las células y luego introducirse en las células (por ejemplo, mediante transfección) (véase, por ejemplo, Fire et al., 1998, "Potent and specific genetic interference by double-stranded ARN in *Caenorhabditis elegans*," *Nature*, 391: 806-11; Tuschl et al., 1999, "Targeted ARNm degradation by double-stranded ARN in vitro," *Genes Dev.*, 13:3191-7; Zamore et al., 2000, "ARNi : double-stranded ARN directs the ATP-dependent cleavage of ARNm at 21 to 23 nucleotide intervals," *Cell*, 101:25-33.; Elbashir et al., 2001, "Duplexes of 21-nucleotide ARN mediate ARN interference in mammalian cell culture," *Nature*, 411:494-498; y Elbashir et al., 2001, "ARN interference is mediated by 21- and 22-nucleotide ARNs," *Genes Dev.*, 15:188-200.

Los ARNs si de doble cadena median el silenciamiento de genes dirigiéndose a los ARN mensajeros de ruptura o escisión (ARNm) que contienen la secuencia de una cadena del ARNs i. El ARNs i introducido en las células de mamíferos por transfección media el silenciamiento de genes específicos de la secuencia, mientras que el ARN de doble cadena, largo, induce la secuencia de respuestas inespecíficas.

Pasquinelli et al., 2000, "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory ARN", *Nature*, 408: 86-89, revela que se detectan ARN let-7 en muestras de varias especies animales y que let7 temporal La regulación se conserva. Smith et al., 2000, "Total silencing by intron-spliced hairpin ARNs", *Nature*, 407: 319-320, divulga que las construcciones de genes que codifican ARN unido a intrón con una estructura en horquilla pueden inducir el silenciamiento génico post-transcripcional cuando se dirigen contra virus o genes endógenos. Groebe et al., 1998, "Characterization of ARN hairpin loop stability", *Nucleic Acids Research*, 16(24): 11725-11735, divulga las estabilidades térmicas de quince horquillas de ARN que comparten la misma secuencia de tallo y tienen bucles de homopolímero de A, C y U que varían en longitud de tres a nueve nucleótidos. El documento WO 01/12789 se refiere a ribozimas que escinden específicamente ARNm para la apolipoproteína B. El documento US 5808036 se refiere a oligonucleótidos de tallo-bucle que contienen un dominio de tallo de doble cadena de al menos aproximadamente 2 pares de bases y un dominio de bucle de cadena sencilla que incluye al menos un dominio de unión paralelo separado por al menos aproximadamente 3 nucleótidos de un dominio de unión anti-paralelo correspondiente. El documento WO 96/29097 se refiere a oligonucleótidos de tallo-bucle y circulares cada uno con al menos un dominio de unión de Watson-Crick y al menos un dominio de unión de Hoogsteen correspondiente separado entre sí por dominios enlazantes

Sumario

La invención se basa en el descubrimiento de nuevos precursores artificiales de ARN manipulados, que cuando se expresan en una célula, por ejemplo, in vivo, son procesados por la célula para producir ARNs i selectivos que silencian selectivamente los genes diana (dirigiéndose a ARNm específicos para la escisión) usando la propia ruta de ARNi de la célula. Mediante la introducción de moléculas de ácido nucleico que codifican estos precursores de ARN manipulados en células in vivo con secuencias reguladoras apropiadas (por ejemplo, un transgén en un vector tal como un plásmido), la expresión de los precursores de ARN manipulados puede controlarse selectivamente temporalmente y espacialmente, esto es, en momentos particulares y/o en particular tejidos, órganos o células.

La presente invención se define en y por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier objeto identificado en la solicitud como "invención", "realización", "aspecto", etc., que excede el alcance de la invención tal como se representa mediante las reivindicaciones, no forma parte de la invención reivindicada, sino que sólo sirve como información de fondo para comprender mejor la invención. En general, la invención presenta un procedimiento para fabricar un precursor de ARN manipulado, un método in vitro de inducción de ARNi y un precursor de ARN manipulado. Una molécula de ácido nucleico aislada puede incluir una secuencia reguladora operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico que codifica el precursor de ARN manipulado, en el que el precursor incluye: (i) una primera porción de tallo que comprende una secuencia de 18 a 40 nucleótidos que es complementaria a una secuencia de ARN mensajero (ARNm) de un gen diana; (ii) una segunda porción de tallo que comprende una secuencia de 18 a 40 nucleótidos que es suficientemente complementaria a la primera porción de tallo para hibridar con la primera porción de tallo para formar un tallo dúplex (por ejemplo, un tallo que puede ser procesado por la enzima Dicer); y (iii) una porción de bucle de al menos 4 nucleótidos que conecta las dos porciones de tallo. En otro aspecto, la invención presenta el propio ARN manipulado. El precursor de ARN se dirige a una porción del ARNm del gen diana, interrumpe la traducción del ARNm mediante la escisión del ARNm, y de este modo impide la inhibición de la

expresión de la proteína. Los genes diana pueden ser, por ejemplo, genes humanos, por ejemplo, genes humanos mutantes, por ejemplo, que tienen una mutación puntual, o pueden ser genes virales u otros.

En estas moléculas y precursores, la primera porción de tallo puede ser totalmente complementaria (es decir, completamente complementaria) a la secuencia de ARNm. En otras realizaciones, la porción de tallo puede ser complementaria, es decir, la secuencia puede ser sustancialmente complementaria (por ejemplo, no puede haber más de uno o dos desajustes en un tramo de 20 nucleótidos). De manera similar, la segunda porción de tallo puede ser total o sustancialmente complementaria de la primera porción de tallo. La primera porción de tallo puede estar situada en un extremo 5' o 3' del precursor de ARN.

En estos precursores, la porción de bucle puede incluir al menos 4, 7, o 11, o más nucleótidos, y la secuencia del ARNm puede estar localizada desde 100 a 300 nucleótidos 3' del comienzo de la traducción del ARNm. La secuencia del ARNm puede estar localizada en una región 5' no traducida (UTR) o en una UTR 3' del ARNm. La primera y segunda porciones de tallo pueden incluir cada una aproximadamente 18 a aproximadamente 30 nucleótidos, por ejemplo de aproximadamente 22 a aproximadamente 28 nucleótidos. La primera y segunda porciones de tallo pueden tener cada una el mismo número de nucleótidos, o una de las porciones de primer y segundo tallo puede tener de 1 a 4 nucleótidos más que la otra porción de tallo. Estos nucleótidos sobresalientes pueden ser todos uracilos.

En estas moléculas de ácido nucleico, la secuencia reguladora puede ser un promotor Pol III o Pol II, y puede ser constitutiva o inducible. En realizaciones específicas, el precursor de ARN manipulado puede tener la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 8, o 9, y la molécula de ácido nucleico puede tener la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 10, 11, 17, 18, 20 o 21, o un complemento de las mismas.

La presente divulgación también presenta vectores, por ejemplo, plásmidos o vectores virales (por ejemplo, retrovíricos), que incluyen las nuevas moléculas de ácido nucleico. En otro aspecto, la divulgación incluye células huésped, por ejemplo, células de mamífero, que contienen las nuevas moléculas de ácido nucleico. La divulgación también incluye transgenes que incluyen las nuevas moléculas de ácido nucleico.

En otro aspecto, la divulgación presenta animales transgénicos no humanos, una o más de cuyas células incluyen un transgén que contiene una o más de las nuevas moléculas de ácido nucleico, en donde el transgén se expresa en una o más células del animal transgénico dando como resultado que el animal que exhibe ácido ribonucleico (ARNi) del gen diana por el precursor de ARN manipulado. Por ejemplo, el transgén puede expresarse selectivamente en una o más células cardíacas, linfocitos, células del hígado, células endoteliales vasculares o células del bazo. En estos animales, la secuencia reguladora puede ser constitutiva o inducible, o la secuencia reguladora puede ser específica de tejido. En algunas realizaciones, la secuencia reguladora puede ser un promotor Pol III o Pol II, y puede ser una secuencia exógena. Estos animales transgénicos pueden ser primates no humanos o roedores, tales como ratones o ratas, u otros animales (por ejemplo, otros mamíferos, tales como cabras o vacas, o aves) descritos en el presente documento.

La divulgación también incluye células derivadas de los nuevos animales transgénicos. Por ejemplo, estas células pueden ser un linfocito, una célula hematopoyética, una célula hepática, una célula cardíaca, una célula endotelial vascular o una célula del bazo.

En otro aspecto la invención incluye métodos de inducción de interferencia de ácido ribonucleico (ARNi) de un gen diana en una célula, por ejemplo, en un animal o en cultivo. Los nuevos métodos pueden incluir la obtención de un animal transgénico que comprende un transgén que incluye una molécula de ácido nucleico que codifica un precursor de ARN manipulado y un promotor inducible; e inducir a la célula a expresar el precursor para formar un ácido ribonucleico de interferencia (ARNsi) pequeño dentro de la célula, induciendo de este modo ARNi del gen diana en el animal.

Alternativamente, los métodos incluyen la obtención de una célula huésped; cultivar la célula; y permitir que la célula exprese el precursor de ARN para formar un ácido ribonucleico de interferencia pequeño (ARNsi) dentro de la célula, induciendo así ARNi del gen diana en la célula.

Un "transgén" es cualquier molécula de ácido nucleico, que se inserta por artificio en una célula, y se convierte en parte del genoma del organismo que se desarrolla a partir de la célula. Dicho transgén puede incluir un gen que es parcial o totalmente heterólogo (es decir, extraño) al organismo transgénico, o puede representar un gen homólogo a un gen endógeno del organismo. El término transgén significa también una molécula de ácido nucleico que incluye una o más secuencias de ácido nucleico seleccionadas, por ejemplo, ADN, que codifican uno o más precursores de ARN manipulados, para expresarse en un organismo transgénico, por ejemplo animal, que es parcialmente o totalmente heteróloga, es decir, extraña, al animal transgénico, u homóloga a un gen endógeno del animal transgénico, pero que está diseñada para ser insertada en el genoma del animal en una posición que difiere de la del gen natural. Un transgén incluye uno o más promotores y cualquier otro ADN, tales como intrones, necesarios para la expresión de la secuencia de ácido nucleico seleccionada, todos operativamente ligados a la secuencia seleccionada, y pueden incluir una secuencia potenciadora.

Una "célula transformada" es una célula en la que (o en un antepasado de la misma) se ha introducido, mediante técnicas de ADN recombinante, una molécula de ácido nucleico o transgén que codifica un precursor de ARN manipulado.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "unido operativamente" significa que una secuencia de ácido nucleico seleccionada, por ejemplo, que codifica un precursor de ARN manipulado, está en proximidad con un promotor, por ejemplo, un promotor específico de tejido, para permitir que el promotor regule la expresión de la secuencia de ácido nucleico seleccionada. Además, el promotor está situado corriente arriba de la secuencia de ácido nucleico seleccionada en términos de la dirección de transcripción y traducción.

10 Por promotor se entiende una secuencia de ácido nucleico que es suficiente para dirigir la transcripción. Un promotor específico de tejido afecta la expresión de la secuencia de ácido nucleico seleccionada en células específicas, por ejemplo, células hematopoyéticas, o células de un tejido específico dentro de un animal, por ejemplo endotelio cardíaco, muscular o vascular. El término también cubre los denominados promotores "fugitivos", que regulan la expresión de una secuencia de ácido nucleico seleccionada principalmente en un tejido, pero también causan expresión en otros tejidos. Tales promotores también pueden incluir secuencias de ADN adicionales que son necesarias para la expresión, tales como intrones y secuencias potenciadoras.

15 Por "transgénica" se entiende cualquier célula que incluya un ácido nucleico, por ejemplo, una secuencia de ADN, que se inserte por arteificio en una célula y se convierta en parte del genoma de un organismo que se desarrolla a partir de esa célula. Un "animal transgénico" significa un animal que incluye un transgén que se inserta en una célula embrionaria y se convierte en una parte del genoma del animal que se desarrolla a partir de esa célula, o una descendencia de tal animal. En los animales transgénicos descritos en el presente documento, el transgén hace que células de tejido específicas expresen un precursor de ARN manipulado. Se incluye en la divulgación, cualquier animal que puede ser producido por tecnología transgénica, aunque se prefieren los mamíferos. Los mamíferos preferidos incluyen primates no humanos, ovejas, cabras, caballos, ganado vacuno, cerdos, conejos y roedores tales como cobayas, hámsteres, ratas, jerbos y, preferiblemente, ratones.

20 Una "molécula o secuencia de ácido nucleico aislada" es una molécula o secuencia de ácido nucleico que no es inmediatamente contigua a ambas secuencias codificadoras con las que es inmediatamente contigua (una en el extremo 5' y una en el extremo 3') en el genoma natural del organismo del que se deriva. Por lo tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN o ARN recombinante que se incorpora en un vector; en un plásmido o virus de replicación autónoma; o en el ADN genómico de un procariota o eucariota, o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido por PCR o tratamiento con endonucleasa de restricción) independientemente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica una secuencia polipeptídica adicional.

25 Un "gen diana" es un gen cuya expresión debe ser inhibida selectivamente o "silenciada". Este silenciamiento se logra mediante la escisión del ARNm del gen diana mediante un ARNsi que se crea a partir de un precursor de ARN manipulado por el sistema ARNi de una célula. Una porción o segmento de un tallo dúplex del precursor de ARN es una cadena antisentido que es complementaria, por ejemplo, totalmente complementaria, a una sección de aproximadamente 18 a aproximadamente 40 o más nucleótidos del ARNm del gen diana.

30 El término "manipulado", como en un precursor de ARN manipulado, o una molécula de ácido nucleico manipulada, indica que el precursor o molécula no se encuentra en la naturaleza, que toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico del precursor o molécula son creados o seleccionados por el hombre. Una vez creada o seleccionada, la secuencia puede ser replicada, traducida, transcrita o procesada de otra forma por mecanismos dentro de una célula. De este modo, un precursor de ARN producido dentro de una célula a partir de un transgén que incluye una molécula de ácido nucleico modificada genéticamente es un precursor de ARN manipulado.

35 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica al que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, se impone la presente especificación, incluyendo definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

40 La invención proporciona varias ventajas. Por ejemplo, la invención mejora y supera una deficiencia significativa en la técnica anterior. Los métodos anteriores para inducir ARNi en células de mamífero usando ARNsi se restringieron a cultivos celulares. Los nuevos métodos extienden ARNi a animales enteros, por ejemplo, mamíferos, y permiten así que el ARNi sea dirigido a tipos, órganos o tejidos específicos de células, y/o a etapas de desarrollo específicas.

45 Además, esta tecnología simplifica y reduce el coste de la construcción de ARNsi, porque las moléculas de ADN son relativamente baratas de fabricar. De este modo, pueden prepararse grandes poblaciones de plásmidos u otros vectores, conteniendo cada uno una molécula de ácido nucleico que codifica un precursor de ARN manipulado que se dirige a un gen particular, puede prepararse fácilmente, por ejemplo, en un formato de matriz. Además, las nuevas moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en una variedad de células, que pueden cultivarse in vitro usando técnicas conocidas. Además, los nuevos métodos permiten la reducción a largo plazo, por ejemplo,

permanente, de la expresión de genes dirigidos en líneas celulares, porque los ARNsi son transitorios, pero una horquilla transgénica proporciona un suministro duradero de ARNsi.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la siguiente descripción. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático de la naturaleza dual de las rutas de ARNts y ARNsi.

La Figura 2A es una representación esquemática de un precursor de ARNts de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1).

Las Figs. 2B a 2E son representaciones esquemáticas de precursores sintéticos de ARN manipulados (SEQ ID NOS: 2, 3, 4 y 5).

La FIG. 3 es una autorradiografía que muestra los resultados de un ensayo para determinar si un precursor de ARN manipulado puede promover la escisión del ARNm diana in vitro en una reacción ARNi estándar.

Las Figs. 4A a 4C son representaciones esquemáticas del ARNsi de la luciferasa sintética (4A, SEQ ID NOS: 6 y 7), y precursores de ARN sintético, sintetizados 5' y 3' (4B, SEQ ID NO: 8 y 4C, SEQ ID NO: 9).

La Figura 4D es una representación esquemática de un ARNm diana quimérico para una reacción in vitro de luciferasa/ARNi let-7. Los sitios de escisión de diana dirigida a ARNsi se indican mediante "tijeras".

La Figura 4E es una autorradiografía que muestra los resultados de un ensayo para determinar si los precursores de ARN por manipulación sintética 5' y 3' de las Figs. 4B y 4C pueden promover la escisión del ARNm diana in vitro en una reacción ARNi estándar.

La Figura 5 es un diagrama esquemático del transgén que codifica un precursor de ARN manipulado por ingeniería genética (SEQ ID NO: 2) y la transcripción y procesamiento del precursor para formar un ARNsi bicatenario (SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 12).

Descripción detallada

Los ARN temporales pequeños (ARNtss), también conocidos como microARN (ARNmi), tales como lin-4 y let-7 en *Caenorhabditis elegans* y let-7 en *Drosophila melanogaster* y humanos no codifican ninguna proteína, sino que parecen bloquear la traducción productiva de ARNm. Mediante secuencias de unión en la región 3' no traducida (UTR 3') de sus ARNm diana. Como se ha descrito en Hutvagner et al., Science, 293: 834 (12 de julio de 2001), se ha demostrado que el ARN de la let-7 en la *Drosophila* se escinde de un transcrito precursor mayor, que es similar a la generación de ARN pequeños a partir de un ARN precursor estructurado de doble cadena en la ruta de interferencia de ARN (ARNi).

Al igual que ARNsi, los ARNtss tienen también 21-25 nucleótidos de longitud, pero a diferencia de ARNsi, son de cadena sencilla y no median el silenciamiento de genes a través de la escisión de ARNm diana. Como se muestra en la FIG. 1, las rutas ARNi y ARNts se cruzan; ambas requieren de la enzima de procesamiento de ARN Dicer para producir los componentes de ARN pequeños activos que reprimen la expresión génica. Dicer y tal vez otras proteínas actúan sobre pre-ARNtss para producir ARNtss monocatenarios maduros que reprimen la traducción de ARNm. En ARNi, Dicer corta el ARN de doble cadena largo para producir los dúplex de ARNsi que median la destrucción de ARNm dirigida.

Considerando que los ARNs de doble cadena largos se escinden simétricamente por Dicer para generar ARNsi dúplex, la evidencia actual sugiere que los ARNt se escinden asimétricamente para generar solamente un ARNt de cadena sencilla. Los precursores de ARNts son ARN de tallo-bucle que no median la escisión de la diana o provocan la secuencia de respuestas no específicas inducidas por ARN de doble cadena largo. Por otra parte, la invención proporciona nuevos precursores de ARN manipulados que cuando se procesan dentro de una célula generan ARNsi que media en la escisión de diana. Estos ARNsi pueden ser de cadena doble o sencilla, siempre que medien la escisión del ARNm diana. Dichos precursores de ARN manipulados se pueden expresar en mamíferos transgénicos en una forma específica del tipo de célula o en una etapa específica de desarrollo para inducir ARNi en una célula o células específicas a un tiempo definido.

Un lisado de embrión de *Drosophila* que media ARNi in vitro (Tuschl et al., (1999) citado supra), que procesan ARN de doble cadena en ARNsi (Zamore et al., (2000) citado supra) y pre-let-7-ARNts en ARNts let-7 maduro se puede usar (Hutvagner et al., (2001, citado supra), para ensayar la capacidad de un precursor de ARN manipulado para mediar ARNi in vitro. Este ensayo permite la prueba de los nuevos precursores de ARN manipulados. Los nuevos precursores manipulados difieren de los precursores de ARNts de tipo silvestre naturales, por diversas modificaciones y por el hecho de que una porción de su tallo dúplex comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria, preferiblemente totalmente complementaria, a una porción del ARNm de un gen diana.

Precusores de ARN diseñados que generan ARNsi

Los precursores de ARNts de origen natural (pre-ARNts) tienen ciertos elementos o componentes que se ilustran en la FIG. 2A, que muestra un precursor de ARNts para let-7 (pre-let-7). Cada precursor es una hebra única que forma un tallo dúplex que incluye dos porciones que son generalmente complementarias, y un bucle, que conecta las dos porciones del tallo. En pre-ARNtss típicos, el tallo incluye una o más protuberancias, por ejemplo, nucleótidos extra que crean un solo "bucle" de nucleótido en una porción del tallo, y/o uno o más nucleótidos no emparejados que crean una brecha en la hibridación de las dos porciones del tallo entre sí.

Los precursores de ARN manipulados de la invención son constructos artificiales que son similares a los pre-ARNtss que existen naturalmente, pero difieren de las secuencias precursoras de tipo silvestre de varias maneras. La diferencia clave es que una porción del tallo dúplex es una secuencia de ácido nucleico que es complementaria (o antisentido) al ARNm diana. Así, los precursores de ARN manipulados incluyen un tallo dúplex con dos porciones y un bucle que conecta las dos porciones de tallo. Las dos porciones de tallo tienen una longitud de aproximadamente 18 o 19 a aproximadamente 25, 30, 35, 37, 38, 39 o 40 o más nucleótidos. Cuando se usan en células de mamífero, la longitud de las porciones de tallo debe ser inferior a aproximadamente 30 nucleótidos para evitar provocar respuestas no específicas como la ruta del interferón. En las células no mamíferas, el tallo puede ser más largo de 30 nucleótidos. De hecho, el tallo puede incluir secciones mucho más grandes complementarias al ARNm diana (hasta, e incluyendo el ARNm completo). Las dos porciones del tallo dúplex deben ser suficientemente complementarias para hibridarse para formar el tallo dúplex. Por lo tanto, las dos porciones pueden ser, pero no necesariamente ser, completa o perfectamente complementarias. Además, las dos porciones de tallo pueden tener la misma longitud, o una porción puede incluir un saliente de 1, 2, 3 o 4 nucleótidos. Los nucleótidos sobresalientes pueden incluir, por ejemplo, uracilos (Us), por ejemplo, todos los uracilos.

Otras diferencias de las secuencias naturales de pre-ARNts incluyen, pero no se limitan a, eliminación de nucleótidos no emparejados o abultados, introducción de nucleótidos adicionales de pares de bases a una o ambas porciones de tallo, modificación de la secuencia de bucle para aumentar o disminuir el número de los nucleótidos pareados, o reemplazar la totalidad o parte de la secuencia de bucle con una secuencia tetrabucle u otras secuencias de bucle. Por lo tanto, el bucle en los precursores de ARN manipulados puede ser 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más, por ejemplo, 15 o 20, o más nucleótidos de longitud. Las secuencias de tetrabucle pueden incluir, pero no se limitan a, las secuencias GNRA (SEQ ID NO: 13), donde N es cualquier nucleótido y R es un nucleótido de purina, GGGG (SEQ ID NO: 14) y UUUU (SEQ ID NO: 15).

Cuatro ejemplos de tales precursores de ARN manipulados se ilustran en las FIGs. 2B a 2E. Las Figs. 2B y 2C ilustran precursores manipulados en los que las porciones de tallo han tenido todos los nucleótidos no emparejados y abultados eliminados o emparejados, pero el bucle es el mismo que el bucle de tipo silvestre en el pre-ARNts. Las Figs. 2D y 2E ilustran dos precursores de ARN manipulados con un tetrabucle. En la fig. 2D, el tetrabucle UUUU (SEQ ID NO: 15) reemplaza una porción del bucle de tipo silvestre en la FIG. 2A. En la fig. 2E, el tetrabucle GGGG (SEQ ID NO: 14) reemplaza toda la secuencia de bucle de tipo silvestre.

Las Figs. 4B y 4C ilustran adicionales precursores de ARN manipulados. Cada precursor de ARN manipulado incluye en su tallo una secuencia que es perfectamente complementaria a una porción de la secuencia del ARNm de la luciferasa de luciéARNga. En la fig. 4B (SEQ ID NO: 8), esta región se muestra en negrita y está situada en el lado 3' del tallo. En la Fig. 4C (SEQ ID NO: 9), esta secuencia complementaria está en el lado 5' del tallo. A diferencia del ARN pre-let-7 de origen natural, estos precursores de ARN manipulados tienen tallos completamente complementarios, y ARNi directo contra el ARNm de la luciferasa.

Además, la modificación del precursor de ARNts natural para generar un precursor de ARN manipulado (pre-ARNsi) puede incluir la alteración de la secuencia del ARN para incluir las secuencias del dúplex de ARNsi deseado. El dúplex de ARNsi deseado, y por tanto ambas de las dos porciones de tallo en el precursor de ARN manipulado, se seleccionan por métodos conocidos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, la selección de una secuencia de 18, 19, 20, 21 nucleótidos o más larga de la secuencia de ARNm del gen diana de una región de 100 a 200 o 300 nucleótidos en el lado 3' del inicio de la traducción. En general, la secuencia puede seleccionarse de cualquier porción del ARNm del gen diana, tal como la región 5' UTR (región no traducida), la secuencia codificante o la UTR 3'. Esta secuencia puede seguir opcionalmente inmediatamente después de una región del gen diana que contiene dos nucleótidos AA adyacentes. Los dos últimos nucleótidos de la secuencia de aproximadamente 21 nucleótidos pueden seleccionarse para ser UU (de modo que la cadena antisentido del ARNsi comience con UU). Esta secuencia de nucleótidos de aproximadamente 21 puede usarse para crear una porción de un tallo dúplex en el precursor de ARN manipulado. Esta secuencia puede reemplazar una porción de tallo de una secuencia pre-ARNts de tipo silvestre, por ejemplo, enzimáticamente, o puede incluirse en una secuencia completa que se sintetiza. Por ejemplo, se pueden sintetizar oligonucleótidos de ADN que codifican todo el precursor de ARN manipulado de bucle tallo o que codifican sólo la parte que se va a insertar en el tallo dúplex del precursor y utilizar enzimas de restricción para construir el constructo de precursor de ARN manipulado, por ejemplo, de un pre-ARNts de tipo silvestre.

Los precursores de ARN manipulados pueden incluir en el tallo dúplex las secuencias de nucleótidos del ARNsi de aproximadamente 21 a 22 que se desea que se produzcan in vivo. Por lo tanto, la porción de tallo del precursor de ARN manipulado incluye al menos 18 o 19 pares de nucleótidos que corresponden a la secuencia de una porción

exónica del gen cuya expresión debe reducirse o inhibirse. Los dos nucleótidos 3' que flanquean esta región del tallo pueden elegirse de manera que maximicen la producción del ARNsi del precursor de ARN manipulado y para maximizar la eficacia del ARNip resultante dirigiendo el ARNm correspondiente para su destrucción mediante ARNi in vivo y In vitro.

- 5 Otra característica definitoria de estos precursores de ARN manipulados puede ser que como consecuencia de su longitud, secuencia y/o estructura, no induzcan respuestas de secuencia no específicas, tales como inducción de la respuesta o apoptosis de interferón, o que Inducen un nivel inferior de dicha secuencia de respuestas no específicas que el ARN de doble cadena (> 150 pb) actualmente utilizado para inducir ARNi. Por ejemplo, la respuesta del interferón es desencadenada por ARNds más de 30 pares de bases.

10 Transgenes que codifican precursores de ARN manipulados

Los precursores de ARN manipulados pueden ser sintetizados por métodos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado (tal como están comercialmente disponibles de Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Estos precursores sintéticos de ARN manipulados pueden usarse directamente como se describe a continuación o clonarse en vectores de expresión por métodos conocidos en el campo.

- 15 Los precursores de ARN manipulados deben suministrarse a las células in vitro o in vivo en las que se desea dirigir un ARNm específico para su destrucción. Se han desarrollado varios métodos para suministrar ADN o ARN a las células. Por ejemplo, para la administración in vivo, las moléculas pueden inyectarse directamente en un sitio de tejido o administrarse sistémicamente. La administración in vitro incluye procedimientos conocidos en la técnica tales como electroporación y lipofección.

- 20 Para conseguir concentraciones intracelulares de la molécula de ácido nucleico suficientes para suprimir la expresión de ARNm endógenos, se puede usar, por ejemplo, una construcción de ADN recombinante en la que el oligonucleótido se coloca bajo el control de un Pol III fuerte (por ejemplo, U6 o Promotor PolIII H1 - ARN) o promotor Pol II. El uso de una construcción de este tipo para transfectar células diana in vitro o in vivo resultará en la transcripción de cantidades suficientes del precursor de ARN manipulado para conducir a la producción de un ARNsi que puede dirigirse a una secuencia de ARNm correspondiente para la escisión por ARNi para disminuir la Expresión del gen que codifica ese ARNm. Por ejemplo, un vector puede ser introducido in vivo de manera que sea recogido por una célula y dirija la transcripción de un precursor de ARN manipulado. Dicho vector puede permanecer episomal o integrarse cromosómicamente, siempre y cuando pueda ser transcrito para producir el precursor de ARNts deseado.

- 25 Tales vectores pueden construirse por métodos de tecnología de ADN recombinante conocidos en la técnica. Los vectores pueden ser vectores plasmídicos, víricos u otros conocidos en la técnica tales como los descritos aquí, utilizados para la replicación y expresión en células de mamífero u otros tipos de células diana. Las secuencias de ácido nucleico que codifican los precursores de ARN manipulados pueden prepararse usando técnicas conocidas. Por ejemplo, se pueden sintetizar dos oligonucleótidos de ADN sintéticos para crear un nuevo gen que codifica todo el precursor de ARN manipulado. Los oligonucleótidos de ADN, que se emparejarán, dejando "extremos pegajosos" apropiados para la clonación, se pueden insertar en un sitio de restricción en un plásmido que contiene una secuencia promotora (por ejemplo, un promotor Pol II o Pol III) y las secuencias 3' A las secuencias precursoras de ARN manipuladas (por ejemplo, una secuencia señal de clivaje y poliadenilación de SV40 o una secuencia terminadora Pol III).

- 30 La divulgación también abarca células huésped manipuladas genéticamente que contienen cualquiera de los vectores de expresión anteriores y expresan de ese modo las moléculas de ácido nucleico de la invención en la célula huésped. Las células huésped pueden cultivarse usando técnicas y métodos conocidos (véase, por ejemplo, Cultivo de células animales (RI Freshney, Alan R. Liss, Inc. 1987) Molecular Cloning, Sambrook et al., (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)).

- 35 La introducción exitosa de vectores en células huésped puede monitorizarse usando varios métodos conocidos. Por ejemplo, la transfección transitoria puede ser señalada con un informador, tal como un marcador fluorescente, tal como Green Fluorescent Protein (GFP). La transfección estable puede ser indicada usando marcadores que proporcionan a la célula transfectada resistencia a factores ambientales específicos (por ejemplo, antibióticos y fármacos), tales como resistencia a higromicina B, por ejemplo, en células de insecto y en células de mamífero.

40 Secuencias reguladoras

- La expresión de los precursores de ARN manipulados puede ser impulsada por secuencias reguladoras, y los vectores pueden incluir cualquier secuencia reguladora conocida en la técnica para actuar en células de mamífero, por ejemplo, células murinas; En células de insectos; En células vegetales; U otras células. El término secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión. Se apreciará que la secuencia reguladora apropiada depende de factores tales como el uso futuro de la célula o animal transgénico en el que se está introduciendo una secuencia que codifica un precursor de ARN manipulado y el nivel de expresión del precursor de ARN deseado. Un experto en la técnica podría elegir la secuencia reguladora apropiada. Por ejemplo,

los animales transgénicos descritos en la presente memoria pueden usarse para determinar el papel de un polipéptido de ensayo o los precursores de ARN manipulados en un tipo de célula particular, por ejemplo, una célula hematopoyética. En este caso, puede usarse una secuencia reguladora que impulse la expresión del transgén de forma ubicua, o una secuencia reguladora específica del hematopoyético que exprese el transgén solamente en las células hematopoyéticas. La expresión de los precursores de ARN manipulados en una célula hematopoyética significa que la célula es ahora susceptible a ARNi específico, dirigido de un gen particular. A continuación se describen ejemplos de diversas secuencias reguladoras.

Las secuencias reguladoras pueden ser inducibles o constitutivas. Las secuencias reguladoras constitutivas adecuadas incluyen la secuencia reguladora de un gen doméstico tal como la secuencia reguladora de α -actina, o pueden ser de origen viral tales como secuencias reguladoras derivadas de virus de tumor mamario de ratón (MMTV) o citomegalovirus (CMV).

Alternativamente, la secuencia reguladora puede dirigir la expresión del transgén en órganos o tipos celulares específicos (véase, por ejemplo, Lasko et al., 1992, Proc. Nat. Ac. Sci. USA 89: 6232). Se conocen en la técnica varias secuencias reguladoras específicas del tejido, incluyendo la secuencia reguladora de la albúmina para el hígado (Pinkert et al., 1987, Genes Dev. 1: 268 - 276); La secuencia reguladora de endotelina para células endoteliales (Lee, 1990, J. Biol. Chem. 265: 10446 - 50); La secuencia reguladora de la queratina para la epidermis; La secuencia reguladora de la cadena ligera de miosina 2 para el corazón (Lee et al., 1992, J. Biol. Chem. 267: 15875-85) y la secuencia reguladora de la insulina para el páncreas (Bucchini et al., 1986, Proc. Acad. Sci. USA 83: 2511 - 2515), o la secuencia reguladora de vav para células hematopoyéticas (Oligvy et al., 1999, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 96: 14943 - 14948). Otra secuencia reguladora adecuada, que dirige la expresión constitutiva de transgenes en células de origen hematopoyético, es la secuencia reguladora MHC de clase I murina (Morello et al., 1986, EMBO J. 5: 1877-1882). Dado que la expresión del MHC es inducida por citoquinas, la expresión de un gen de prueba operativamente unido a esta secuencia reguladora puede ser regulada positivamente en presencia de citoquinas.

Además, la expresión del transgén puede ser regulada con precisión, por ejemplo, utilizando una secuencia reguladora inducible y sistemas de expresión tales como una secuencia reguladora que es sensible a ciertos reguladores fisiológicos, por ejemplo, niveles de glucosa en circulación u hormonas (Docherty et al., 1994, FASEB J. 8: 20 - 24). Tales sistemas de expresión inducibles, adecuados para el control de la expresión de transgenes en células o en mamíferos tales como ratones, incluyen la regulación por ecdisona, por estrógeno, progesterona, tetraciclina, inductores químicos de dimerización e isopropil beta-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Denominados colectivamente como "la molécula reguladora"). Cada uno de estos sistemas de expresión está bien descrito en la bibliografía y permite la expresión del transgén en todo el animal de una manera controlada por la presencia o ausencia de la molécula reguladora. Para una revisión de sistemas de expresión inducibles, véase, por ejemplo, Mills, 2001, Genes Devel. 15: 1461 - 1467, y las referencias citadas en el mismo.

Los elementos reguladores mencionados anteriormente incluyen, pero no se limitan a, el gen temprano inmediato del citomegalovirus hCMV, los promotores tempranos o tardíos del adenovirus SV40 (Bernoist et al., Nature, 290: 304, 1981), el sistema tet, El sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC, el sistema TRC, el operador principal y las regiones promotoras del fago A, las regiones de control de la proteína de la capa fd, el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa, los promotores de la fosfatasa ácida y Los promotores de los factores de acoplamiento α de la levadura. Otros promotores incluyen el promotor contenido en la repetición terminal larga de 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al., Cell 22: 787-797, 1988); El promotor de timidina quinasa de herpes (Wagner et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78: 1441, 1981); O las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster et al., Nature 296: 39, 1988).

Ensayo para probar los precursores de ARN manipulados

Los lisados de embriones de *Drosophila* pueden usarse para determinar si un precursor de ARN manipulado fue, de hecho, el precursor directo de un ARNts o ARNsi maduro. Este ensayo de lisado se describe en Tuschl et al., 1999, supra, Zamore et al., 2000, supra, y Hutvagner et al. 2001, supra. Estos lisados recapitulan ARNi in vitro, lo que permite investigar si el ARN precursor propuesto se escindió en un ARNts maduro o ARNsi mediante un mecanismo de tipo ARNi. Brevemente, el ARN precursor se incubaba con lisado de embrión de *Drosophila* durante varias veces, luego se ensaya la producción del ARNsi maduro o ARNts mediante extensión de cebador o hibridación Northern. Como en el ajuste in vivo, el ARN maduro se acumula en la reacción libre de células. Por lo tanto, se puede demostrar que un ARN correspondiente al precursor propuesto se convierte en un ARNts maduro o ARNsi duplex en el lisado de embriones de *Drosophila*.

Además, un precursor de ARN manipulado puede ser funcionalmente probado en los lisados de embriones de *Drosophila*. En este caso, el precursor de ARN manipulado se incubaba en el lisado en presencia de un ARNm diana radiomarcado 5' en una reacción ARNi in vitro estándar durante varias longitudes de tiempo. El ARNm diana puede ser radiomarcado 5' usando guanilil transferasa (como se describe en Tuschl et al., 1999, supra y referencias en el mismo) u otros métodos adecuados. Los productos de la reacción in vitro se aíslan luego y se analizan en un gel de acrilamida o agarosa desnaturizante para determinar si el ARNm diana se ha escindido en respuesta a la presencia del precursor de ARN manipulado en la reacción. La extensión y la posición de dicha división del ARNm

objetivo indicará si la ingeniería del precursor creó un pre-ARNsi capaz de mediación de secuencias específicas ARNi.

Animales Transgénicos

Los precursores de ARN manipulados de la invención pueden expresarse en animales transgénicos. Estos animales representan un sistema modelo para el estudio de trastornos que son causados por, o exacerbados por, sobreexpresión o subexpresión (en comparación con tipo silvestre o normal) de ácidos nucleicos (y sus polipéptidos codificados) dirigidos a la destrucción por el precursor de ARN manipulado (ARNsi) y para el desarrollo de agentes terapéuticos que modulan la expresión o actividad de ácidos nucleicos o polipéptidos destinados a la destrucción.

Los animales transgénicos pueden ser animales de granja (cerdos, cabras, ovejas, vacas, caballos, conejos y similares), roedores (tales como ratas, cobayas y ratones), primates no humanos (por ejemplo, babuinos, monos y chimpancés), y animales domésticos (por ejemplo, perros y gatos). Pueden usarse invertebrados tales como *Caenorhabditis elegans* o *Drosophila*, así como vertebrados no mamíferos tales como peces (por ejemplo, pez cebra) o aves (por ejemplo, pollos). Los precursores de ARN manipulados con tallos de 18 a 30 nucleótidos de longitud se prefieren para uso en mamíferos, tales como ratones.

Se puede identificar un animal fundador transgénico basado en la presencia de un transgén que codifica los nuevos precursores de ARN en su genoma y/o expresión del transgén en tejidos o células de los animales, por ejemplo, usando PCR o análisis de Northern. La expresión se confirma mediante una disminución de la expresión (ARN o proteína) de la secuencia diana.

Se puede usar un animal fundador transgénico para engendrar animales adicionales que portan el transgén. Además, los animales transgénicos que llevan un transgén que codifica los precursores de ARN pueden ser cruzados además con otros animales transgénicos que portan otros transgenes. Además, las células obtenidas del animal fundador transgénico o de su progenie pueden cultivarse para establecer líneas celulares primarias, secundarias o inmortales que contienen el transgén.

Procedimientos para hacer animales transgénicos, no humanos

Se han utilizado varios métodos para obtener animales no humanos transgénicos, que son animales que han obtenido un gen adicional mediante la introducción de un transgén en sus células (por ejemplo, las células somáticas y las células germinales) o en una línea germinal antepasada. En algunos casos, los animales transgénicos pueden ser generados por instalaciones comerciales (por ejemplo, The Transgenic *Drosophila* Facility en Michigan State University, The Transgenic Zebrafish Core Facility en el Medical College of Georgia (Augusta, Georgia) y Xenogen Biosciences (St. Louis, MO). En general, la construcción que contiene el transgén se suministra a la instalación para generar un animal transgénico.

Los procedimientos para generar animales transgénicos incluyen la introducción del transgén en la línea germinal del animal. Un método consiste en la microinyección de un constructo genético en el pronúcleo de un embrión de etapa temprana (por ejemplo, antes de la etapa de cuatro células, Wagner et al., 1981, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78: 5016, Brinster et al. 1985, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82: 4438). Alternativamente, el transgén puede introducirse en el pronúcleo por infección retroviral. Se ha descrito un procedimiento detallado para producir tales ratones transgénicos (véase, por ejemplo, Hogan et al., Manipulating the Embryo Mouse, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1986), Patente U.S. nº 5.175.383 (1992)). Este procedimiento también se ha adaptado para otras especies animales (por ejemplo, Hammer et al., 1985, Nature 315: 680, Murray et al., 1989, Reprod. Fert. Dev 1: 147, Pursel et al., 1987, Vet Rexroad et al., 1990, J. Reprod. Fert. 41 (suppl): 119, Rexroad et al., 1989, Molec. Reprod. Dev.1: 164, Simons et al., 1988, BioTechnology 6: 179, Vize et al., 1988, J. Cell. Sci. 90: 295 y Wagner, 1989, J. Cell. Biochem., 13B (suppl): 164).

En resumen, el procedimiento implica la introducción del transgén en un animal mediante la microinyección de la construcción en los pronúcleos del huevo o mamíferos fecundados para hacer que una o más copias del transgén sean retenidas en las células del mamífero en desarrollo. Después de la introducción de la construcción transgénica en el huevo fertilizado, el óvulo puede incubarse in vitro durante cantidades variables de tiempo, o reimplantarse en un huésped sustituto, o ambos. Un método común es incubar los embriones in vitro durante aproximadamente 1-7 días, dependiendo de la especie, y luego reimplantarlos en el huésped sustituto. La presencia del transgén en la progenie de los embriones transgénicamente manipulados puede ser probada por análisis de transferencia Southern de un segmento de tejido.

Otro método para producir animales transgénicos de línea germinal es a través del uso de células de tallo embrionario (ES). La construcción génica puede introducirse en células madre embrionarias mediante recombinación homóloga (Thomas et al., 1987, Cell 51: 503, Capecchi, Science 1989, 244: 1288, Joyner et al., 1989, Nature 338: 153) en una región transcripcionalmente activa del genoma. Una construcción adecuada también se puede introducir en células madre embrionarias mediante transfección mediada por ADN, tal como por electroporación (Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987). Los procedimientos detallados para cultivar células madre embrionarias (por ejemplo, ES-D3, ATCC # CCL-1934, ES-E14TG2a, ATCC # CCL-1821, American Type Culture Collection, Rockville, MD) y métodos para producir animales

transgénicos a partir de células madre embrionarias Se encuentran en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells, A Practical Approach, ed. E.J. Robertson (IRL Press, 1987). En resumen, las células ES se obtienen a partir de embriones de preimplantación cultivados in vitro (Evans et al., 1981, Nature 292: 154-156). Los transgenes pueden introducirse eficazmente en células ES por transfección de ADN o por transducción mediada por retrovirus. Posteriormente, las células ES transformadas resultantes se pueden combinar con blastocitos de un animal no humano. Las células ES colonizan el embrión y contribuyen a la línea germinal del animal quimérico resultante.

En los métodos anteriores, el transgén puede introducirse como una construcción lineal, un plásmido circular o un vector viral, que puede incorporarse y heredarse como un transgén integrado en el genoma del huésped. El transgén también puede construirse para permitir su herencia como un plásmido extracromosómico (Gassmann et al., 1995, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 92: 1292). Un plásmido es una molécula de ADN que puede replicarse de forma autónoma en un huésped.

Los animales transgénicos no humanos también pueden obtenerse infectando o transfectando células ya sea in vivo (por ejemplo, inyección directa), ex vivo (por ejemplo, infectando las células fuera del huésped y posteriormente reimplantando), o in vitro (por ejemplo, infectando las células fuera del huésped), por ejemplo, con un vector viral recombinante que lleva un gen que codifica los precursores de ARN manipulados. Ejemplos de vectores víricos adecuados incluyen vectores retrovirales recombinantes (Valerio et al., 1989, Gene 84: 419, Scharman et al., 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88: 462, Miller y Buttimore, 1986, Mol. Cell Biol. 6: 2895), vectores adenovirales recombinantes (Freidman et al., 1986, Mol. Cell. Biol. 6: 3791, Levrero et al., 1991, Gene 101: 195) y vectores virales recombinantes de Herpes simplex Fink et al., 1992, Human Gene Therapy 3:11). Tales métodos son también útiles para introducir constructos en células para usos distintos a la generación de animales transgénicos.

Otros enfoques incluyen la inserción de transgenes que codifican los nuevos precursores de ARN manipulados en vectores víricos, incluyendo adenovirus recombinante, virus adenoasociado y virus 1 del herpes simplex, o plásmidos recombinantes bacterianos o eucariotas. Los vectores virales transfectan las células directamente. Otros enfoques incluyen el suministro de los transgenes, en forma de ADN plásmido, con la ayuda, por ejemplo, de liposomas catiónicos (lipofectina) o conjugados de polilisina derivados (por ejemplo, conjugados con anticuerpos), gramacidina S, envolturas virales artificiales u otros tales portadores intracelulares, así como la inyección directa de la construcción transgénica o la precipitación con CaPO_4 llevada a cabo in vivo. Tales métodos también pueden usarse in vitro para introducir constructos en células para usos distintos a la generación de animales transgénicos.

Los vectores de retrovirus y vectores de virus adenoasociados pueden usarse como un sistema de administración génica recombinante para la transferencia de genes exógenos in vivo o in vitro. Estos vectores proporcionan un suministro eficaz de genes en las células y los ácidos nucleicos transferidos se integran de forma estable en el ADN cromosómico del huésped. El desarrollo de líneas celulares especializadas (denominadas "células empaquetadoras") que producen sólo retrovirus defectuosos de replicación ha aumentado la utilidad de los retrovirus para terapia génica y los retrovirus defectuosos se caracterizan por su uso en la transferencia génica con fines de terapia génica (véase Miller, 1990, Blood 76: 271). Un retrovirus defectuoso de replicación puede empacarse en viriones que pueden usarse para infectar una célula diana mediante el uso de un virus auxiliar mediante técnicas estándar. Los protocolos para producir retrovirus recombinantes y para infectar células in vitro o in vivo con tales virus pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology. Ausubel, F.M. Et al. (Eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Secciones 9.10-9.14 y otros manuales de laboratorio estándar.

Ejemplos de retrovirus adecuados incluyen pLJ, pZ7P, pWE y pEM que son conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de líneas de virus de empaquetado adecuadas para preparar sistemas retrovirales tanto ecotrópicos como anfotrópicos incluyen Psi-Crip, Psi-Cre, Psi-2 y Psi-Am. Se han utilizado retrovirus para introducir una variedad de genes en muchos tipos celulares diferentes, incluyendo células epiteliales, in vitro y/o in vivo (véase, por ejemplo, Eglitis et al., 1985, Science 230: 1395 - 1398, Danos y Mulligan, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 6460-6464, Wilson et al., 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 3014-3018; Armentano et al., 1990, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87: 6141 - 6145, Huber et al., 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88: 8039 - 8043; Ferry et al., 1991, Proc. Nat. Acad. : 8377 - 831; Chowdhury et al., 1991, Science 254: 1802 - 1805, van Beusechem et al., 1992, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89: 7640 - 7644; Gene Therapy 3: 641 - 647, Dai et al., 1992, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89: 10892 - 10895; Hwu et al., 1993, J. Immunol., 150: 4104 - 4,868,116; Patente US nº 4,980,286; Solicitud PCT WO 89/07136; Solicitud PCT WO 89/02468; Solicitud PCT WO 89/05345; y Solicitud PCT WO 92/07573).

En otro ejemplo, se pueden producir vectores retrovirales recombinantes capaces de transducir y expresar genes insertados en el genoma de una célula transfectando el genoma retroviral recombinante en líneas celulares de empaquetamiento adecuadas tales como PA317 y Psi-CRIP (Cornette et al., 1991, Human Gene Therapy 2: 5-10, Cone et al., 1984, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81: 6349). Los vectores adenovirales recombinantes pueden usarse para infectar una amplia variedad de células y tejidos en huéspedes susceptibles (por ejemplo, rata, hámster, perro y chimpancé) (Hsu et al., 1992, J. Infectious Disease, 166: 769), y también Tienen la ventaja de no requerir células mitotically activas para la infección.

Otro sistema de administración de genes víricos útil en la presente invención también utiliza vectores derivados de adenovirus. El genoma de un adenovirus puede manipularse de manera que codifique y exprese un producto génico de interés, pero se inactive en términos de su capacidad para replicarse en un ciclo de vida viral lítico normal. Véase,

por ejemplo, Berkner et al. (1988, *BioTechniques* 6: 616), Rosenfeld et al. (1991, *Science* 252: 431 - 434), y Rosenfeld et al. (1992, *Cell* 68: 143 - 155). Los vectores adenovirales adecuados derivados de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 dl324 u otras cepas de adenovirus (por ejemplo, Ad2, Ad3, Ad7, etc.) son conocidos por los expertos en la técnica. Los adenovirus recombinantes pueden ser ventajosos en ciertas circunstancias en que no son capaces de infectar células no divisorias y pueden usarse para infectar una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo células epiteliales (Rosenfeld et al., 1992, citado supra). Además, la partícula vírica es relativamente estable y susceptible de purificación y concentración, y como se ha indicado anteriormente, puede modificarse para afectar al espectro de infectividad. Además, el ADN adenoviral introducido (y el ADN extraño contenido en el mismo) no está integrado en el genoma de una célula huésped pero permanece episomal, evitando así problemas potenciales que pueden ocurrir como resultado de la mutagénesis de inserción in situ donde el ADN introducido se integra en el genoma del huésped (Por ejemplo, ADN retroviral). Además, la capacidad de carga del genoma adenoviral para ADN extraño es grande (hasta 8 kilobases) con relación a otros vectores de administración de genes (Berkner et al, citado supra, Haj-Ahmand y Graham, 1986, *J. Virol* 57: 267).

Otro sistema de vectores virales útil para la administración de los transgenes en cuestión es el virus adenoasociado (AAV). El virus adenoasociado es un virus defectuoso de origen natural que requiere otro virus, tal como un adenovirus o un virus del herpes, como un virus auxiliar para una replicación eficiente y un ciclo de vida productivo. Para una revisión, véase Muzyczka et al. (1992, *Curr. Topics in Micro. E Immunol.*, 158: 97 - 129). Es también uno de los pocos virus que pueden integrar su ADN en células que no se dividen y exhibe una alta frecuencia de integración estable (véase, por ejemplo, Flotte et al., (1992, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7: 349 - 356, Samulski et al., 1989, *J. Virol.* 63: 3822 - 3828, y McLaughlin et al (1989, *J. Virol.* 62: 1963 - 1973.) Vectores que contienen tan poco como 300 pares de bases de AAV pueden ser empaquetados y pueden integrarse. El espacio para el ADN exógeno está limitado a aproximadamente 4,5 kb. Se puede usar un vector AAV tal como el descrito en Tratschin et al (1985) *Mol. Cell Biol.* 5: 3251-3260 puede usarse para introducir ADN en las células. Se ha introducido una variedad de ácidos nucleicos en diferentes tipos de células utilizando vectores AAV (véase, por ejemplo, Hermonat y otros (1984) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 81: 6466-6470; Tratschin et al. (1985) *Mol. Cell Biol.* 4: 2072 - 2081, Wondisford y otros (1988) *Mol. Endocrinol* 2: 32 - 39 Tratschin y otros (1984) *J. Virol*, 51: 611 - 619; Flotte y otros (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 3781 - 3790).

Además de los métodos de transferencia vírica, tales como los ilustrados anteriormente, también pueden emplearse métodos no virales para causar la expresión de un precursor de ARN manipulado de la invención en el tejido de un animal. La mayoría de los métodos no virales de transferencia de genes se basan en los mecanismos normales utilizados por las células de mamíferos para la captación y el transporte intracelular de macromoléculas. En realizaciones preferidas, los sistemas de administración de genes no virales se basan en rutas endocíticas para la captación del gen sujeto por la célula diana. Los sistemas de ejemplo de administración génica de este tipo incluyen sistemas derivados de liposomas, conjugados de polilisina y envolturas virales artificiales. Otras realizaciones incluyen sistemas de inyección de plásmidos tales como los descritos en Meuli et al., (2001) *J. Invest. Dermatol*, 116 (1): 131 - 135; Cohen et al., (2000) *Gene Ther.*, 7 (22): 1896 - 905; Y Tam et al., (2000) *Gene Ther.*, 7 (21): 1867 - 74.

En una realización representativa, un gen que codifica un precursor de ARN manipulado de la invención puede ser atrapado en liposomas que llevan cargas positivas sobre su superficie (por ejemplo, lipofectinas) y (opcionalmente) que están marcados con anticuerpos contra antígenos de superficie celular del tejido diana (Mizuno et al., (1992) *No Shinkei Geka*, 20: 547 - 551, publicación PCT WO91/06309, Solicitud de Patente Japonesa 1047381 y Publicación de Patente Europea EP-A-43075).

Los animales que albergan el transgén pueden identificarse detectando la presencia del transgén en el ADN genómico (por ejemplo, usando el análisis Southern). Además, la expresión del precursor de ARN manipulado puede detectarse directamente (por ejemplo, mediante análisis Northern). La expresión del transgén también puede confirmarse detectando una disminución en la cantidad de proteína correspondiente a la secuencia diana. Cuando el transgén está bajo el control de un promotor inducible o regulado por el desarrollo, la expresión de la proteína diana disminuye cuando se induce el transgén o en la etapa de desarrollo cuando se expresa el transgén, respectivamente.

Clones de animales transgénicos

Los clones de los animales transgénicos no humanos descritos en el presente documento pueden producirse de acuerdo con los métodos descritos en Wilmut et al. ((1997) *Nature*, 385: 810 - 813) y las publicaciones PCT Nos. WO 97/07668 y WO 97/07669. En resumen, una célula, por ejemplo, una célula somática del animal transgénico, puede aislarse e inducirse a salir del ciclo de crecimiento y entrar en la fase Go para quedar en reposo. La célula quiescente puede entonces fusionarse, por ejemplo, mediante el uso de impulsos eléctricos, a un oocito enucleado de un animal de la misma especie a partir del cual se aísla la célula quiescente. El oocito reconstruido se cultiva entonces de tal manera que se convierte en una morula o blastocito y luego se transfiere a un animal adoptivo femenino pseudoembarazado. Los descendientes nacidos de este animal adoptivo femenino serán clones del animal del que se aisló la célula, por ejemplo, la célula somática.

Una vez que se produce el animal transgénico, las células del animal transgénico y las células de un animal de control se rastrean para determinar la presencia de una secuencia de ácido nucleico precursor de ARN, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Alternativamente, las células pueden ser rastreadas para determinar si el precursor de ARN se expresa (por ejemplo, mediante procedimientos estándar tales como el análisis por transferencia Northern o la reacción en cadena de la polimerasa en cadena de la transcriptasa inversa (RT-PCR), Sambrook et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)).

Los animales transgénicos pueden ser homocigóticos o heterocigóticos y uno de los beneficios de la invención es que el ARNm diana se degrada efectivamente incluso en heterocigóticos. La presente divulgación proporciona animales transgénicos que portan un transgén en todas sus células, así como animales que portan un transgén en algunas, pero no en todas sus células. Es decir, la divulgación proporciona animales de mosaico. El transgén se puede integrar como un solo transgén o en concatámeros, por ejemplo, tandems cabeza a cabeza o tandems cabeza a cola.

Para una revisión de técnicas que pueden usarse para generar y evaluar animales transgénicos, los expertos en la técnica pueden consultar Gordon (Intel Rev. Cytol. 115: 171-229, 1989), y pueden obtener orientación adicional de, por ejemplo: Hogan et al. "Manipulating the Mouse Embryo" (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1986, Krimpenfort et al., Bio/Technology 9:86, 1991, Palmiter et al., Cell 41: 343, 1985, Kraemer et al., " Genetic Manipulation of the Early Mammalian Embryo ", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1985, Hammer et al., Nature 315: 680, 1985, Purcel et al., Science, 244: 1281, 1986, Wagner Et al., Patente US No. 5.175.385, y Krimpenfort et al., Patente US No. 5.175.384.

Plantas transgénicas

Entre los organismos eucariotas presentados en la divulgación se encuentran plantas que contienen un ácido nucleico exógeno que codifica un precursor de ARN manipulado de la invención.

Por consiguiente, un método de acuerdo con la divulgación comprende hacer una planta que tiene una molécula o construcción de ácido nucleico, por ejemplo, un transgén, descrito en la presente memoria. Las técnicas para introducir ácidos nucleicos exógenos en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas son conocidas en la técnica e incluyen, sin limitación, la transformación mediada por Agrobacterium, la transformación mediada por vectores virales, la electroporación y la transformación de pistolas de partículas, véanse, por ejemplo, las patentes US Nos. 5.204 253 y 6.013, 863. Si se usa un cultivo de células o tejidos como tejido receptor para la transformación, las plantas pueden regenerarse a partir de cultivos transformados por técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Las plantas transgénicas se pueden introducir en un programa de reproducción, por ejemplo, para introducir un ácido nucleico que codifica un polipéptido en otras líneas, para transferir el ácido nucleico a otras especies o para una selección adicional de otros rasgos deseables. Alternativamente, las plantas transgénicas pueden propagarse vegetativamente para aquellas especies susceptibles de tales técnicas. La progenie incluye descendientes de una planta o línea de plantas en particular. La progenie de una planta incluye semillas formadas en F₁, F₂, F₃ y plantas de generación subsiguientes, o semillas formadas en BC₁, BC₂, BC₃ y plantas de generación subsiguientes. Las semillas producidas por una planta transgénica se pueden cultivar y luego autofecundarse (o cruzarse y autofecundarse) para obtener semillas homocigóticas para el ácido nucleico que codifica un nuevo polipéptido.

Un grupo adecuado de plantas incluye dicotiledóneas, tales como cártamo, alfalfa, soja, colza (ácido erúico alto y canola) o girasol. También son adecuadas monocotiledóneas tales como maíz, trigo, centeno, cebada, avena, arroz, mijo, amaranto o sorgo. También son adecuados cultivos de hortalizas o cultivos de raíces tales como patata, brócoli, guisantes, maíz dulce, maíz para palomitas, tomate, judías (incluyendo alubias, habas, judías secas, judías verdes) y similares. También son adecuados los cultivos de frutas como melocotón, pera, manzana, cereza, naranja, limón, pomelo, ciruela, mango y palma. Por lo tanto, la invención tiene uso en una amplia gama de plantas, incluyendo especies de los géneros Anacardium, Arachis, Asparagus, Atropa, Avena, Brassica, Citrus, Citrullus, Capsicum, Carthamus, Cocos, Coffea, Cucumis, Cucurbita, Daucus, Ficus, Glycine, Helianthus, Heterocallis, Hordeum, Hyoscyamus, Lactuca, Linum, Lolium, Lupinus, Lycopersicon, Malus, Manihot, Majorana, Medicago, Nicotiana, Olea, Oryza, Panicum, Pannisetum, Persea, Phaseolus, Pistachia, Pyrus, Prunus, Raphanus, Ricinus, Secale, Senecio, Sinapis, Solarium, Sorgo, Theobromus, Trigonella, Triticum, Vicia, Vitis, Vigna y Zea.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden expresarse en plantas de una manera específica en células o tejidos de acuerdo con los elementos reguladores elegidos para incluir en una construcción de ácido nucleico particular presente en la planta. Las células, tejidos y órganos adecuados para expresar un polipéptido quimérico incluyen, sin limitación, células de óvulos, células centrales, células sinérgicas, cigotos, ovule primordia, nucelos, tegumentos, endotelios, células de gametofitos hembra, embriones, ejes, cotiledones, suspensores, endospermo, capa de la semilla, meristema de tierra, haz vascular, cambium, floema, corteza, meristemas apicales del brote o de rama, meristemas laterales del brote o de la raíz, meristema floral, yemas de hoja, células mesofílicas de la hoja y células epidérmicas de la hoja, involucradas en la formación de la capa cuticular. También son adecuadas células y tejidos cultivados en medios líquidos o en medios semisólidos.

Hongos transgénicos

Otros organismos eucariotas presentados en la divulgación son hongos que contienen una molécula de ácido nucleico exógena que codifica un precursor de ARN manipulado de la invención.

Por consiguiente, un método comprende introducir una molécula de ácido nucleico o una construcción, como se describe en el presente documento, en un hongo. Las técnicas para introducir ácidos nucleicos exógenos en muchos hongos son conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5.252, 726 y 5.070, 020. Los hongos transformados pueden cultivarse mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Tales hongos se pueden usar para introducir un ácido nucleico que codifica un polipéptido en otras cepas fúngicas, para transferir el ácido nucleico a otras especies o para una selección adicional de otros rasgos deseables.

Un grupo adecuado de hongos incluyen levadura de ruptura y levadura de crecimiento, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pombe*, *S. carlsbergensis* y *Candida albicans*. Los hongos filamentosos tales como *Aspergillus* spp. Y *Penicillium* spp. son también útiles.

Composiciones Farmacéuticas

Las moléculas de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas. Tales composiciones incluyen típicamente una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un transgén) que codifica un precursor de ARN manipulado, o el propio ARN precursor, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en la presente memoria, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares, compatibles con la administración farmacéutica. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Una composición farmacéutica se formula para ser compatible con su ruta de administración deseada. Ejemplos de rutas de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, por inhalación, transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. La administración también puede ser oral. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la administración parenteral tales como la aplicación intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; reguladores tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede envasar en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una facilidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro sódico, en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con una o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución filtrada previamente esterilizada de los mismos.

Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un vehículo comestible. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas, por ejemplo cápsulas de gelatina. Las composiciones orales pueden prepararse también utilizando un vehículo fluido para su uso como un enjuague bucal. Pueden incluirse como parte de la composición agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes. Los comprimidos, pastillas, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de

naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel™, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes™; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de una pulverización de aerosol a partir de un recipiente o dispensador a presión que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosa o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, se utilizan en la formulación agentes de penetración apropiados para la barrera que se va a permear. Tales agentes de penetración son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede lograrse mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, bálsamos, geles o cremas, como se conoce generalmente en la técnica.

Los compuestos también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.

En una realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilenoacetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos virales) también pueden usarse como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.522.811.

Es ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de unidad de dosificación tal como se utiliza en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto que se va a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL50/ED50. Se prefieren los compuestos que exhiben altos índices terapéuticos. Aunque pueden utilizarse compuestos que exhiben efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado de diseñar un sistema de liberación que dirija dichos compuestos al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a células no infectadas y, por tanto, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar en la formulación de una gama de dosis para su uso en seres humanos. La dosificación de composiciones está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen un ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en plasma circulante del compuesto o, cuando sea apropiado, del producto polipeptídico de una secuencia diana (por ejemplo, lograr una concentración disminuida del polipéptido) que incluye la CI50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) determinada en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar con mayor precisión dosis útiles en humanos. Los niveles en el plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que contiene una secuencia que codifica un precursor de ARN manipulado, o el propio precursor (es decir, una dosificación eficaz), es una cantidad que inhibe la expresión del polipéptido codificado por el gen diana en al menos 30 por ciento. Los porcentajes más altos de inhibición, por ejemplo, 45, 50, 75, 85, 90 por ciento o más pueden ser preferidos en ciertas realizaciones. Las dosis de ejemplo incluyen cantidades en miligramos o microgramos de la molécula por kilogramo de peso del sujeto o muestra (por ejemplo, aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 500 miligramos por kilogramo, aproximadamente 100 microgramos por kilogramo a aproximadamente 5 miligramos por kilogramo, o aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 50 microgramos por kilogramo. Las

composiciones se pueden administrar una vez por semana durante entre aproximadamente 1 a 10 semanas, por ejemplo, entre 2 a 8 semanas, o entre aproximadamente 3 a 7 semanas, o durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas. El especialista en la técnica apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación y el tiempo necesario para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo pero no limitándose a la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, salud general y/o edad del sujeto y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición puede incluir un solo tratamiento o una serie de tratamientos. En algunos casos puede ser deseable la expresión transitoria del precursor de ARN manipulado. Cuando se incluye un promotor inducible en la construcción que codifica un precursor de ARN manipulado, la expresión es ensayada tras la administración al sujeto de una dosis apropiada de la sustancia utilizada para inducir la expresión.

Se entiende además que las dosis apropiadas de una composición dependen de la potencia de la molécula (la secuencia que codifica el precursor modificado) con respecto a la expresión o actividad que se va a modular. Cuando una o más de estas moléculas se van a administrar a un animal (por ejemplo, un ser humano) para modular la expresión o actividad de un polipéptido o ácido nucleico, un médico, veterinario o investigador puede, por ejemplo, prescribir una dosis relativamente baja primeramente, aumentando posteriormente la dosis hasta que se obtiene una respuesta apropiada. Además, se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto particular dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el género y la dieta del sujeto, el tiempo de administración, la ruta de administración, la tasa de excreción, cualquier combinación de fármacos y el grado de expresión o actividad que se va a modular.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden insertar generalmente en vectores y usarse como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica pueden administrarse a un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase la Patente US 5,328, 470) o mediante inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Chen et al., Proc. Nat. Acad. USA 91: 3054 - 3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que el vehículo de administración génica está incrustado. Alternativamente, cuando el vector de suministro de genes completo se puede producir intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovíricos, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de administración génica.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase o dispensador junto con instrucciones para la administración.

Métodos de tratamiento

La presente invención permite tanto métodos profilácticos como terapéuticos para tratar a un sujeto en riesgo de (o susceptible a) un trastorno o tener un trastorno asociado con expresión o actividad aberrante o no deseada de cualquier gen que se transcribe. Tal como se usa en la presente memoria, el término "tratamiento" se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico a un paciente, o aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido o línea celular aislado de un paciente que tiene un trastorno, una enfermedad o condición, un síntoma de enfermedad o una predisposición hacia una enfermedad con el propósito de curar, sanar, aliviar, alterar, remediar, mejorar, mejorar o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad. Un agente terapéutico puede ser un precursor de ARN manipulado de la invención, o una molécula de ácido nucleico (ADN) que codifica el precursor.

Con respecto a los métodos de tratamiento tanto profilácticos como terapéuticos, tales tratamientos pueden adaptarse o modificarse específicamente, basándose en el conocimiento obtenido sobre el genoma de un sujeto, específicamente sobre una secuencia genética (es decir, un gen mutado) cuya expresión está asociada con la enfermedad. De este modo, se puede diseñar una molécula de la invención, basada en el conocimiento del gen cuya expresión está dirigida, para inhibir la expresión de ese gen como se describe en el presente documento.

De este modo, en un aspecto, la invención permite un método para tratar en un sujeto, un trastorno, por ejemplo, una enfermedad o condición, asociada con una expresión o actividad génica aberrante o no deseada, mediante la administración al sujeto de un ácido nucleico modificado por ingeniería genética. Secuencia que codifica un ARN precursor modificado. Los sujetos en riesgo de un trastorno que es causado o impulsado por la expresión o actividad aberrante o no deseada de un gen pueden identificarse, por ejemplo, con cualquiera o una combinación de ensayos de diagnóstico o pronóstico que son conocidos en la técnica. La administración de un agente profiláctico puede ocurrir antes de la manifestación de síntomas característicos de la aberración, de tal manera que se prevenga una enfermedad o trastorno o, alternativamente, se retrasa en su progresión.

Las moléculas de la invención pueden actuar como nuevos agentes terapéuticos para controlar uno o más de trastornos proliferativos y/o diferenciadores celulares, trastornos asociados con el metabolismo óseo, trastornos inmunes, trastornos hematopoyéticos, trastornos cardiovasculares, trastornos hepáticos, enfermedades virales, dolor o metabolismo.

Ejemplos de trastornos proliferativos y/o diferenciadores celulares incluyen cáncer, por ejemplo, carcinoma, sarcoma, trastornos metastásicos o trastornos neoplásicos hematopoyéticos, por ejemplo, leucemias. Un tumor

metastásico puede surgir de una multitud de tipos de tumores primarios, incluyendo pero no limitados a los de próstata, colon, pulmón, mama y de origen hepático.

Tal como se usan en la presente memoria, los términos cáncer, hiperproliferativo y neoplásico se refieren a células que tienen la capacidad de crecimiento autónomo, es decir, un estado anormal o una condición caracterizada por proliferación rápida del crecimiento celular. Los estados de enfermedad hiperproliferativa y neoplásica pueden categorizarse como patológicos, es decir, caracterizar o constituir un estado patológico, o pueden clasificarse como no patológicos, es decir, una desviación de lo normal pero no asociada con un estado patológico. El término pretende incluir todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados malignamente, independientemente del tipo histopatológico o etapa de invasividad. Las células "hiperproliferativas patológicas" se presentan en estados de enfermedad caracterizados por el crecimiento tumoral maligno. Ejemplos de células hiperproliferativas no patológicas incluyen la proliferación de células asociadas con la reparación de heridas.

Los términos "cáncer" o "neoplasias" incluyen malignidades de los diversos sistemas de órganos, tales como afecciones pulmonares, de mama, tiroides, linfoides, gastrointestinales y genitourinarias, así como adenocarcinomas que incluyen malignidades tales como la mayoría de los cánceres de colon, carcinoma de células renales, cáncer de próstata y/o tumores testiculares, carcinoma de células no pequeñas de pulmón, cáncer de intestino delgado y cáncer de esófago.

El término carcinoma es reconocido en el arte y se refiere a tumores malignos de tejidos epiteliales o endocrinos, incluyendo carcinomas del sistema respiratorio, carcinomas del sistema gastrointestinal, carcinomas del sistema genitourinario, carcinomas testiculares, carcinomas de mama, carcinomas prostáticos, carcinomas del sistema endocrino y melanomas.

Los carcinomas de ejemplo incluyen los que se forman a partir de tejido del cuello del útero, pulmón, próstata, mama, cabeza y cuello, colon y ovario. El término también incluye carcinosarcomas, por ejemplo, que incluyen tumores malignos compuestos de tejidos carcinomatosos y sarcomatosos. Un "adenocarcinoma" se refiere a un carcinoma derivado del tejido glandular o en el que las células tumorales forman estructuras glandulares reconocibles.

El término "sarcoma" está reconocido en la técnica y se refiere a tumores malignos de derivación mesenquimal.

Ejemplos adicionales de trastornos proliferativos incluyen trastornos neoplásicos hematopoyéticos. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término trastornos neoplásicos hematopoyéticos incluye enfermedades que implican células hiperplásicas/neoplásicas de origen hematopoyético, por ejemplo, procedentes de linajes mieloides, linfoides o eritroides, o células precursoras de los mismos. Preferiblemente, las enfermedades surgen de leucemias agudas pobremente diferenciadas, por ejemplo, leucemia eritroblástica y leucemia megacarioblástica aguda. Otros trastornos mieloides de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, leucemia promielocítica aguda (APML), leucemia mielógena aguda (LMA) y leucemia mielógena crónica (CML) (revisado en Vaickus, L. (1991) Crit Rev. en Oncol./ Hemotol 11: 267 - 97); las enfermedades malignas linfoides incluyen, pero no se limitan a, leucemia linfoblástica aguda (LLA) que incluye LLA de Linaje B y LLA de Linaje T, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), leucemia de células pilosas (HLL) y macroglobulinemia de Waldenstrom WM). Otras formas de linfomas malignos incluyen, pero no se limitan a linfoma no Hodgkin y variantes de los mismos, linfomas de células T periféricos, leucemia/linfoma de células T adultas (ATL), linfoma cutáneo de células T (CTCL), leucemia linfocítica granular granulosa), enfermedad de Hodgkin y la enfermedad de Reed-Sternberg

En general, los precursores de ARN manipulados de la invención están diseñados para dirigir genes asociados con trastornos particulares. Ejemplos de tales genes asociados con trastornos proliferativos que pueden ser dirigidos incluyen ras activado, p53, BRCA-1 y BRCA-2. Otros genes específicos que pueden ser dirigidos son aquellos asociados con esclerosis lateral amiotrófica (ALS, por ejemplo, superóxido dismutasa-1 (SOD1)); enfermedad de Huntington (por ejemplo, huntingtina), enfermedad de Parkinson (parkina) y genes asociados con trastornos autosómicos dominantes.

Los ARN manipulados de la invención se pueden utilizar para tratar una variedad de trastornos del sistema inmune, en particular aquellos asociados con la sobreexpresión de un gen o expresión de un gen mutante. Los ejemplos de trastornos o enfermedades hematopoyéticos incluyen, pero no se limitan a, enfermedades autoinmunes (incluyendo, por ejemplo, diabetes mellitus, artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psoriásica), esclerosis múltiple, encefalomiелitis, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis autoinmune, dermatitis (incluyendo dermatitis atópica y dermatitis eczematosa), psoriasis, síndrome de Sjögren, enfermedad de Crohn, úlcera aftosa, iritis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, colitis ulcerosa, asma, asma alérgica, lupus eritematoso cutáneo, escleroderma, vaginitis, proctitis, erupciones medicamentosas, reacciones de reversión de la lepra, eritema nodoso leproso, uveítis autoinmune, encefalomiелitis alérgica, aguda encefalopatía hemorrágica necrotizante, pérdida auditiva bilateral idiopática progresiva neurosensorial, anemia aplásica, anemia de glóbulos rojos puros, trombocitopenia idiopática, policondritis, granulomatosis de Wegener, hepatitis activa crónica, síndrome de Stevens-Johnson, esprue idiopático, liquen plano, enfermedad de Graves, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveítis posterior, y fibrosis pulmonar intersticial), enfermedad de injerto contra huésped, casos de trasplante, y alergias, tales como, la alergia atópica.

Ejemplos de trastornos que implican el corazón o "trastorno cardiovascular" incluyen, pero no se limitan a, una enfermedad, un trastorno o un estado que implican el sistema cardiovascular, por ejemplo, el corazón, los vasos sanguíneos, y/o la sangre. Un trastorno cardiovascular puede ser causado por un desequilibrio en la presión arterial, un mal funcionamiento del corazón, o una oclusión de un vaso sanguíneo, por ejemplo, por un trombo. Ejemplos de

5

tales trastornos incluyen la hipertensión, la aterosclerosis, espasmo de la arteria coronaria, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad arterial coronaria, enfermedad valvular, arritmias, y cardiomiopatías.

Trastornos que pueden tratarse por los métodos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, trastornos asociados con una acumulación en el hígado de tejido fibroso, como la que resulta de un desequilibrio entre la producción y degradación de la matriz extracelular acompañado por el colapso y condensación de fibras

10

preexistentes.

Además, las moléculas de la invención pueden usarse para tratar enfermedades virales, incluyendo pero sin limitarse a hepatitis B, hepatitis C, virus del herpes simple (HSV), VIH-SIDA, virus del polio y virus de la viruela. Las moléculas de la invención se diseñan como se describe en la presente memoria descriptiva para dirigir secuencias expresadas de un virus, mejorando así la actividad viral y la replicación. Las moléculas pueden usarse en el

15

tratamiento y/o diagnóstico de tejido infectado por virus. También, tales moléculas pueden usarse en el tratamiento de carcinoma asociado a un virus, tal como cáncer hepatocelular.

Usos de precursores de ARN manipulados para inducir ARNi

Los precursores de ARN manipulados, introducidos en células u organismos enteros como se describen aquí, darán lugar a la producción de una molécula de ARNsi deseada. Tal molécula de ARNsi se asociará entonces con

20

componentes de proteínas endógenas de la ruta ARNi para unirse a una secuencia de ARNm específica y segmentarla para la escisión y la destrucción. De esta manera, el ARNm a ser dirigido por el ARNsi generado a partir del precursor de ARN manipulado será empobrecido de la célula u organismo, dando lugar a una disminución en la concentración de la proteína codificada por ese ARNm en la célula u organismo.

Por ejemplo, se puede estar tratando de descubrir una molécula pequeña que reduzca la actividad de una quinasa

25

cuya sobreexpresión conduce a una proliferación celular desenfrenada. Esta quinasa se sobreexpresa en una variedad de células cancerosas. Una pregunta clave a determinar es si la disminución de la actividad de esta quinasa en mamíferos adultos tendría efectos deletéreos inesperados. Mediante la expresión de un precursor de ARN manipulado que se dirige a la destrucción por la ruta ARNi, el ARNm que codifica la quinasa a través de los tejidos de un ratón adulto, se pueden determinar los efectos deletéreos de dicho fármaco potencial. Es decir, el

30

Ejemplos

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, los cuales no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplo 1 - Producción de un precursor de ARN manipulados

Para producir un precursor de ARN manipulado que se dirigirá a un gen para luciferasa de luciéARNga para escisión, se examinó la secuencia de la porción codificante del ARNm de luciferasa de luciéARNga para seleccionar una secuencia adecuada. En una posición de más de 100 nucleótidos, pero menos de 300 nucleótidos, 3' al comienzo de la traducción, se encontró inmediatamente la secuencia CGUACGCGGAUACUUCGAUU (SEQ ID NO: 16) después de la secuencia AA. Se eligió esta secuencia dado que cumple los criterios para la selección de un ARNsi. Se diseñó entonces un ARN precursor modificado que incluye esta secuencia (subrayada) como se

40

45

representa a continuación (y se muestra en la Figura 2B):

5'-
GGCAAACGUACGCGGAUACUUCGAUUAGUAAUUACACAUCAUAA-
 UCGAAG UAUCCGCGUACGUUUGCU-3' (SEQ ID NO:2)

Se prepararon secuencias sintéticas de desoxiligonucleótidos que sirven como una plantilla de transcripción in vitro para preparar este precursor de ARN manipulado usando la enzima ARN Polimerasa T7 de acuerdo con los protocolos publicados. A continuación se muestran los dos desoxiligonucleótidos. Los oligonucleótidos contienen la

secuencia del promotor de ARN polimerasa T7 (subrayado en la cadena superior) para facilitar la transcripción in vitro en ARN.

Oligo superior:

5'-
GCGTAATACGACTCACTATAGGCAAACGTACGCGGAATACTTCGAT-
 TAGTAATTACACATCATAATCGAAGTATTCCGCGTACGTTTGCT-3' (SEQ ID
 NO:17)

5 Oligo inferior:

5'-
 TGTAGTCACGTACGCGGAATACTTCGAAGAAACGAGTAATTACTAAAT-
 CGAA GTATTCCGCGTACGTTTGCCTATAGTGAGTCGTATTACGC-3' (SEQ ID
 NO:18)

A continuación, se formó el ADN bicatenario fusionando los dos desoxiligonucleótidos y se transcribió en ARN usando ARN Polimerasa T7. El precursor de ARN manipulado resultante se purificó por medios estándar y después se probó su capacidad para promover la escisión del ARNm diana in vitro en una reacción ARNi estándar.

- 10 En resumen, se preparó ARNm de luciferasa de luciéARNga mediante transcripción in vitro y se marcó radiactivamente utilizando α -³²P-GTP y Guanilil Transferasa como se describió anteriormente (Tuschl et al., (1999) citado supra) para generar un ARNm diana radioactivo. El ARNm diana radioactivo se incubó en una reacción estándar de ARNi in vitro con lisado de embrión de Drosophila y precursor de ARN (ESP) molecular manipulado 50 nM durante 0 y 3 horas como se describió anteriormente (Tuschl et al., (1999) citado supra). Los productos de
- 15 reacción se aislaron y analizaron mediante electroforesis en gel de acrilamida desnaturalizante como se describió anteriormente (Zamore et al., (2000) citado supra). Como se muestra en la Figura 3, el precursor de ARN manipulado indujo la escisión específica de la secuencia del ARNm diana radioactivo (producto de escisión en 5'). Por tanto, se demostró que el precursor media el ARNi. La Fig. 3 muestra también el producto de escisión de ARN de un siARN estándar (también incubado durante 0 y 3 horas), que produjo el mismo producto de escisión en 5' específico de secuencia que el ESP.
- 20

Ejemplo 2 - ARN de precursor de let-7 manipulados ARNi de desencadenamiento asimétricamente in vitro

- Se prepararon dos precursores de ARN let-7 modificados (ESP) en los que el tallo de pre-let-7 (Figuras 4B y 4C) se alteró para contener una secuencia complementaria a la luciferasa de luciéARNga. Debido a que la mayoría de los ARNtss comienzan con uracilo, los ESP se diseñaron de manera que la secuencia luciferasa complementaria
- 25 (luciferasa anti-sentido) comenzó con U. Puesto que los ARNtss pueden ser codificados en el lado 5' o 3' de la horquilla precursora (por ejemplo, en cada tallo) se colocó la secuencia luciferasa anti-sentido (en negrita) en el lado 3' del tallo en un ESP (3' ESP) (Figura 4B) y en el lado 5' en el segundo tallo) (Figura 4C).

- Los ARN de ESP se prepararon como se describe en general en el Ejemplo 1 usando los siguientes pares de oligonucleótidos de ADN para generar plantillas de transcripción de ARN de T7 de cadena sencilla de cadena
- 30 sencilla:

5' - GTAATACGACTCACTATAG - 3' (SEQ ID NO: 19)

5'-

GGCAAATTCGAAGTATTCCGCGTACGTGATGATGTGTAATTACTCACG
TACGCGGAATACTTCGAATTTGCCTATAGTGAGTCGTATTAC-3' (5' ESP)
(SEQ ID NO:20)

5'-

GGCAAATCGTACGCGGAATACTTCGAAAATGATGTGTAATTACTTTTC
GAAGTATTCCGCGTACGATTTGCCTATAGTGAGTCGTATTAC-3' (3' ESP)
(SEQ ID NO:21)

El ARN diana de luciferasa de luciARNga antisentido se ha descrito previamente (A. Nykänen, B. Haley, P.D. Zamore, Cell 107, 309, 2001).

5 Se ensayó la capacidad de cada ESP de dirigir el ARNi específico de la luciferasa en una reacción in vitro frente a un ARNm diana (mostrado esquemáticamente en la Figura 4D) que contenía una porción del ARNm de la luciferasa de luciARNga y una secuencia completamente complementaria a la let-7 (La diana se construyó mediante técnicas estándar y se sintetizó usando ARN Polimerasa T7). Como control, se utilizó un dúplex siARN que contenía la secuencia de luciferasa antisentido (Figura 4A).

10 La FIG. 4E es una autorradiografía que muestra los resultados de un ensayo para determinar si los ESP 5' y 3' pueden promover igualmente la escisión del ARN diana in vitro (las condiciones del ensayo se describen en el Ejemplo 1, excepto que los ESP y el testigo se incubaron durante 0 y 2 horas). Tanto el ESP 3' como el 5' dirigieron la escisión del ARN diana dentro de las secuencias de luciferasa, el mismo sitio se escindió cuando la reacción de ARNi se programó con el ARNsi de control.

Ejemplo 3 Preparación de un transgén que codifica un precursor de ARN manipulado

15 Para preparar un transgén que codifica un precursor modificado para dirigir la destrucción del ARNm de luciferasa en un ratón transgénico que expresa ARNm de luciferasa de luciARNga en todas sus células, la secuencia precursora de ARN manipulada descrita en el Ejemplo 1 se clona por métodos de ADN recombinante estándar en una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un vector que contiene una secuencia promotora expresada constitutivamente y la secuencia de ácido nucleico deseada (transgén) que codifica el precursor de ARN manipulado
20 como se ilustra en la Figura 5. Este vector también contendrá secuencias apropiadas para su introducción en células ES para producir transgénicos por métodos estándar. El transgén resultante expresa el precursor de ARN manipulado en todas las células de un ratón transgénico.

25 El ARN precursor manipulado es luego procesado por Dicer y otros componentes de la maquinaria ARNi para producir un ARNsi dirigido contra el gen luciferasa de luciARNga. Este ARNsi dirige la escisión del ARNm de la luciferasa, dando como resultado una disminución en la expresión del ARNm de la luciferasa en las células del animal.

Pueden usarse los mismos métodos para silenciar otros genes diana, utilizando sistemas de expresión expresados constitutivamente o inducibles en una variedad de animales transgénicos.

Otras realizaciones

30 Debe entenderse que aunque la invención se ha descrito junto con su descripción detallada, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que está definida por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> University of Massachusetts, et al.

35 <120> PRODUCCIÓN IN VIVO DE ARN DE INTERFERENCIA PEQUEÑOS QUE MEDIAN EL SILENCIAMIENTO GÉNICO

<130> 07917-147WO1

<140> PCT/US02/22010

<141> 2002-07-12
 <150> US 60/305,185
 <151> 2001-07-12
 <160> 21

5 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
 <210> 1
 <211> 72
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 1

ggcaaaauuga gguaguaggu uguauaguag uaaauacaca ucauacuaua caaugugcua 60
 gcuuuucuuug cu 72

<210> 2
 <211> 70
 <212> ARN

15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado por vía sintética
 <400> 2

ggcaaacgua cgcggaauac uucgauuagu aaauacacau cauaaucgaa guauuiccgcg 60
 uacguuugcu 70

20 <210> 3
 <211> 70
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

25 <223> Oligonucleótido generado por vía sintética
 <400> 3

ggcaaaugcu ugaagcagcu cuggaguagu aaauacacau cauacuccag agcugcuuca 60
 agcauuugcu 70

<210> 4
 <211> 69

30 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado por vía sintética

	<400> 4	
	ggcaaaugcu ugaagcagcu cuggaguagu aauuuuauc auacuccaga gcugcuucaa gcauuugcu	60 69
	<210> 5	
	<211> 60	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido generado por vía sintética	
	<400> 5	
10	ggcaaaugcu ugaagcagcu cuggaguagg gguacuccag agcugcuuca agcauuugcu 60	
	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido generado por vía sintética	
	<400> 6	
	ucgaaguauu ccgcguacgu g 21	
	<210> 7	
20	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido generado por vía sintética	
25	<400> 7	
	cguacgcgga auacuucgau u 21	
	<210> 8	
	<211> 72	
	<212> ARN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido generado por vía sintética	
	<400> 8	
	ggcaaaucgu acgcggaaua cuucgaaaag uaauuacaca ucauuuucga aguauuccgc guacgauuug cc	60 72
35	<210> 9	

	<211> 72		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
5	<223> Oligonucleótido generado por vía sintética		
	<400> 9		
	ggcaaaauucg aaguaauuccg cguacgugag uaaauacaca ucaucacgua cgcggaauac	60	
	uucgaauuug cc	72	
	<210> 10		
	<211> 70		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido generado por vía sintética		
	<400> 10		
	ggcaaacgta cgcggaatac ttcgattagt aattacacat cataatcgaa gtattccgcg	60	
15	tacgtttgct	70	
	<210> 11		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
20	<220>		
	<223> Oligonucleótido generado por vía sintética		
	<400> 11		
	ggcaaacgta cgcggaatac ttcgattagt aattacacat cataatcgaa gtattccgcg	60	
	tacgtttgct	70	
	<210> 12		
25	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido generado por vía sintética		
30	<400> 12		
	tcgaagtatt ccgcgtacgu u 21		
	<210> 13		
	<211> 4		

<212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ejemplo
 5 <221> características misceláneas
 <222> 2
 <223> n = a, c, g, o u
 <400> 13
 gnra 4
 10 <210> 14
 <211> 4
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> secuencia de ejemplo
 <400> 14
 gggg 4
 <210> 15
 <211> 4
 20 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia de ejemplo
 <400> 15
 25 uuuu 4
 <210> 16
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Oligonucleótido generado por vía sintética
 <400> 16
 cguacgcgga auacuucgau u 21
 <210> 17
 35 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido generado por vía sintética

<400> 17

gcgtaatacg actcactata ggcaaacgta cgcggaatac ttcgattagt aattacacat	60
cataatcgaa gtattccgcg tacgtttgct	90

5 <210> 18

<211> 92

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Oligonucleótido generado por vía sintética

<400> 18

tgtagtcacg tacgcggaat acttcgaaga aacgagtaat tactaaatcg aagtattccg	60
cgtacgtttg cctatagtga gtcgtattac gc	92

<210> 19

<211> 19

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido generado por vía sintética

<400> 19

20 gtaatacgac tcactatag 19

<210> 20

<211> 90

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Oligonucleótido generado por vía sintética

<400> 20

ggcaaattcg aagtattccg cgtacgtgat gatgtgtaat tactcacgta cgcggaatac	60
ttcgaatttg cctatagtga gtcgtattac	90

<210> 21

30 <211> 90

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido generado por vía sintética

ES 2 609 014 T3

<400> 21

ggcaaatcgt acgcggaata cttcgaaaat gatgtgtaat tacttttcga agtattccgc	60
gtacgatttg cctatagtga gtcgtattac	90

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un precursor de ARN manipulado que comprende las etapas de:
 - (a) seleccionar una secuencia de ARN mensajero (ARNm) de un gen diana; y
 - (b) manipular un ARN precursos que comprende
- 5 i) una primera porción de tallo que comprende una secuencia de 18 a 40 nucleótidos que es complementaria a la secuencia de ARNm seleccionada;
- ii) una segunda porción de tallo que comprende una secuencia de 18 a 40 nucleótidos que es suficientemente complementaria a la secuencia de 18 a 40 nucleótidos de la primera porción de tallo para hibridar con la primera porción de tallo para formar un tallo dúplex; y
- 10 iii) una porción de bucle de al menos 4 nucleótidos que conecta las dos porciones de tallo;
- en el que el precursor es capaz de ser procesado por Dicer.
2. Un método in vitro para inducir interferencia de ácido ribonucleico (ARNi) de un gen diana en una célula usando un precursor de ARN manipulado,
- en el que el precursor de ARN manipulado comprende;
- 15 (i) una primera porción de tallo que comprende una secuencia de 18 a 40 nucleótidos que es complementaria a una secuencia de un ARN mensajero (ARNm) del gen diana;
- (ii) una segunda porción de tallo que comprende una secuencia de 18 a 40 nucleótidos que es suficientemente complementaria a la secuencia de 18 a 40 nucleótidos de la primera porción de tallo para hibridar con la primera porción de tallo para formar un tallo dúplex; y
- 20 (iii) una porción de bucle de al menos 4 nucleótidos que conecta las dos porciones de tallo;
- en el que el precursor es capaz de ser procesado por Dicer.
3. Un precursor de ARN manipulado para uso en un método para inducir interferencia de ácido ribonucleico (ARNi) de un gen diana en una célula,
- en el que el precursor de ARN manipulado comprende;
- 25 i) una primera porción de tallo que comprende una secuencia de 18 a 40 nucleótidos que es complementaria a una secuencia de un ARN mensajero (ARNm) del gen diana;
- ii) una segunda porción de tallo que comprende una secuencia de 18 a 40 nucleótidos que es suficientemente complementaria a la secuencia de 18 a 40 nucleótidos de la primera porción de tallo para hibridar con la primera porción de tallo para formar un tallo dúplex; y
- 30 iii) una porción de bucle de al menos 4 nucleótidos que conecta las dos porciones de tallo;
- en el que el precursor es capaz de ser procesado por Dicer.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o un precursor de ARN manipulado como se reivindica en la reivindicación 3, en el que la primera porción de tallo comprende una secuencia de 18 a 30 nucleótidos que es sustancialmente complementaria a la secuencia de ARNm seleccionada y la segunda porción de tallo comprende
- 35 una secuencia de 18 a 30 nucleótidos que es suficientemente complementaria a la secuencia de 18 a 30 nucleótidos de la primera porción de tallo para hibridar con la primera porción de tallo para formar un tallo dúplex.
5. Un método o un precursor de ARN manipulado como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la segunda porción de tallo es totalmente complementaria a la primera porción de tallo.
6. Un método o un precursor de ARN manipulado como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la primera porción de tallo se encuentra o bien en un extremo 5' del precursor de ARN, o en un extremo 3' del precursor de ARN.
- 40 7. Un método o un precursor de ARN manipulado como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la porción de bucle comprende al menos 7 nucleótidos; y opcionalmente en el que la porción de bucle comprende 11 nucleótidos.
- 45 8. Un método o un precursor de ARN manipulado como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la porción de bucle comprende de 4 a 20 nucleótidos.

9. Un método o un precursor de ARN manipulado como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la secuencia del ARNm está localizada:
- a) de 100 a 300 nucleótidos 3' del inicio de la traducción del ARNm; y/o
 - b) en una región 5' no traducida (UTR) o una UTR 3' del ARNm.
- 5 10. Un método o un precursor de ARN manipulado como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:
- a) la primera y la segunda porción de tallo comprenden cada una 22 a 28 nucleótidos; o
 - b) la secuencia de la primera porción de tallo es de 22 a 28 nucleótidos de longitud; y la secuencia de la segunda porción de tallo es de 22 a 28 nucleótidos de longitud; o
- 10 c) la secuencia de la primera porción de tallo es de 18 a 30 nucleótidos de longitud; y la secuencia de la segunda porción de tallo es de 18 a 25 nucleótidos de longitud; o
- d) la secuencia de la primera porción de tallo es de 18 a 25 nucleótidos de longitud; y la secuencia de la segunda porción de tallo es de 18 a 30 nucleótidos de longitud; o
- 15 e) la secuencia de la primera porción de tallo es de 18 a 25 nucleótidos de longitud; y la secuencia de la segunda porción de tallo es de 18 a 25 nucleótidos de longitud; o
- f) la primera y segunda porciones de tallo comprenden cada una el mismo número de nucleótidos; o
 - g) una de las porciones de tallo primera y segunda comprende de 1 a 4 nucleótidos más que la otra porción de tallo.
- 20 11. Un método o un precursor de ARN manipulado como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha primera porción de tallo o dicha segunda porción de tallo comprende además un saliente de 1, 2, 3 o 4 nucleótidos; y en cuyo caso opcionalmente dicho saliente comprende dos uracilos.
12. Un método o un precursor de ARN manipulado como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el gen diana es un gen diana de una célula de mamífero y/o en el que el gen diana es: un gen humano, un gen humano mutante o un gen viral.
- 25 13. Un método o un precursor de ARN manipulado como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el precursor de ARN manipulado es producido por:
- (a) síntesis de un oligonucleótido de ADN que codifica el precursor de ARN manipulado y, opcionalmente, transcripción del oligonucleótido; o
- 30 (b) síntesis de un oligonucleótido de ADN que codifica una porción que se inserta en el tallo dúplex del precursor y que usa enzimas de restricción para construir el precursor ARN manipulado y, opcionalmente, transcripción del oligonucleótido; o
- (c) síntesis de un oligonucleótido ADN que codifica el precursor ARN manipulado y clonación del oligonucleótido ADN en un vector de expresión,
- en el que el precursor de ARN manipulado se suministra opcionalmente a células in vitro o in vivo.
- 35 14. Un método o un precursor de ARN manipulado como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el precursor de ARN manipulado está codificado por una secuencia de ácido nucleico unida operativamente a una secuencia reguladora.
15. Un método o un precursor de ARN manipulado como se reivindica en la reivindicación 14, en el que el ácido nucleico está comprendido en un vector, por ejemplo en el que el vector es un plásmido o vector viral.
- 40 16. Un método o un precursor de ARN manipulado como se reivindica en la reivindicación 14, en el que la secuencia reguladora es constitutiva o inducible.
- 45 **17. Método para inducir la interferencia del ácido ribonucleico (ARNi) como se reivindica en la reivindicación 2 o un precursor de ARN manipulado como se reivindica en la reivindicación 3, en el que el método de inducción de ARNi comprende expresar el precursor de ARN manipulado en una célula, en el que el precursor de ARN manipulado es procesado por la célula para producir un ARNsi dirigido que silencia selectivamente el gen diana usando la propia ruta de ARNi de la célula.**

18. Un precursor de ARN manipulado como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 3 a 17, para uso en un método profiláctico o terapéutico de tratamiento de un sujeto en riesgo de o que tiene un trastorno asociado con expresión o actividad génica aberrante o no deseada.

5 19. Un precursor de ARN manipulado para uso como se reivindica en la reivindicación 18, en el que el precursor de ARN manipulado se dirige a un gen o genes asociados con esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington o enfermedad de Parkinson.

FIG. 1

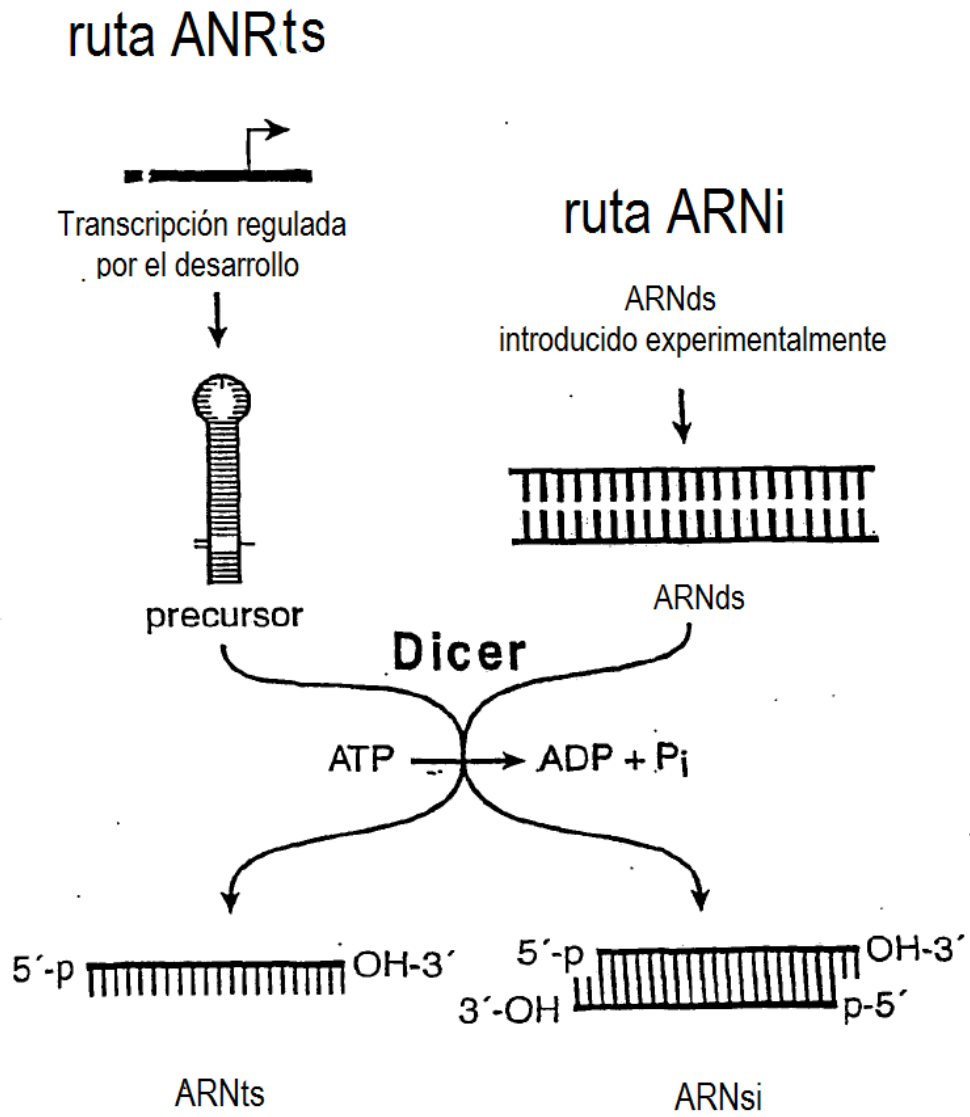


FIG. 2A

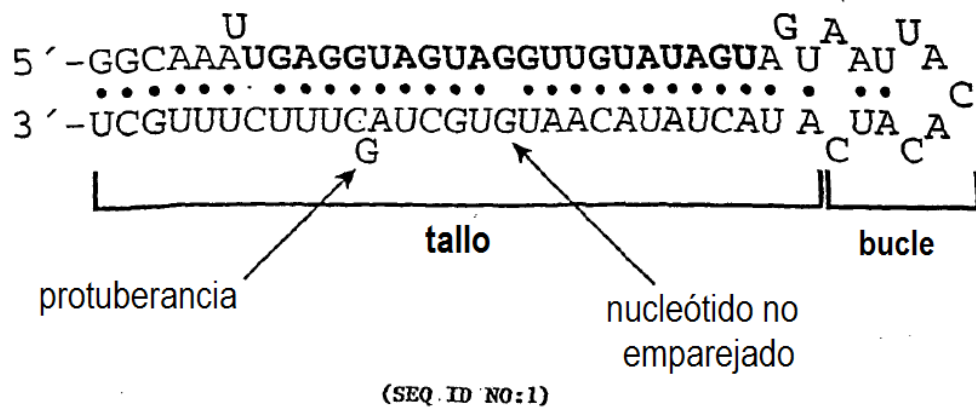


FIG. 2B

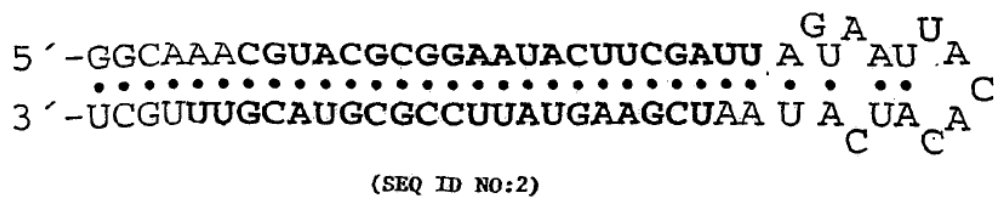


FIG. 2C

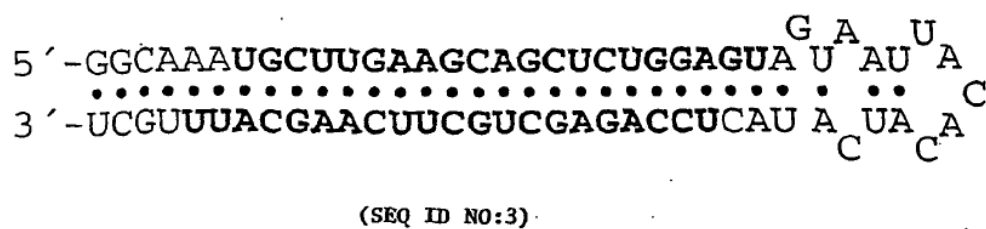


FIG. 2D

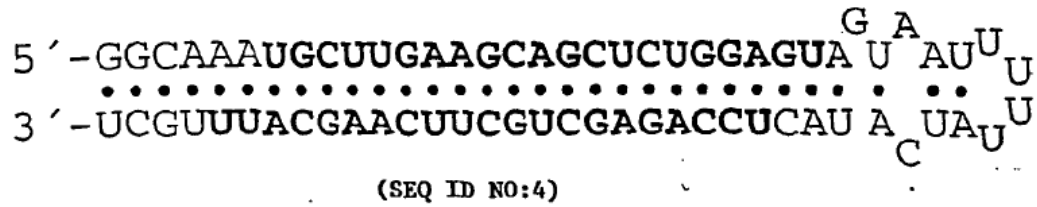


FIG. 2E

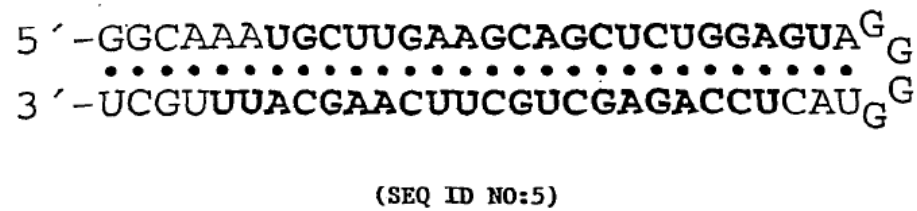


FIG. 3

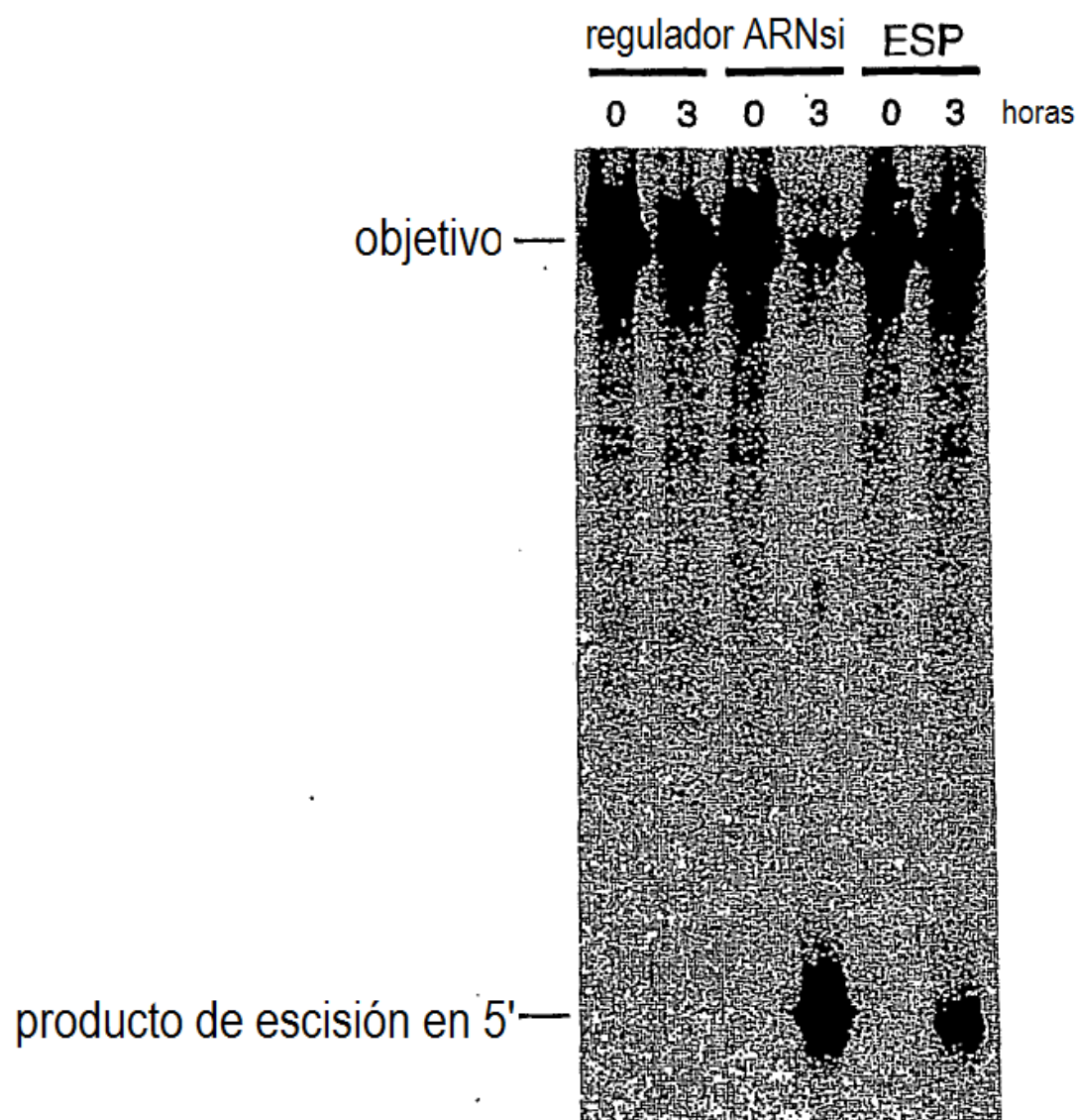


FIG. 4D

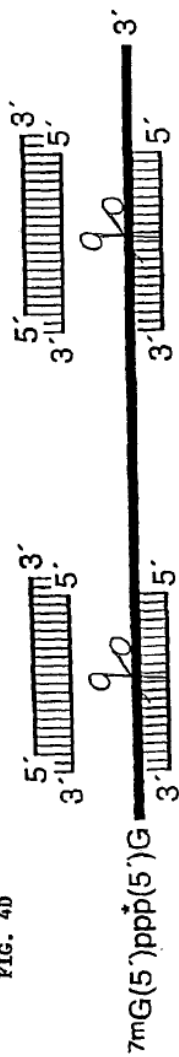
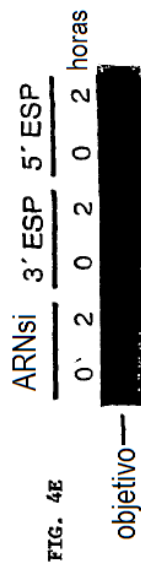


FIG. 4A

ARNsi

5' -UCGAAGUAUUCGCGUACGUG-3' (SEQ ID NO:6)
 3' -UUAGCUUCAUAAGGCGCAUGC-5' (SEQ ID NO:7)



precusores de ARNts manipulados

FIG. 4B

5' -GGCAAAUUCGUAACGCGGAUAUACUUCGAAAU U AU A G A U
 3' -CCGUUUAAGCUAAGCGCCUUAUGAAGCUUUU A UA C C C

(SEQ ID NO:8)

5' -GGCAAAUUCGUAAGUAUUCGCGUACGUGA U AU A G A U
 3' -CCGUUUAAGCUAUAAGGCGCAUGCACU A UA C C C

(SEQ ID NO:9)

producto de
 escisión en 5'—

FIG. 5

