

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 695**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2004 PCT/US2004/017130**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2004 WO04111191**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2004 E 04753864 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 1633767**

54 Título: **Métodos y composiciones para controlar la eficacia de la silenciamiento del ARN**

30 Prioridad:

02.06.2003 US 475386 P

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

14.05.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS (100.0%)
One Beacon Street 31st Floor
Boston, MA 02108, US**

72 Inventor/es:

**ZAMORE, PHILLIP D. y
TANG, GUILIANG**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 712 695 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).

DESCRIPCION

Métodos y composiciones para controlar la eficacia de la silenciación del ARN

Antecedentes de la invención

5 El ARN de interferencia (ARNi) en animales y eucariotas basales, la extinción en hongos y el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) en plantas son ejemplos de una amplia familia de fenómenos llamados colectivamente silenciamiento de ARN (Kooter et al. 1999; Li y Ding 2001; Matzke et al. 2001; Vaucheret et al. 2001; Waterhouse et al. 2001; Hannon 2002; Plasterk 2002). Las características unificadoras de los fenómenos de silenciamiento de ARN son la producción de pequeños ARN (21-26 nt) que actúan como determinantes de especificidad para la expresión de genes de regulación descendente (Hamilton y Baulcombe 1999; Hammond et al. 2000; Parrish et al. 2000; Zamore et al. 2000; Djikeng et al. 2001; Parrish and Fire 2001; Tijsterman et al. 2002) y el requisito de uno o más miembros de la familia de proteínas Argonauta (o proteínas PPD, nombradas por sus dominios PAZ y Piwi característicos) (Tabara et al., 1999; Fagard et al., 2000; Hammond et al., 2001; Hutvágner y Zamore, 2002; Kennerdell et al., 2002; Martínez et al., 2002a; Pal-Bhadra et al., 2002; Williams y Rubin, 2002).

15 Los ARN pequeños son generados en animales por miembros de la familia Dicer de endonucleasas específicas de ARN de doble cadena (ARNbc) (Bernstein et al. 2001; Billy et al. 2001; Grishok et al. 2001; Ketting et al. 2001). Los miembros de la familia Dicer son proteínas grandes y multidominio que contienen helicase ARN putativa, PAZ, dos ribonucleasas III en tándem (RNasa III) y uno o dos dominios de unión a ARNbc. Se considera que los dominios de la RNasa III en tándem median en la división endonucleolítica del ARNbc en pequeños ARN interferentes (ARNsi), los mediadores del ARNi. En *Drosophila* y mamíferos, los ARNip, junto con una o más proteínas Argonaute, forman un complejo proteína-ARN, el complejo silenciador inducido por ARN (RISC), que media la división de los ARN diana en secuencias con una gran complementariedad con el ARNip (Hammond et al. 2000, 2001; Zamore et al. 2000; Elbashir et al. 2001a, b, c; Nykanen et al. 2001; Hutvágner y Zamore 2002; Martínez et al. 2002a).

25 Además de las proteínas Dicer y Argonaute, se requieren genes de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) para silenciamiento de ARN en *Caenorhabditis elegans* (Smardon et al. 2000; Sijen et al. 2001), *Neurospora crassa* (Cogoni y Macino 1999) y *Dictyostelium discoideum* (Martens et al. 2002), pero probablemente no para ARNi en *Drosophila* o mamíferos (Celotto y Graveley 2002; Chiu y Rana 2002; Holen et al. 2002; Martínez et al. 2002b; Schwarz et al. 2002; Roignant et al. 2003). En las plantas, los PTGS iniciados por transgenes que sobreexpresan un ARNm endógeno también requieren un RdRP putativo, SGS2 (SDE1; Dalmay et al. 2000; Mourrain et al. 2000), aunque los transgenes diseñados para generar ARNbc evitan este requisito (Beclin et al. 2002). De manera similar, el silenciamiento inducido por virus que se replican a través de un ARNbc intermedio (silenciamiento génico inducido por virus, VIGS) no requiere SGS2 (Dalmay et al. 2000).

35 Dicer en animales y CARPEL FACTORY (CAF, un homólogo de Dicer) en plantas también generan microARN (miARN), 20-24-nt, ARN de cadena sencilla que se cree que regulan la expresión de ARNm endógeno (Lee et al. 1993; Reinhart et al. 2000, 2002; Grishok et al. 2001; Hutvágner et al. 2001; Ketting et al. 2001; Lagos-Quintana et al. 2001, 2002; Lau et al. 2001; Lee y Ambros 2001; Mourelatos et al. 2002; Park et al. 2002). Los miARN se producen mediante la división de Dicer de los transcritos de ARN precursores de espacio troncal (pre-miARN); el miARN puede residir en el lado 5' o 3' del vástago bicatenario (Lee et al. 1993; Pasquinelli et al. 2000; Lagos-Quintana et al. 2001; Lau et al. 2001; Lee y Ambros 2001). En los animales, los pre-miARN se transcriben como transcripciones primarias más largas (pri-miARN) que se procesan en el núcleo en estructuras compactas y plegadas (pre-miARN), y luego se exportan al citoplasma, donde son cortados por Dicer para producir miARN maduros. (Lee et al. 2002). Los miARN animales son solo parcialmente complementarios a sus ARNm objetivo; esta complementariedad parcial se ha propuesto para hacer que los ARNip repriman la traducción de sus dianas, en lugar de la división de dianas directa por la ruta ARNi (para una revisión, ver Ruvkun 2001; Hutvágner y Zamore 2002). Los miARN de plantas tienen una complementariedad mucho mayor con los ARNm celulares y se ha propuesto que median la división del ARN diana mediante un mecanismo similar a ARNi (Llave et al. 2002b; Rhoades et al. 2002).

Resumen de la invención

50 La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que los extractos de germen de trigo recapitulan muchas de las características clave del silenciamiento de ARN en plantas. Usando este sistema in vitro, se muestra que, en las plantas, las enzimas similares a Dicer y dependientes de ATP escinden el ARNbc en pequeños ARN que tienen la estructura de los ARNip. A diferencia de los embriones de *Drosophila* o las células de mamíferos, las plantas convierten el ARNbc en dos clases distintas de ARNip, ARNip largos y cortos. Los estudios con inhibidores indican que una enzima similar a Dicer genera cada clase de ARNip. Además, una actividad de RdRP de trigo puede sintetizar ARNbc utilizando ARN de una sola cadena exógena como plantilla sin un cebador exógeno, y este ARNbc se convierte preferentemente en ARNip largos.

Los extractos de germen de trigo también contienen un RISC endógeno programado con un miARN que puede dirigir la división eficaz de la secuencia del ARNm de *Arabidopsis PHAVOLUTA* (PHV) de tipo silvestre, pero no la de una mutante dominante del PHV descrito anteriormente. Curiosamente, la complementariedad exacta entre el miARN y el ARNm objetivo no es necesaria para que el miARN dirija la división eficiente del objetivo. Se encontró que un ARNip que contiene tres emparejamientos incorrectos con su ARNm diana es al menos tan potente como un ARNip con una complementariedad perfecta con la misma secuencia diana, lo que demuestra que los emparejamientos incorrectos per se no bloquean la división del objetivo. Más bien, la posición y secuencia específicas de ARNip: emparejamientos incorrectos de ARN objetivo determinan si permiten o interrumpen el ARNi. Se propone que tres o cuatro emparejamientos incorrectos entre un miARN (o la cadena guía de un dúplex siARN) y su ARN objetivo, colocados adecuadamente de manera que aún permitan la división del ARNm, facilitan la liberación del ARN objetivo escindido del complejo RISC, aumentando así la tasa de recambio de enzimas. En particular, la eficiencia de la división es mayor cuando un par de bases G:U, también conocido como G:U oscilante, está presente cerca del extremo 5' o 3' del complejo formado entre el miARN y el objetivo. La comprensión del mecanismo natural por el cual los miARN eficientemente median el ARNi en las plantas permite el diseño de agentes de ARNi mejorados para su uso en la mediación de ARNi no solo en plantas, sino en eucariotas (en particular, en mamíferos).

De acuerdo con lo anterior, la presente divulgación presenta métodos para mejorar la eficacia de un agente de ARNi que comprende sustituir al menos un nucleótido terminal con un nucleótido que no forma un par de bases de Watson-Crick con el nucleótido correspondiente en un ARNm diana. La divulgación también proporciona composiciones que comprenden agentes de ARNi, por ejemplo, ARNsi, pre-miARN, ARNhc, que tienen sustituciones de nucleótidos para mejorar la eficacia de ARNi, así como vectores, transgenes y células que comprenden los agentes de ARNi. Además, se presenta una enzima similar a Dicer, un extracto que comprende la enzima y métodos para su uso. Se proporcionan kits para uso en la mediación de ARNi que comprenden las composiciones de la divulgación. También se proporcionan métodos terapéuticos y composiciones farmacéuticas. La presente invención se define en y por las reivindicaciones adjuntas.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Los ARN pequeños de *Arabidopsis thaliana* forman dos clases de tamaño distintas. (A) Distribución de tamaño de pequeños clones de ARN. (B) Composición de la secuencia de los extremos 5' del ARN pequeño clonado en función de la longitud.

Figura 2. El ARNbc se divide en dos clases discretas de ARNip auténtico en extractos de plantas. (A) Tras la incubación en extracto de germen de trigo, 32P-ARNbc se dividió en pequeños ARN en una reacción altamente procesiva, como en el lisado de embrión de mosca. (B) 32P-ARNbc se dividió en extracto de germen de trigo en dos tamaños de ARN pequeños, de ~21-nt y 24-25-nt de longitud, en relación con los marcadores de ARN radiomarcados con 5'-32P sintéticos. (C) 32P-ARNbc se dividió en extracto de coliflor en dos tamaños de ARN pequeños. (D) La producción eficiente de ARN pequeño en extracto de germen de trigo requirió ATP. El ATP, el fosfato de creatina y la creatina quinasa fueron incluidos (+ATP) u omitidos (-ATP) de la reacción. (E) Los ARN pequeños producidos in vitro en extracto de germen de trigo son de doble cadena. 32Ei P-ARNbc se incubó en extracto de germen de trigo o lisado de embrión de *Drosophila*, se desproteinizó a temperatura ambiente sin extracción orgánica y luego se analizó por filtración en gel en una columna Superdex 200 HR. Se indican las posiciones máximas de los estándares de ARNip sintéticos de cadena doble y simple. (F) Esquema para detectar extremos sobresalientes 3' en ARN pequeños mediante protección de nucleasa. (G) Los ARN pequeños producidos por la incubación de 32P-ARNbc en extracto de germen de trigo tienen extremos sobresalientes ~2-nt 3' y un cuerpo central de doble cadena, características de los productos de la división de Dicer. Los corchetes indican los productos de digestión de nucleasas. Las posiciones de los marcadores de tamaño radiomarcados 5'-32P se indican a la izquierda. Los marcadores 3'-fosforilados se generaron haciendo reaccionar los ARN sintéticos una base más larga que la indicada con periodato, seguida de una eliminación [beta], produciendo un ARN una base más corta, pero con un fosfato 3' en lugar de un hidroxilo.

Figura 3. Las dos clases de ARNip de plantas son producidas por diferentes enzimas. (A, B) 32P-ARNbc se incubó en lisado de embrión de *Drosophila* o extracto de germen de trigo durante 3 horas en presencia de concentraciones crecientes de dúplex de ARNip de 21 nt o 25 nt, luego se analizó mediante electroforesis en gel desnaturalizante y se cuantificó. La concentración de ARNip se presenta en micromoles de nucleótido por litro para permitir la comparación de las diferentes longitudes de dúplex de ARNip utilizados. La eficiencia relativa de las reacciones se determinó ajustando los datos a una sola exponencial y comparando la constante de velocidad. (A) Los dúplex de ARNip de 21 nt (círculos rellenos) son inhibidores más eficaces de *Drosophila* Dicer que los dúplex de ARNip de 25 nt (círculos abiertos). (B) La producción de ARNip de 25 nt en extracto de germen de trigo (cuadrados) se inhibió de manera más eficiente mediante un dúplex de ARNip sintético de 25 nt (símbolos rojos) que mediante un dúplex de ARNip de 21 nt (símbolos negros), pero la producción de 21-nt ARNip (círculos) no fue inhibido por ninguno de los ARNip sintéticos. (C) el competidor de ARNbc inhibió la producción de ARNip de 25 nt (cuadrados negros) y 21-nt ARNip (círculos rojos) en extracto de germen de trigo. La producción de ARNip en lisado de embrión de *Drosophila* (círculos azules) también

fue inhibida por el competidor de ARNdc, pero en menor medida, quizás reflejando una mayor concentración de Dicer en lisado de embrión de *Drosophila* que en extracto de germen de trigo.

Figura 4. El extracto de germen de trigo contiene una actividad RdRP. El ARN de cadena sencilla del tamaño indicado y la estructura de la cubierta se incubó en extracto de germen de trigo durante 3 horas en presencia de ATP, CTP, GTP y α -32P-UTP. Los productos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante.

Figura 5. Caracterización de la actividad RdRP del trigo. (A) El extracto de germen de trigo, pero no el lisado de embrión de *Drosophila*, contiene una actividad RdRP que puede extender un cebador. La punta de flecha indica el producto de extensión del cebador producido cuando se incubó un cebador de ARN antisentido de 21 nt, pero no un cebador de sentido, en el extracto de germen de trigo con un ARN de cadena sencilla de 592 nt. Los cebadores corresponden a los nucleótidos 511-532 de la plantilla de ARN. (B) Producción dependiente de RdRP de ARN pequeños en extracto de germen de trigo. Las concentraciones crecientes de un ARNm de luciferasa *Photinus pyralis* (Pp) de 2.7 kb desencadenaron la producción de pequeños ARN radiomarcados con 32P en extracto de germen de trigo cuando los ribonucleótidos trifosfatos (incluyendo α -32P-UTP), pero no cuando 3'-deoxi GTP y 3'-deoxi CTP se incluyeron en la reacción. (C) La producción de ARN pequeños recién sintetizados se inhibió más eficazmente por un dúplex de ARNip sintético de 25 nt (círculos abiertos) que por un dúplex de ARNip sintético de 21 nt (cuadrados abiertos).

Figura 6. miR165/166 en extracto de germen de trigo. (A) Un ortólogo de trigo de miR165 o miR166 está presente en el extracto de germen de trigo. Análisis cuantitativo de hibridación Northern utilizando estándares de concentración de ARN de miR165 sintético, ARN de miR165 antisentido y ARN total preparado a partir de 30 μ l de extracto de germen de trigo o lisado de embrión de *Drosophila*. (B) Cuantificación de los datos en A. Círculos cerrados, estándares de miR165 sintéticos; círculo abierto, ARN extraído de 30 μ l de extracto de germen de trigo. La línea muestra un ajuste lineal de los cuatro estándares de concentración más altos. (C) Esquema de las dianas de ARN, que indican las secuencias de las regiones complementarias de miR165/166 de PHV de tipo silvestre y ARNm mutantes de phv, miR165, miR166, y las cadenas antisentido de ARNip usadas en la figura 7C.

Figura 7. Una nucleasa de trigo endógena escinde eficientemente los ARN diana de PHV de tipo silvestre pero no mutantes. (A) Cuando se incubó en extracto de germen de trigo, el ARN diana radiomarcado en 5' que contenía secuencias de PHV de tipo silvestre se dividió dentro de las secuencias de PHV complementarias de miR165 y miR166. Por el contrario, un ARN diana mutante de G \rightarrow A se dividió ineficientemente. (B) Cuantificación de los datos en A. (Círculos) Secuencias de PHV de tipo silvestre; (cuadrados) secuencias mutantes; (símbolos rellenos) ARN objetivo de longitud completa; (símbolos abiertos) producto de división 5'. La diferencia en las tasas de división es de ~14 veces. (C) Análisis de la división de PHV en una reacción de ARNi in vitro programada con dúplex de ARNip y lisado de embrión de *Drosophila*. La identidad de la cadena antisentido del dúplex de ARNip y la diana de ARN utilizada se indica sobre el gel y se describe en la FIG. 6C.

Figura 8. Cuantificación de la fracción del ARNm diana dividida por ARNip que tiene una complementariedad perfecta con el objetivo versus ARNip que tiene dos no coincidentes con el objetivo (miR 165 ARNip).

Descripción detallada

La presente divulgación se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que los extractos de germen de trigo, introducidos para el estudio de la traducción y la translocación de proteínas en la década de 1970 (Roberts y Paterson 1973), recapitulan muchas de las características clave del silenciamiento de ARN en plantas. Usando este sistema in vitro, los presentes inventores han demostrado que, en las plantas, las enzimas similares a Dicer y dependientes de ATP escinden el ARNbc en pequeños ARN que tienen la estructura de los ARNsi. A diferencia de los embriones de *Drosophila* o las células de mamíferos, las plantas convierten el ARNbc en dos clases distintas de ARNip, largos (por ejemplo, 21-22 nucleótidos) y cortos (por ejemplo, 24-25 nucleótidos) ARNip. Los estudios con inhibidores indican que una segunda enzima similar a Dicer funciona en las plantas para generar cada clase de ARNip. Los presentes inventores también han demostrado que una actividad de RdRP de trigo puede sintetizar ARNbc utilizando ARN de cadena simple exógena como plantilla sin un cebador exógeno, y que este ARNbc se convierte preferentemente en ARNip largos.

Finalmente, se demuestra que los extractos de germen de trigo contienen un RISC endógeno programado con un miARN. Este complejo de miARN endógeno tiene información de secuencia suficiente para dirigir la división eficiente de la secuencia de ARNm de PHA VOLUTA (PHV) de *Arabidopsis* de tipo silvestre, pero no la de un mutante de PHV dominante descrito previamente que perturba el desarrollo de la hoja. Basado en un entendimiento del mecanismo por el cual los miARN dirigen los ARNi en las plantas, los nuevos ARNip pueden ser diseñados para regular los ARNi en las plantas. Más importante aún, los ARNip pueden diseñarse, por ejemplo, basándose en la secuencia de varios miARN eucarióticos, tales ARNip que tienen utilidad en la mediación de ARNi en mamíferos, y particularmente en humanos.

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para mejorar la eficacia de un agente de ARNi, que implica sustituir al menos un nucleótido terminal del agente de ARNi con un nucleótido que no forma un par de bases Watson-Crick con el correspondiente nucleótido en un ARNm diana, tal que la eficacia es mejorada.

- 5 En una realización, el nucleótido sustituido forma un par de bases oscilantes G:U con el ARNm diana. En una realización preferida, la sustitución es una sustitución $A \rightarrow G$, formando G un par de bases oscilante G:U con una U en el ARNm diana correspondiente. En otra realización preferida, la sustitución es una sustitución $C \rightarrow U$, formando la U un par de bases oscilante G:U con una G en el ARNm diana correspondiente.

- 10 En una realización, el nucleótido terminal está dentro de 5 o menos nucleótidos desde el extremo 5' del agente de ARNi. En una realización relacionada, el nucleótido terminal está dentro de 5 o menos nucleótidos desde el extremo 3' del agente de ARNi.

- 15 En una realización, al menos dos nucleótidos terminales están sustituidos. En realizaciones preferidas, los dos nucleótidos terminales sustituidos están en el extremo 5' del agente de ARNi o en el extremo 3' del agente de ARNi. En otra realización preferida, un primer nucleótido terminal sustituido está en el extremo 5' del agente de ARNi y un segundo nucleótido terminal sustituido está en el extremo 3' del agente de ARNi.

En una realización, al menos tres, cuatro o cinco nucleótidos terminales están sustituidos.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un agente de ARNi que tiene al menos un nucleótido terminal del agente de ARNi sustituido con un nucleótido que forma un par de bases oscilantes G:U con el nucleótido correspondiente en un ARNm diana.

- 20 En una realización de este aspecto de la divulgación, la sustitución es una sustitución $A \rightarrow G$, formando G un par de bases oscilante G:U con una U en el ARNm diana correspondiente. En otra realización, la sustitución es una sustitución $C \rightarrow U$, formando la U un par de bases oscilante G:U con una G en el ARNm diana correspondiente.

En otras realizaciones, el nucleótido terminal está dentro de 5 o menos nucleótidos desde el extremo 5' del agente de ARNi o desde el extremo 3' del agente de ARNi.

- 25 En otras realizaciones más, al menos dos nucleótidos terminales están sustituidos. En realizaciones preferidas, los dos nucleótidos terminales sustituidos están en el extremo 5' del agente de ARNi o en el extremo 3' del agente de ARNi. En otras realizaciones preferidas, un primer nucleótido terminal sustituido está en el extremo 5' del agente de ARNi y un segundo nucleótido terminal sustituido está en el extremo 3' del agente de ARNi.

En otras realizaciones, al menos tres, cuatro o cinco nucleótidos terminales están sustituidos.

- 30 En diversas realizaciones de este aspecto de la divulgación, el agente de ARNi se sintetiza químicamente, se sintetiza enzimáticamente, o se deriva de un precursor diseñado por ingeniería genética.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para mejorar el silenciamiento de un ARNm diana, que comprende poner en contacto una célula que tiene una ruta de ARNi con el agente de ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en condiciones tales que se mejore el silenciamiento.

- 35 En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un método para mejorar el silenciamiento de un ARNm diana en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende el agente de ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera que se mejora el silenciamiento.

- 40 En ciertas realizaciones de la divulgación, se proporcionan composiciones que comprenden los agentes de ARNi de la divulgación formulados para facilitar la entrada del agente en una célula. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los agentes de ARNi de la divulgación.

En otras realizaciones, la presente divulgación proporciona pre-miARN de ingeniería que comprende el agente de ARNi de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y vectores que codifican el pre-miARN.

En realizaciones relacionadas, la presente divulgación proporciona un pri-miARN que comprende el pre-miARN de la divulgación, y un vector que codifica el pre-miARN.

- 45 En otras realizaciones más, la divulgación proporciona un pequeño ARN de horquilla (ARNhc) que comprende una secuencia de nucleótidos idéntica a cualquiera de los agentes de ARNi de la presente divulgación, un vector que codifica el ARNhc y un transgén que codifica el ARNhc.

La presente divulgación proporciona además una célula, por ejemplo, una célula de mamífero, preferiblemente una célula humana, que comprende los vectores de la divulgación.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una enzima de tipo Dicer de *Arabidopsis thaliana* aislada capaz de dividir un sustrato ARNbc largo en productos de ARNbc de 24-25 nucleótidos cortos, siendo inhibida la actividad de dicha enzima en presencia de dichos productos de ARNbc. En un aspecto relacionado, la presente divulgación proporciona un método para generar un agente ARNi de 24-25 nucleótidos de longitud, que comprende incubar un sustrato de ARNbc con la enzima de la divulgación, de manera que se genere el agente. También se proporciona un extracto libre de células de *Arabidopsis thaliana* que comprende la enzima de la divulgación. En un aspecto relacionado, se proporciona un método para generar un agente ARNi de 24-25 nucleótidos de longitud, que comprende incubar un sustrato de ARNbc con el extracto de la divulgación, de manera que se genere el agente.

En una cierta realización de la presente divulgación, se proporciona un kit para uso en la mediación de ARNi, que comprende la enzima o el extracto de la divulgación, e instrucciones para su uso.

Para que la divulgación pueda entenderse más fácilmente, primero se definen ciertos términos.

El término “nucleósido” se refiere a una molécula que tiene una base de purina o pirimidina unida covalentemente a un azúcar ribosa o desoxirribosa. Los nucleósidos ejemplares incluyen adenosina, guanosina, citidina, uridina y timidina. Nucleósidos ejemplares adicionales incluyen inosina, 1-metil inosina, pseudouridina, 5,6-dihidrouridina, ribotimidina, ²N-metilguanosina y ^{2,2}N,N-dimetilguanosina (también conocidos como nucleósidos “raros”). El término “nucleótido” se refiere a un nucleósido que tiene uno o más grupos fosfato unidos en enlaces éster a la fracción azúcar. Los nucleótidos ejemplares incluyen nucleósidos monofosfatos, difosfatos y trifosfatos. Los términos “polinucleótido” y “molécula de ácido nucleico” se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a un polímero de nucleótidos unidos por un enlace fosfodiéster entre los átomos de carbono 5' y 3'.

El término “ARN” o “molécula de ARN” o “molécula de ácido ribonucleico” se refiere a un polímero de ribonucleótidos. El término “ADN” o “molécula de ADN” o molécula de ácido desoxirribonucleico “se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos. El ADN y el ARN se pueden sintetizar naturalmente (por ejemplo, mediante la replicación del ADN o la transcripción del ADN, respectivamente). El ARN puede ser modificado post-transcripcionalmente. El ADN y el ARN también se pueden sintetizar químicamente. El ADN y el ARN pueden ser de cadena sencilla (es decir, ARNmc y ADNmc, respectivamente) o de múltiples cadenas (por ejemplo, de doble cadena, es decir, ARNbc y ADNdc, respectivamente). “ARNm” o “ARN mensajero” es un ARN de cadena sencilla que especifica la secuencia de aminoácidos de una o más cadenas polipeptídicas. Esta información se traduce durante la síntesis de proteínas cuando los ribosomas se unen al ARNm.

Como se usa en el presente documento, el término “ARN interferente pequeño” (“ARNip”) (también denominado en la técnica “ARN interferentes cortos”) se refiere a un ARN (o análogo de ARN) que comprende entre aproximadamente 10-50 nucleótidos (o análogos de nucleótidos), que es capaz de dirigir o mediar la interferencia de ARN. Preferiblemente, un ARNip comprende entre aproximadamente 15-30 nucleótidos o análogos de nucleótidos, más preferiblemente entre aproximadamente 16-25 nucleótidos (o análogos de nucleótidos), incluso más preferiblemente entre aproximadamente 18-23 nucleótidos (o análogos de nucleótidos), e incluso más preferiblemente entre aproximadamente 19-22 nucleótidos (o análogos de nucleótidos) (por ejemplo, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos o análogos de nucleótidos). El término ARNip “corto” se refiere a un ARNip que comprende ~21 nucleótidos (o análogos de nucleótidos), por ejemplo, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos. El término ARNip largo se refiere a un ARNip que comprende ~24-25 nucleótidos, por ejemplo, 23, 24, 25 o 26 nucleótidos. Los ARNip cortos pueden, en algunos casos, incluir menos de 19 nucleótidos, por ejemplo, 16, 17 o 18 nucleótidos, siempre que el ARNip más corto retenga la capacidad de mediar el ARNi. Del mismo modo, los ARNip largos pueden, en algunos casos, incluir más de 26 nucleótidos, siempre que el ARNip más largo retenga la capacidad de mediar ARNi sin procesamiento adicional, por ejemplo, procesamiento enzimático, a un ARNip corto.

El término “análogo de nucleótido” o “nucleótido alterado” o “nucleótido modificado” se refiere a un nucleótido no estándar, que incluye ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos no naturales. Los análogos de nucleótidos preferidos se modifican en cualquier posición para alterar ciertas propiedades químicas del nucleótido, pero conservan la capacidad del análogo de nucleótido para realizar su función prevista. Los ejemplos de posiciones del nucleótido que se pueden derivar incluyen la posición 5, por ejemplo, 5-(2-amino) propil uridina, 5-bromo uridina, 5-propino uridina, 5-propenil uridina, etc.; la posición 6, por ejemplo, 6-(2-amino) propil uridina; la posición 8 para adenosina y/o guanosinas, por ejemplo, 8-bromo guanosina, 8-cloro guanosina, 8-fluoroguanosina, etc. Los análogos de nucleótidos también incluyen nucleótidos de deaza, por ejemplo, 7-deaza-adenosina; nucleótidos modificados con O y N (por ejemplo, alquilados, por ejemplo, N6-metil adenosina, o como se conoce de otro modo en la técnica); y otros análogos de nucleótidos modificados heterocíclicamente, como los descritos en Herdewijn, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 2000 ago. 10(4):297-310.

Los análogos de nucleótidos también pueden comprender modificaciones a la porción de azúcar de los nucleótidos. Por ejemplo, el grupo 2' OH puede reemplazarse por un grupo seleccionado de H, OR, R, F, Cl, Br, I, SH, SR, NH₂,

NHR, NR₂, COOR u OR, en donde R está sustituido o alquilo C₁-C₆ no sustituido, alquenoilo, alquinoilo, arilo, etc. Otras posibles modificaciones incluyen las descritas en las patentes de EE.UU. Números 5,858,988 y 6,291,438.

El grupo fosfato del nucleótido también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo uno o más de los oxígenos del grupo fosfato con azufre (por ejemplo, fosforotioatos), o realizando otras sustituciones que permitan al nucleótido realizar su función deseada, tal como se describe en, por ejemplo, Eckstein, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2000 Abr. 10(2): 117-21, Rusckowski et al. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2000 Oct. 10(5): 333-45, Stein, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2001 Oct. 11(5): 317-25, Vorobjev et al. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2001 11 de abril (2): 77-85, y Pat. U.S. No. 5,684,143. Algunas de las modificaciones mencionadas anteriormente (por ejemplo, modificaciones del grupo fosfato) disminuyen preferiblemente la velocidad de hidrólisis de, por ejemplo, polinucleótidos que comprenden dichos análogos in vivo o in vitro.

El término "oligonucleótido" se refiere a un polímero corto de nucleótidos y/o análogos de nucleótidos. El término "análogo de ARN" se refiere a un polinucleótido (por ejemplo, un polinucleótido sintetizado químicamente) que tiene al menos un nucleótido alterado o modificado en comparación con un ARN correspondiente no modificado o no modificado, pero que conserva la misma naturaleza o función similar a la correspondiente sin alterar o sin modificar ARN. Como se discutió anteriormente, los oligonucleótidos pueden estar enlazados con enlaces que resultan en una menor tasa de hidrólisis del análogo de ARN en comparación con una molécula de ARN con enlaces fosfodiéster. Por ejemplo, los nucleótidos del análogo pueden comprender metilendiol, etilenol, oximetiltio, oxieltio, oxicarboniloxi, fosfordiamidato, fosforamidato y/o enlaces de fosforotioato. Los análogos de ARN preferidos incluyen ribonucleótidos y/o desoxirribonucleótidos modificados en estructura principal y/o azúcar. Dichas alteraciones o modificaciones pueden incluir además la adición de material no nucleotídico, tal como al extremo(s) del ARN o internamente (en uno o más nucleótidos del ARN). Un análogo de ARN solo necesita ser lo suficientemente similar al ARN natural para que pueda mediar (mediar) la interferencia del ARN.

Como se usa en el presente documento, el término "interferencia de ARN" ("ARNi") se refiere a una degradación intracelular selectiva de ARN. El ARNi se produce en las células de forma natural para eliminar los ARN extraños (por ejemplo, los ARN virales). El ARNi natural procede a través de fragmentos divididos del ARNdc libre que dirige el mecanismo de degradación a otras secuencias de ARN similares. Alternativamente, el ARNi puede ser iniciado por la mano del hombre, por ejemplo, para silenciar la expresión de los genes diana.

Un agente de ARNi que tiene una cadena que es "secuencia suficientemente complementaria a una secuencia de ARNm diana para dirigir la interferencia de ARN específica (ARNi)" significa que la cadena tiene una secuencia suficiente para desencadenar la destrucción del ARNm diana por la maquinaria o proceso de ARNi.

El término "fosforilado" significa que al menos un grupo fosfato está unido a un compuesto químico (por ejemplo, orgánico). Los grupos fosfato se pueden unir, por ejemplo, a proteínas o a fracciones de azúcar mediante la siguiente reacción: grupo hidroxilo libre + donador de fosfato → enlace éster fosfato. El término "5' fosforilado" se usa para describir, por ejemplo, polinucleótidos u oligonucleótidos que tienen un grupo fosfato unido por enlace éster al hidroxilo C5 del azúcar 5' (por ejemplo, la 5' ribosa o desoxirribosa, o un análogo del mismo). Los mono, di y trifosfatos son comunes. También se pretende que estén incluidos dentro del alcance de la presente divulgación los análogos de grupos fosfato que funcionan de la misma o similar manera que los grupos mono-, di- o trifosfato encontrados en la naturaleza (véase, por ejemplo, análogos ejemplificados).

Como se usa en el presente documento, el término "ARN aislado" (por ejemplo, "ARNip aislado" o "precursor de ARNip aislado") se refiere a moléculas de ARN que están sustancialmente libres de otro material celular o medio de cultivo cuando se producen mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libres de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetizan químicamente.

El término "in vitro" tiene su significado reconocido en la técnica, por ejemplo, que involucra reactivos o extractos purificados, por ejemplo, extractos celulares. El término "in vivo" también tiene su significado reconocido en la técnica, por ejemplo, que involucra células vivas, por ejemplo, células inmortalizadas, células primarias, estirpes celulares y/o células en un organismo.

Como se usa en este documento, el término "transgén" se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico, que se inserta mediante un 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" también significa 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 diseñados para expresarse en un organismo transgénico, por ejemplo, animal, que es en parte o enteramente heterólogo, es decir, extraño, al animal transgénico, u homólogo a un gen endógeno del animal transgénico, pero que está diseñado para insertarse en el genoma del animal en una ubicación que difiere de la del gen natural. Un transgén incluye uno o más promotores y cualquier otro ADN, como los intrones, necesarios para la expresión de la secuencia de ácido nucleico seleccionada, todos operativamente vinculados a la secuencia seleccionada, y pueden incluir una secuencia potenciadora.

Un gen “involucrado” en un trastorno incluye un gen, cuya expresión o función normal o aberrante afecta o causa una enfermedad o trastorno o al menos un síntoma de dicha enfermedad o trastorno.

La frase “examinar la función de un gen en una célula u organismo” se refiere a examinar o estudiar la expresión, actividad, función o fenotipo que surge de ella.

5 Varias metodologías de la presente divulgación incluyen un paso que implica comparar un valor, nivel, rasgo, característica, propiedad, etc. a un “control adecuado”, referido indistintamente en este documento como un “control apropiado”. Un “control adecuado” o “control apropiado” es cualquier control o estándar familiar para un experto en la técnica útil para fines de comparación. En una realización, un “control adecuado” o “control apropiado” es un valor, nivel, rasgo, característica, propiedad, etc. determinado antes de realizar una metodología ARNi, como se describe aquí. Por ejemplo, se puede determinar una tasa de transcripción, un nivel de ARNm, una tasa de traducción, un nivel de proteína, una actividad biológica, una característica o propiedad celular, un genotipo, un fenotipo, etc., antes de introducir un agente de ARNi de la divulgación en una célula u organismo. En otra realización, un “control adecuado” o “control apropiado” es un valor, nivel, rasgo, característica, propiedad, etc. determinado en una célula u organismo, por ejemplo, una célula u organismo de control o normal, que exhibe, por ejemplo, rasgos normales. En otra realización más, un “control adecuado” o “control apropiado” es un valor, nivel, rasgo, característica, propiedad, etc. predefinidos.

Varios aspectos de la divulgación se describen con más detalle en las siguientes subsecciones.

I. Moléculas de ARN

La presente divulgación presenta “agentes de ARNi”, métodos para hacer dichos agentes de ARNi y métodos (por ejemplo, investigación y/o métodos terapéuticos) para usar dichos agentes de ARNi. Los agentes de ARNi pueden ser moléculas de ARNsi, moléculas precursoras (por ejemplo, moléculas precursoras modificadas por ingeniería genética) que se procesan en moléculas de ARNsi, o moléculas (por ejemplo, moléculas de ADN) que codifican, por ejemplo, moléculas precursoras (por ejemplo, moléculas precursoras modificadas por ingeniería genética).

Las moléculas de ARNip ejemplares tienen una longitud de aproximadamente 10-50 o más nucleótidos. Preferiblemente, la molécula de ARNip tiene una longitud de aproximadamente 15-45 o 15-30 nucleótidos. Más preferiblemente, la molécula de ARNip tiene una longitud de aproximadamente 16-25 o 18-23 nucleótidos. Las moléculas de ARNip de la divulgación comprenden además al menos una cadena que tiene una secuencia que es “suficientemente complementaria” a una secuencia de ARNm diana para dirigir la interferencia de ARN específica (ARNi), como se define aquí, es decir, la cadena tiene una secuencia suficiente para desencadenar la destrucción del ARNm diana por la maquinaria o el proceso de ARNi. Dicha cadena puede denominarse una cadena antisentido en el contexto de una molécula ds-ARNip. La molécula de ARNip puede diseñarse de modo que cada residuo sea complementario a un residuo en la molécula diana. Preferiblemente, sin embargo, la molécula de ARNip está diseñada de tal manera que el emparejamiento de bases modificado, en particular, el emparejamiento de bases G:U (es decir, el emparejamiento de bases “oscilantes” de G:U) se produce entre la cadena de la molécula de ARNip que media el ARNi y el ARNm diana.

En realizaciones adicionales, pueden hacerse sustituciones dentro de la molécula para aumentar la estabilidad y/o mejorar la actividad de procesamiento de dicha molécula. Las sustituciones pueden hacerse dentro de la cadena o pueden hacerse para residuos en los extremos de la cadena. Preferiblemente, sin embargo, las sustituciones no se realizan en la parte central de la cadena, ya que se ha determinado que la secuencia de esta parte de la cadena es esencial para efectuar la división del ARNm diana correspondiente. El término 5' es, lo más preferiblemente, fosforilado (es decir, comprende un grupo fosfato, difosfato o trifosfato). El extremo 3' de un ARNip puede ser un grupo hidroxilo, aunque no hay ningún requisito para un grupo hidroxilo 3' cuando el agente activo es una molécula de ARNip-mc.

La reacción de división del ARN objetivo guiada por ARNip es altamente específica de secuencia. En general, los ARNip que contienen secuencias de nucleótidos idénticas a una porción del gen diana se prefieren para la inhibición. Sin embargo, no se requiere una identidad de secuencia del 100% entre el ARNip y el gen diana para practicar la presente divulgación. Por lo tanto, la divulgación tiene la ventaja de poder tolerar variaciones de secuencia que podrían esperarse debido a mutación genética, polimorfismo de cepa o divergencia evolutiva. Por ejemplo, también se ha encontrado que las secuencias de ARNip con inserciones, deleciones y mutaciones puntuales relativas a la secuencia diana son eficaces para la inhibición. Alternativamente, las secuencias de ARNip con sustituciones o inserciones de análogos de nucleótidos pueden ser eficaces para la inhibición.

Además, no todas las posiciones de un ARNip contribuyen igualmente al reconocimiento de objetivos. Los emparejamientos incorrectos en el centro del ARNip son los más críticos y, en esencia, eliminan la división del ARN objetivo. En contraste, los nucleótidos 3' del ARNip no contribuyen significativamente a la especificidad del reconocimiento del objetivo. En particular, los residuos 3' de la secuencia de ARNip que es complementario al ARN diana (por ejemplo, la secuencia guía) no son críticos para la división del ARN diana.

La identidad de secuencia puede determinarse mediante la comparación de secuencias y los algoritmos de alineación conocidos en la técnica. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico (o de dos secuencias de aminoácidos), las secuencias se alinean con fines de comparación óptimos (por ejemplo, se pueden introducir espacios en la primera secuencia o la segunda secuencia para una alineación óptima). Los nucleótidos (o residuos de aminoácidos) en las posiciones correspondientes de nucleótidos (o aminoácidos) se comparan. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = # de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100), opcionalmente penalizando la puntuación por el número de brechas introducidas y/o longitud de espacios introducidos.

La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr utilizando un algoritmo matemático. En una realización, la alineación generada sobre una cierta porción de la secuencia alineada que tiene suficiente identidad, pero no sobre porciones que tienen un bajo grado de identidad (es decir, una alineación local). Un ejemplo preferido, no limitativo, de un algoritmo de alineación local utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl Acad Sci. USA 87: 2264-68, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl Acad Sci. USA 90: 5873-77. Dicho algoritmo está incorporado en los programas BLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10.

En otra realización, la alineación se optimiza introduciendo espacios apropiados y el porcentaje de identidad se determina a lo largo de las secuencias alineadas (es decir, una alineación con espacios). Para obtener alineaciones con espacios para fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. En otra realización, la alineación se optimiza introduciendo espacios apropiados y el porcentaje de identidad se determina a lo largo de toda la longitud de las secuencias alineadas (es decir, una alineación global). Un ejemplo no limitativo preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación global de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) que forma parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede usar una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4.

Más del 90% de identidad de secuencia, por ejemplo, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o incluso 100% de identidad de secuencia, entre una cadena del agente ARNi y se prefiere la porción del gen diana. Alternativamente, el agente de ARNi puede definirse funcionalmente como una secuencia de nucleótidos (o secuencia de oligonucleótidos) que es capaz de hibridar con una parte del transcrito del gen objetivo (por ejemplo, NaCl 400 mM, PIPES 40 mM pH 6.4, EDTA 1 mM, 50°C o hibridación a 70°C durante 12-16 horas, seguido de lavado). Las condiciones de hibridación preferidas adicionales incluyen la hibridación a 70°C en 1x SSC o 50°C en 1x SSC, 50% de formamida seguido de lavado a 70°C en 0.3xSSC o hibridación a 70°C en 4xSSC o 50°C en 4xSSC, 50% formamida seguido de lavado a 67°C en 1xSSC. La temperatura de hibridación para los híbridos de una longitud inferior a 50 pares de bases debería ser de 5-10°C menos que la temperatura de fusión (T_m) del híbrido, donde la T_m se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para híbridos de menos de 18 pares de bases de longitud, $T_m(^{\circ}\text{C}) = 2 (\# \text{ de bases A + T}) + 4 (\# \text{ de bases G + C})$. Para híbridos de 18 a 49 pares de bases de longitud, $T_m(^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6 (\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41 (\% \text{G+C}) - (600/\text{N})$, donde N es el número de bases en el híbrido, y $[\text{Na}^+]$ es la concentración de iones de sodio en el tampón de hibridación ($[\text{Na}^+]$ para 1xSSC = 0.165 M). Ejemplos adicionales de condiciones de rigurosidad para la hibridación de polinucleótidos se proporcionan en Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, capítulos 9 y 11, y Current Protocols in Molecular Biology, 1995, F.M. Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4. La longitud de las secuencias de nucleótidos idénticas puede ser al menos aproximadamente 10, 12, 15, 17, 20, 22, 25, 27, 30, 32, 35, 37, 40, 42, 45, 47 o 50 bases.

En un aspecto preferido, las moléculas de ARN de la presente divulgación se modifican para mejorar la estabilidad en suero o en medio de crecimiento para cultivos celulares. Con el fin de mejorar la estabilidad, los residuos 3' pueden estabilizarse contra la degradación, por ejemplo, pueden seleccionarse de manera que estén formados por nucleótidos de purina, particularmente nucleótidos de adenosina o guanosina. Alternativamente, la sustitución de los nucleótidos de pirimidina por análogos modificados, por ejemplo, la sustitución de uridina por 2'-desoxitimidina es tolerada y no afecta la eficiencia de la interferencia de ARN. Por ejemplo, la ausencia de un hidroxilo 2' puede aumentar significativamente la resistencia a la nucleasa de los agentes de ARN en el medio de cultivo de tejidos.

En una realización especialmente preferida de la presente divulgación, la molécula de ARN puede contener al menos un análogo de nucleótido modificado. Los análogos de nucleótidos pueden ubicarse en posiciones donde la actividad específica del objetivo, por ejemplo, la actividad mediadora del ARNi no se efectúa sustancialmente, por ejemplo, en una región en el extremo 5' y/o el extremo 3' de la molécula de ARN. Particularmente, los extremos pueden estabilizarse incorporando análogos de nucleótidos modificados.

Los análogos de nucleótidos preferidos incluyen ribonucleótidos modificados con azúcar y/o estructura principal (es decir, incluyen modificaciones a la cadena principal de fosfato-azúcar). Por ejemplo, los enlaces fosfodiéster del ARN

natural pueden modificarse para incluir al menos uno de un heteroátomo de nitrógeno o azufre. En los ribonucleótidos modificados de la cadena principal, el grupo fosfoéster que se conecta a los ribonucleótidos adyacentes se reemplaza por un grupo modificado, por ejemplo, de grupo fosfotioato. En los ribonucleótidos modificados con azúcar preferidos, el grupo OH 2' se reemplaza por un grupo seleccionado de H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ u ON, en donde R es alquilo, alqueno C₁-C₆, o alquino y halo es F, Cl, Br o I.

También se prefieren los ribonucleótidos modificados con nucleobase, es decir, ribonucleótidos, que contienen al menos una nucleobase no natural en lugar de una nucleobase natural. Las bases pueden ser modificadas para bloquear la actividad de la adenosina desaminasa. Las nucleobases modificadas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, uridina y/o citidina modificada en la posición 5, por ejemplo, 5-(2-amino)propil uridina, 5-bromo uridina; adenosina y/o guanosinas modificadas en la posición 8, por ejemplo, 8-bromo guanosina; nucleótidos de deaza, por ejemplo, 7-deaza-adenosina; Son adecuados los nucleótidos O y N alquilados, por ejemplo, N6-metil adenosina. Cabe señalar que las modificaciones anteriores pueden ser combinadas.

El ARN puede producirse enzimáticamente o por síntesis orgánica parcial/total, cualquier ribonucleótido modificado puede introducirse por síntesis enzimática u orgánica in vitro. En una realización, un agente de ARNi se prepara químicamente. Los métodos para sintetizar moléculas de ARN son conocidos en la técnica, en particular, los métodos de síntesis química descritos en Verma y Eckstein (1998) *Annul Rev. Biochem.* 67:99-134. En otra realización, un agente de ARNi se prepara enzimáticamente. Por ejemplo, un ARNip dc puede prepararse por procesamiento enzimático de un largo ARN dc que tiene suficiente complementariedad con el ARNm objetivo deseado. El procesamiento del ARNbc largo se puede realizar in vitro, por ejemplo, utilizando lisados celulares apropiados y los ARNip dc pueden purificarse posteriormente mediante electroforesis en gel o filtración en gel. El ARNip dc se puede desnaturalizar de acuerdo con metodologías reconocidas en la técnica. En una realización de ejemplo, el ARN puede purificarse a partir de una mezcla por extracción con un disolvente o resina, precipitación, electroforesis, cromatografía o una combinación de los mismos. Alternativamente, el ARN se puede utilizar con ninguna purificación o purificación mínima para evitar pérdidas debido al procesamiento de la muestra. Alternativamente, los ARN de cadena sencilla también pueden prepararse mediante transcripción enzimática a partir de plantillas de ADN sintético o a partir de plásmidos de ADN aislados de bacterias recombinantes. Típicamente, se usan polimerasas ARN de fago tales como ARN polimerasa T7, T3 o SP6 (Milligan y Uhlenbeck (1989) *Methods Enzymol.* 180:51-62). El ARN puede secarse para almacenamiento o disolverse en una solución acuosa. La solución puede contener tampones o sales para inhibir la hibridación y/o promover la estabilización de las cadenas individuales.

En una realización, el ARNm diana de la divulgación especifica la secuencia de aminoácidos de una proteína celular (por ejemplo, una proteína nuclear, citoplásmica, transmembrana o asociada a membrana). En otra realización, el ARNm diana de la divulgación especifica la secuencia de aminoácidos de una proteína extracelular (por ejemplo, una proteína de matriz extracelular o una proteína secretada). Como se usa en el presente documento, la frase "especifica la secuencia de aminoácidos" de una proteína significa que la secuencia de ARNm se traduce en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con las reglas del código genético. Las siguientes clases de proteínas se enumeran con fines ilustrativos: proteínas del desarrollo (por ejemplo, moléculas de adhesión, inhibidores de ciclina quinasa, miembros de la familia Wnt, miembros de la familia Pax, miembros de la familia de hélices aladas, miembros de la familia Hox, citoquinas/linfoquinas y sus receptores, crecimiento/diferenciación) factores y sus receptores, neurotransmisores y sus receptores; proteínas codificadas por oncogenes (por ejemplo, ABLI, BCLI, BCL2, BCL6, CBFA2, CBL, CSFIR, ERBA, ERBB, EBRB2, ETSI, ETSI, ETV6, FGR, FOS, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MDM2, MLL, MYB, MYC, MYCLI, MYCN, NRAS, PIM I, PML, RET, SRC, TALI, TCL3, y YES); proteínas supresoras de tumores (por ejemplo, APC, BRCA1, BRCA2, MADH4, MCC, NF I, NF2, RB I, TP53 y WTI); y enzimas (por ejemplo, sintasas y oxidasas CAC, desaturasas ACP e hidroxilasas, piroforilasas ADP-glucosa, ATPasas, alcohol deshidrogenasas, amilasas, amiloglucosidasas, catalasas, celulasas, sintasas de calcona, quitinasas, ciclooxigenasas, descarboxilasas, dextriinasas, polimerasas ADN y ARN, galactosidasas, glucanasas, glucosa oxidasas, almidón sintasas granulosas, GTPasas, helicasas, hemicelulasas, integrasas, inulinasas, invertasas, isomerasas, quinasas, lactasas, lipasas, lisozimas, sintasas nopalina, sintasas octopina, pectinesterasas, peroxidasas, fosfatasa, fosfolipasas, fosforilasas, fitasas, sintasas reguladores del crecimiento de las plantas, poligalacturonasas, proteinasas y peptidasas, pulanasas, recombinasas, transcriptasas inversas, RUBISCO, topoisomerasas y xilanasas).

En un aspecto preferido de la divulgación, la molécula de ARNm diana de la divulgación especifica la secuencia de aminoácidos de una proteína asociada con una afección patológica. Por ejemplo, la proteína puede ser una proteína asociada a un patógeno (por ejemplo, una proteína viral involucrada en la inmunosupresión del hospedador, la replicación del patógeno, la transmisión del patógeno o el mantenimiento de la infección) o una proteína hospedadora que facilita la entrada de el patógeno en el huésped, el metabolismo del fármaco por el agente patógeno o el huésped, la replicación o integración del genoma del agente patógeno, el establecimiento o propagación de la infección en el huésped o el ensamblaje de la próxima generación de agentes patógenos. Alternativamente, la proteína puede ser una proteína asociada a un tumor o una proteína asociada a una enfermedad autoinmunitaria.

En una realización, la molécula de ARNm diana de la divulgación especifica la secuencia de aminoácidos de una proteína endógena (es decir, una proteína presente en el genoma de una célula u organismo). En otra realización, la molécula de ARNm diana de la divulgación especificó la secuencia de aminoácidos de una proteína heteróloga

expresada en una célula recombinante o un organismo alterado genéticamente. En otra realización, la molécula de ARNm diana de la divulgación especificó la secuencia de aminoácidos de una proteína codificada por un transgén (es decir, una construcción génica insertada en un sitio ectópico en el genoma de la célula). En otra realización más, la molécula de ARNm diana de la divulgación especifica la secuencia de aminoácidos de una proteína codificada por un genoma de patógeno que es capaz de infectar una célula o un organismo del que se deriva la célula.

Al inhibir la expresión de tales proteínas, se puede obtener información valiosa sobre la función de dichas proteínas y los beneficios terapéuticos que se pueden obtener de dicha inhibición.

En una realización, los agentes de ARNi se sintetizan in vivo, in situ o in vitro. La ARN polimerasa endógena de la célula puede mediar la transcripción in vivo o in situ, o la ARN polimerasa clonada puede usarse para la transcripción in vivo o in vitro. Para la transcripción de un transgén in vivo o un constructo de expresión, se puede usar una región reguladora (por ejemplo, promotor, potenciador, silenciador, donante de empalme y aceptor, poliadenilación) para transcribir el agente de ARNi. La inhibición puede ser dirigida por transcripción específica en un órgano, tejido o tipo celular; estimulación de una condición ambiental (por ejemplo, infección, estrés, temperatura, inductores químicos); y/o transcripción de ingeniería en una etapa de desarrollo o edad. Un organismo transgénico que expresa un agente de ARNi a partir de un constructo recombinante puede producirse introduciendo el constructo en un cigoto, una célula madre embrionaria u otra célula multipotente derivada del organismo apropiado.

II. ARN de horquilla corta (RNAhc)

En ciertas realizaciones destacadas, la presente divulgación presenta shRNA que pueden procesarse en ARNip, por ejemplo, mediante la maquinaria de ARNi endógeno de una célula. En contraste con los dúplex de ARNip cortos, los ARN de horquilla corta (ARNhc) imitan a los precursores naturales de los ARNm y entran en la parte superior de la ruta del ARNi. Por esta razón, se cree que los ARNhc median el ARNi de manera más eficiente al ser alimentados a través de toda la ruta natural del ARNi.

1. Precursores de ARN diseñados por ingeniería que generan ARNip

Los precursores de miARN de origen natural (pre-miARN) tienen una sola cadena que forma un vástago dúplex que incluye dos porciones que generalmente son complementarias, y un espacio que conecta las dos porciones del vástago. En los pre-miARN típicos, el vástago incluye una o más protuberancias, por ejemplo, nucleótidos adicionales que crean un "espacio" de un solo nucleótido en una porción del vástago, y/o uno o más nucleótidos no apareados que crean un espacio en la hibridación de las dos porciones del tallo entre sí. Los ARN de horquilla corta, o los precursores de ARN diseñados por ingeniería genética, de la divulgación son construcciones artificiales basadas en estos pre-ARNmi de origen natural, pero que están diseñados para entregar los ARNip deseados.

En los ARNhc, o ARN precursores modificados por ingeniería genética, del presente divulgan una parte del tallo dúplex que es una secuencia de ácido nucleico que es complementaria (o antisentido) del ARNm diana. Por lo tanto, los precursores de ARN diseñados incluyen un tallo dúplex con dos porciones y un espacio que conecta las dos porciones del tallo. Las dos porciones del tallo son de aproximadamente 18 o 19 a aproximadamente 25, 30, 35, 37, 38, 39 o 40 o más nucleótidos de longitud. Cuando se usa en células de mamíferos, la longitud de las porciones del tallo debe ser inferior a aproximadamente 30 nucleótidos para evitar provocar respuestas no específicas como la ruta del interferón. En células no mamíferas, el tallo puede tener más de 30 nucleótidos. De hecho, el tallo puede incluir secciones mucho más grandes complementarias al ARNm objetivo (hasta e incluyendo el ARNm completo). Las dos porciones del vástago dúplex deben ser suficientemente complementarias para hibridarse para formar el vástago dúplex. Por lo tanto, las dos partes pueden ser, pero no necesariamente, ser totalmente o perfectamente complementarias. Además, las dos porciones del vástago pueden tener la misma longitud, o una porción puede incluir una saliente de 1, 2, 3 o 4 nucleótidos. Los nucleótidos sobresalientes pueden incluir, por ejemplo, uracilos (Nosotros), por ejemplo, todos nosotros. El espacio en los ARNhc o los precursores de ARN diseñados puede diferir de las secuencias naturales del pre-ARNm modificando la secuencia del espacio para aumentar o disminuir el número de nucleótidos apareados, o reemplazando la totalidad o parte de la secuencia del espacio con un tetrabucle u otras secuencias del espacio. Por lo tanto, el espacio en los ARNhc o los precursores de ARN diseñados puede tener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más, por ejemplo, 15 o 20, o más nucleótidos de longitud.

Los ARNhc de la divulgación incluyen las secuencias del dúplex de ARNip deseado. El dúplex de ARNip deseado, y por lo tanto las dos porciones de tallo en el precursor de ARN diseñado, se seleccionan por métodos conocidos en la técnica. Estos incluyen, pero no están limitados a, la selección de una secuencia de 18, 19, 20, 21 nucleótidos, o más, de la secuencia del ARNm del gen diana de una región de 100 a 200 o 300 nucleótidos en el lado 3' del comienzo de la traducción. En general, la secuencia se puede seleccionar de cualquier parte del ARNm del gen objetivo, como la 5' UTR (región no traducida), la secuencia codificante o la 3' UTR. Esta secuencia puede seguir opcionalmente inmediatamente después de una región del gen objetivo que contiene dos nucleótidos AA adyacentes. Los dos últimos nucleótidos de la secuencia de 21 o más nucleótidos se pueden seleccionar para que sean UU (de modo que la cadena antisentido del ARNip comienza con UU). Esta secuencia de 21 o más nucleótidos se usa para crear una parte de un tallo dúplex en el precursor de ARN diseñado. Esta secuencia puede reemplazar una parte del tallo de una secuencia

de tipo pre-ARNtp de tipo silvestre, por ejemplo, enzimáticamente, o se incluye en una secuencia completa que se sintetiza. Por ejemplo, se pueden sintetizar oligonucleótidos de ADN que codifican todo el precursor de ARN modificado por ingeniería de espacio troncal, o que codifican solo la parte que se inserta en el tallo dúplex del precursor, y usar enzimas de restricción para construir el constructo de precursor de ARN diseñado, por ejemplo, de un pre-stRNA de tipo silvestre.

Los precursores de ARN diseñados incluyen en el tallo dúplex las 21-22 secuencias de nucleótidos del ARNip que se desean producir in vivo. Por lo tanto, la parte del tallo del precursor de ARN diseñado incluye al menos 18 o 19 pares de nucleótidos correspondientes a la secuencia de una parte exónica del gen cuya expresión debe reducirse o inhibirse. Los dos nucleótidos 3' que flanquean esta región del tallo se eligen para maximizar la producción del ARNip a partir del precursor de ARN diseñado, y para maximizar la eficacia del ARNip resultante en la orientación del ARNm correspondiente para su destrucción por ARNi in vivo y en vitro.

Otra característica definitoria de estos precursores de ARN diseñados es que, como consecuencia de su longitud, secuencia y/o estructura, no inducen secuencias de respuestas no específicas, como la inducción de la respuesta del interferón o la apoptosis, o que inducen un menor nivel de dicha secuencia de respuestas no específicas que el ARN bicatenario largo (> 150 pb) que se ha utilizado para inducir ARNi. Por ejemplo, la respuesta del interferón es activada por un ARNbc más largo que 30 pares de bases.

2. Transgenes que codifican los precursores de ARN diseñados

Los nuevos precursores de ARN diseñados pueden sintetizarse mediante métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado (como los disponibles comercialmente en Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Estos precursores de ARN sintéticos y modificados pueden usarse directamente como se describe a continuación o clonarse en vectores de expresión por métodos conocidos en el campo. Los precursores de ARN diseñados 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. El suministro in vitro incluye métodos conocidos en la técnica, tales como electroporación y lipofección.

Para lograr concentraciones intracelulares de la molécula de ácido nucleico suficientes para suprimir la expresión de ARNm endógenos, se puede usar, por ejemplo, un constructo de ADN recombinante en el que el oligonucleótido se coloca bajo el control de una Pol III fuerte (por ejemplo, U6 o promotor H1-ARN Pol III) o promotor Pol II. El uso de tal construcción para transfectar células diana in vitro o in vivo dará como resultado la transcripción de cantidades suficientes del precursor de ARN diseñado para llevar a la producción de un ARNip que puede dirigirse a una secuencia de ARNm correspondiente para su división por ARNi para disminuir la Expresión del gen que codifica ese ARNm. Por ejemplo, un vector puede introducirse in vivo de manera que sea captado por una célula y dirige la transcripción de un precursor de ARN diseñado. Dicho vector puede permanecer episomal o volverse integrado cromosómicamente, siempre que pueda transcribirse para producir el precursor de stRNA deseado.

Dichos vectores pueden construirse mediante métodos de tecnología de ADN recombinante conocidos en la técnica. Los vectores pueden ser plásmidos, virus u otros vectores conocidos en la técnica, tales como los descritos en el presente documento, utilizados para la replicación y expresión en células de mamíferos u otros tipos de células diana. Las secuencias de ácido nucleico que codifican los precursores de ARN modificados genéticamente pueden prepararse utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, se pueden sintetizar dos oligonucleótidos de ADN sintético para crear un nuevo gen que codifica todo el precursor de ARN diseñado. Los oligonucleótidos de ADN, que se emparejarán, dejando "extremos pegajosos" apropiados para la clonación, pueden insertarse 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 de terminación apropiadas 3' a las secuencias precursoras de ARN diseñadas (por ejemplo, una secuencia de señal de división y poliadenilación de SV40 o una secuencia de terminación Pol III).

La divulgación también abarca células huésped modificadas por ingeniería genética que contienen cualquiera de los vectores de expresión anteriores y, por lo tanto, expresan las moléculas de ácido nucleico de la divulgación en la célula huésped. Las células hospedadoras se pueden cultivar utilizando técnicas y métodos conocidos (ver, por ejemplo, Culture of Animal Cells (R.I. Freshney, Alan R. Liss, Inc. 1987); Molecular Cloning, Sambrook et al. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)).

La introducción exitosa de los vectores de la divulgación en células huésped se puede monitorizar usando varios métodos conocidos. Por ejemplo, la transfección transitoria se puede señalar con un indicador, como un marcador fluorescente, como la proteína fluorescente verde (GFP). La transfección estable se puede indicar utilizando marcadores que proporcionan a la célula transfectada resistencia a factores ambientales específicos (por ejemplo, antibióticos y medicamentos), como la resistencia a la higromicina B, por ejemplo, en células de insectos y en células de mamíferos.

3. Secuencias reguladoras

La expresión de los precursores de ARN modificados por ingeniería genética está dirigida por secuencias reguladoras, y los vectores de la divulgación pueden incluir cualquier secuencia reguladora conocida en la técnica para actuar en células de mamíferos, por ejemplo, células humanas o murinas; en células de insecto; en células vegetales; u otras células. El término secuencia reguladora incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión. Se apreciará que la secuencia reguladora apropiada depende de factores tales como el uso futuro de la célula o el animal transgénico en el que se está introduciendo una secuencia que codifica un precursor de ARN diseñado, y el nivel de expresión del precursor de ARN deseado. Una persona experta en la técnica podría elegir la secuencia reguladora apropiada. Por ejemplo, los animales transgénicos descritos en el presente documento pueden usarse para determinar el papel de un polipéptido de prueba o los precursores de ARN modificados por ingeniería genética en un tipo de célula particular, por ejemplo, una célula hematopoyética. En este caso, se puede utilizar una secuencia reguladora que impulse la expresión del transgén de forma ubicua, o una secuencia reguladora específica para hematopoyéticos que exprese el transgén solo en células hematopoyéticas. La expresión de los precursores de ARN modificados por ingeniería genética en una célula hematopoyética significa que la célula ahora es susceptible a ARNi específicos, dirigidos a un gen particular. Los ejemplos de varias secuencias reguladoras se describen a continuación.

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

Alternativamente, la secuencia reguladora puede dirigir la expresión del transgén en órganos específicos o tipos de células (ver, por ejemplo, Lasko et al., 1992, Proc. Natl Acad Sci. USA 89: 6232). Se conocen varias secuencias reguladoras específicas de tejido en la técnica, incluyendo la secuencia reguladora de albúmina para el hígado (Pinkert et al., 1987, Genes Dev. 1: 268276); La secuencia reguladora de la endotelina para las 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 la 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. Natl Acad Sci. USA 83: 2511-2515), o la secuencia reguladora vav para células hematopoyéticas (Oligvy et al., 1999, Proc. Natl 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 de clase I del MHC murino (Morello et al., 1986, EMBO J. 5: 1877-1882). Dado que la expresión de NMC es inducida por citoquinas, la expresión de un gen de prueba unido operativamente a esta secuencia reguladora puede ser regulada al alza en presencia de citoquinas.

Además, la expresión del transgén se puede regular con precisión, por ejemplo, mediante el uso de una secuencia reguladora inducible y sistemas de expresión tales como una secuencia reguladora que es sensible a ciertos reguladores fisiológicos, por ejemplo, niveles circulantes de glucosa u hormonas (Docherty et al., 1994, FASEB J. 8: 20-24). Tales sistemas de expresión inducibles, adecuados para el control de la expresión del transgén en células o en mamíferos como los ratones, incluyen la regulación por ecdisona, por estrógeno, progesterona, tetraciclina, inductores químicos de dimerización e isopropil-beta-D1-tiogalactopiranosido (IPTG) (colectivamente referido como "la molécula reguladora"). Cada uno de estos sistemas de expresión está bien descrito en la literatura 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 los sistemas de expresión inducibles, consulte, 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 lac sistema, el sistema trp, el sistema TAC, el sistema TRC, las principales regiones promotoras y 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 emparejamiento α de la levadura. Los promotores adicionales incluyen el promotor contenido en la repetición terminal larga en 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al., Cell 22: 787-797, 1988); el promotor del herpes timidina quinasa (Wagner et al., Proc. Natl Acad Sci. USA 78: 1441, 1981); o las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster et al., Nature 296: 39, 1988).

4. Ensayo para la prueba de precursores de ARN de ingeniería

Los lisados de embriones de *Drosophila* se pueden usar para determinar si un precursor de ARN diseñado fue, de hecho, el precursor directo de un ARN_{tn} o ARN_{ip} maduro. Este ensayo de lisado se describe en Tuschl et al., 1999, supra, Zamore et al., 2000, supra, y Hutvdgner et al. 2001, supra. Estos lisados recapitulan el ARNi in vitro, lo que permite investigar si el ARN precursor propuesto se dividió en un ARN_t o ARN_{ip} maduro mediante un mecanismo similar al ARNi. Brevemente, el ARN precursor se incubaba con lisado de embrión de *Drosophila* varias veces y luego se analiza para determinar la producción del ARN_{ip} o ARN_{tp} maduro mediante la extensión del cebador o la hibridación Northern. Como en el contexto 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 dúplex de ARNip o ARNip maduro en el lisado de embrión de *Drosophila*.

Además, un precursor de ARN diseñado puede probarse funcionalmente en los lisados de embrión de *Drosophila*. En este caso, el precursor de ARN diseñado se incuba en el lisado en presencia de un ARNm diana radiomarcado en 5' en una reacción de ARNi in vitro estándar durante varios períodos de tiempo. El ARNm diana se puede marcar 5' radioactivamente 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 luego se aíslan y se analizan en un gel desnaturalizante de acrilamida o agarosa para determinar si el ARNm diana se ha dividido en respuesta a la presencia del precursor de ARN modificado en la reacción. La extensión y la posición de dicha división del objetivo de ARNm indicará si la ingeniería del precursor creó un ARNip pre-capaz capaz de mediar ARNi específico de secuencia.

III. Métodos de introducción de ARN, vectores y células huésped

Los métodos físicos para introducir ácidos nucleicos incluyen la inyección de una solución que contiene el ARN, el bombardeo con partículas cubiertas por el ARN, remojar la célula u organismo en una solución del ARN o la electroporación de las membranas celulares en presencia del ARN. Un constructo viral empaquetado en una partícula viral lograría una introducción eficiente de un constructo de expresión en la célula y la transcripción del ARN codificado por el constructo de expresión. Se pueden usar otros métodos conocidos en la técnica para introducir ácidos nucleicos en células, tales como el transporte de portadores mediado por lípidos, el transporte mediado por químicos, como el fosfato de calcio, y similares. Por lo tanto, el ARN se puede introducir junto con los componentes que realizan una o más de las siguientes actividades: mejorar la captación de ARN por parte de la célula, inhibir la hibridación de cadenas simples, estabilizar las cadenas individuales o aumentar de otra manera la inhibición del gen diana.

El ARN puede introducirse directamente en la célula (es decir, intracelularmente); o introducido extracelularmente en una cavidad, espacio intersticial, en la circulación de un organismo, introducido por ruta oral, o puede introducirse bañando una célula u organismo en una solución que contiene el ARN. La circulación vascular o extravascular, la sangre o el sistema linfático y el líquido cefalorraquídeo son sitios donde se puede introducir el ARN.

La célula con el gen diana se puede derivar de o contener en cualquier organismo. El organismo puede ser una planta, un animal, un protozoo, una bacteria, un virus o un hongo. La planta puede ser una monocotiledónea, dicotiledónea o gimnosperma; el animal puede ser un vertebrado o invertebrado. Los microbios preferidos son aquellos utilizados en la agricultura o por la industria, y aquellos que son patógenos para plantas o animales. Los hongos incluyen organismos tanto en el moho como en la morfología de la levadura. Las plantas incluyen arabidopsis; cultivos de campo (por ejemplo, alfalfa, cebada, frijol, maíz, algodón, lino, guisante, colza, maíz, cártamo, sorgo, soja, girasol, tabaco y trigo); cultivos de hortalizas (por ejemplo, espárragos, remolacha, brócoli, repollo, zanahoria, coliflor, apio, pepino, berenjena, lechuga, cebolla, pimienta, papa, calabaza, rábano, espinaca, calabaza, taro, tomate y calabacín); cultivos de frutas y nueces (por ejemplo, almendra, manzana, albaricoque, plátano, baya negra, arándano, cacao, cereza, coco, arándano, dátil, feijoa, avellana, uva, toronja, guayaba, kiwi, limón, lima, mango, melón, nectarina, naranja, papaya, maracuyá, melocotón, maní, pera, piña, pistacho, ciruela, frambuesa, fresa, mandarina, nuez y sandía); y ornamentales (por ejemplo, aliso, ceniza, álamo temblón, azalea, abedul, boj, camelia, clavel, crisantemo, olmo, abeto, hiedra, jazmín, enebro, roble, palmera, álamo, pino, secoya, rododendro, rosa y caucho). Los ejemplos de animales vertebrados incluyen peces, mamíferos, vacas, cabras, cerdos, ovejas, roedores, hámsteres, ratones, ratas, primates y humanos; Los animales invertebrados incluyen nematodos, otros gusanos, *drosophila* y otros insectos.

La célula que tiene el gen diana puede ser de la línea germinal o somática, totipotente o pluripotente, divisoria o no divisoria, parénquima o epitelio, inmortalizada o transformada, o similar. La célula puede ser una célula madre o una célula diferenciada. Los tipos de células que se diferencian incluyen adipocitos, fibroblastos, miocitos, cardiomiocitos, endotelio, neuronas, glía, células sanguíneas, megacariocitos, linfocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, leucocitos, granulocitos, queratinocitos, condrocitos, osteoblastos, osteoclastos, hepatocitos, y células de las glándulas endocrinas o exocrinas.

Según el gen diana particular y la dosis de material de ARN de doble cadena administrado, este proceso puede proporcionar una pérdida parcial o completa de la función del gen diana. Una reducción o pérdida de la expresión génica en al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% o más de las células diana es un ejemplo. La inhibición de la expresión génica se refiere a la ausencia (o disminución observable) en el nivel de proteína y/o producto de ARNm de un gen diana. La especificidad se refiere a la capacidad de inhibir el gen diana sin efectos manifiestos en otros genes de la célula. Las consecuencias de la inhibición pueden confirmarse mediante el examen de las propiedades externas de la célula u organismo (como se presenta a continuación en los ejemplos) o mediante técnicas bioquímicas como la hibridación de la solución de ARN, la protección de la nucleasa, la hibridación Northern, la transcripción inversa, el monitorización de la expresión génica con un micromatrices, unión a anticuerpos, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunotransferencia Western, radioinmunoensayo (RIA), otros inmunoensayos y análisis de células activadas por fluorescencia (FACS).

Para la inhibición mediada por ARN en una estirpe celular o un organismo completo, la expresión génica se ensaya convenientemente mediante el uso de un gen indicador o de resistencia a fármacos cuyo producto proteico se ensaya fácilmente. Dichos genes indicadores incluyen acetohidroxiácido sintasa (AHAS), fosfatasa alcalina (AP), beta galactosidasa (LacZ), beta glucoronidasa (GUS), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína fluorescente verde (GFP), peroxidasa de rábano picante (HRP), luciferasa (Luc), nopalina sintasa (NOS), octopina sintasa (OCS) y sus derivados. Existen múltiples marcadores seleccionables que confieren resistencia a la ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfomicina, puromicina y tetraciclina. Dependiendo del ensayo, la cuantificación de la cantidad de expresión génica permite determinar un grado de inhibición superior al 10%, 33%, 50%, 90%, 95% o 99% en comparación con una célula no tratada de acuerdo con la presente invención. Las dosis más bajas de material inyectado y los tiempos más prolongados después de la administración del agente de ARNi pueden resultar en la inhibición de una fracción más pequeña de las células (por ejemplo, al menos 10%, 20%, 50%, 75%, 90%, o 95% de células diana). La cuantificación de la expresión génica en una célula puede mostrar cantidades similares de inhibición a nivel de acumulación de ARNm diana o traducción de proteína diana. Como ejemplo, la eficacia de la inhibición se puede determinar evaluando la cantidad de producto génico en la célula; El ARNm puede detectarse con una sonda de hibridación que tiene una secuencia de nucleótidos fuera de la región utilizada para el ARN bicatenario inhibidor, o el polipéptido traducido puede detectarse con un anticuerpo generado contra la secuencia polipeptídica de esa región.

El ARN puede introducirse en una cantidad que permita la entrega de al menos una copia por célula. Las dosis más altas (por ejemplo, al menos 5, 10, 100, 500 o 1000 copias por célula) de material pueden producir una inhibición más efectiva; Las dosis más bajas también pueden ser útiles para aplicaciones específicas.

IV. Métodos de tratamiento:

La presente divulgación proporciona métodos tanto profilácticos como terapéuticos para tratar a un sujeto con riesgo de (o susceptible a) un trastorno o que tiene un trastorno asociado con la expresión o actividad de genes diana aberrantes o no deseados. "Tratamiento", o "tratamiento" como se usa en el presente documento, se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico (por ejemplo, un agente de ARN o vector o transgén que codifica lo mismo) a un paciente, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un paciente, tejido aislado o estirpe celular de un paciente que tiene una enfermedad o trastorno, un síntoma de enfermedad o trastorno o una predisposición hacia una enfermedad o trastorno, con el propósito de curar, curar, aliviar, sanar, alterar, remediar, reparar, mejorar o afectar la enfermedad o trastorno, los síntomas de la enfermedad o trastorno, o la predisposición a la enfermedad.

Con respecto a los métodos de tratamiento tanto profilácticos como terapéuticos, dichos tratamientos pueden ser específicamente adaptados o modificados, según el conocimiento obtenido en el campo de la farmacogenómica. "Farmacogenómica", como se usa en el presente documento, se refiere a la aplicación de tecnologías genómicas como la secuenciación de genes, la genética estadística y el análisis de la expresión génica a medicamentos en desarrollo clínico y en el mercado. Más específicamente, el término se refiere al estudio de cómo los genes de un paciente determinan su respuesta a un fármaco (por ejemplo, el "fenotipo de respuesta al fármaco" o "genotipo de respuesta al fármaco" de un paciente). Por lo tanto, otro aspecto de la divulgación proporciona métodos para adaptar el tratamiento profiláctico o terapéutico de un individuo con las moléculas del gen diana de la presente divulgación o los moduladores del gen diana de acuerdo con el genotipo de respuesta al fármaco de ese individuo. La farmacogenómica permite a un doctor o médico dirigir tratamientos profilácticos o terapéuticos a pacientes que se beneficiarán más del tratamiento y evitar el tratamiento de pacientes que experimentarán efectos secundarios tóxicos relacionados con los medicamentos.

1. Métodos profilácticos

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para prevenir en un sujeto, una enfermedad o afección asociada con una expresión o actividad de un gen diana aberrante o no deseada, administrando al sujeto un agente terapéutico (por ejemplo, un agente de ARNi o un vector o transgén que codifica el mismo). Los sujetos en riesgo de una enfermedad causada o contribuida por una expresión o actividad génica diana aberrante o no deseada pueden identificarse, por ejemplo, mediante cualquiera o una combinación de ensayos de diagnóstico o pronóstico como se describe en el presente documento. La administración de un agente profiláctico puede ocurrir antes de la manifestación de los síntomas característicos de la aberración del gen diana, de manera que se prevenga una enfermedad o trastorno o, alternativamente, se retrase su progresión. Dependiendo del tipo de aberración del gen diana, por ejemplo, se puede usar un gen diana, un agonista del gen diana o un agente antagonista del gen diana para tratar al sujeto. El agente apropiado puede determinarse basándose en los ensayos de selección descritos en este documento.

2. Métodos terapéuticos

Otro aspecto de la divulgación se refiere a los métodos para modular la expresión de genes diana, la expresión de proteínas o la actividad con fines terapéuticos. De acuerdo con lo anterior, en una realización ejemplar, el método modulador de la divulgación implica poner en contacto una célula capaz de expresar un gen diana con un agente

terapéutico (por ejemplo, un agente de ARNi o un vector o transgén que codifique el mismo) que sea específico para el gen o proteína diana (por ejemplo, , es específico para el ARNm codificado por dicho gen o que especifica la secuencia de aminoácidos de dicha proteína, de modo que se modula la expresión o una o más de las actividades de la proteína diana. Estos métodos moduladores pueden realizarse in vitro (por ejemplo, cultivando la célula con el agente) o, alternativamente, in vivo (por ejemplo, administrando el agente a un sujeto). Como tal, la presente divulgación proporciona métodos para tratar a un individuo afectado por una enfermedad o trastorno caracterizado por una expresión o actividad aberrante o no deseada de un gen diana polipéptido o molécula de ácido nucleico. La inhibición de la actividad del gen diana es deseable en situaciones en las que el gen diana no está regulado de manera anormal y/o en la que es probable que la disminución de la actividad del gen diana tenga un efecto beneficioso.

3. Farmacogenómica

Los agentes terapéuticos (por ejemplo, un agente de ARNi o un vector o transgén codificante del mismo) de la divulgación se pueden administrar a individuos para tratar trastornos (profilácticamente o terapéuticamente) asociados con actividad génica diana aberrante o no deseada. Junto con dicho tratamiento, se puede considerar la farmacogenómica (es decir, el estudio de la relación entre el genotipo de un individuo y la respuesta de ese individuo a un compuesto o fármaco extraño). Las diferencias en el metabolismo de las terapias pueden conducir a una toxicidad grave o un fracaso terapéutico al alterar la relación entre la dosis y la concentración en sangre del fármaco farmacológicamente activo. Por lo tanto, un médico o clínico puede considerar la aplicación del conocimiento obtenido en estudios farmacogenómicos relevantes para determinar la administración de un agente terapéutico, así como la adaptación de la dosis y/o el régimen terapéutico del tratamiento con un agente terapéutico.

La farmacogenómica trata las variaciones hereditarias clínicamente significativas en la respuesta a los fármacos debido a la disposición alterada de los fármacos y la acción anormal en las personas afectadas. Ver, por ejemplo, Eichelbaum, M. et al. (1996) *Clinica Exp. Pharmacol. Fisiol.* 23 (10-11): 983-985 y Linder, M. W. et al. (1997) *Clinica Chem.* 43(2):254-266. En general, se pueden diferenciar dos tipos de afecciones farmacogenéticas. Las condiciones genéticas se transmiten como un solo factor que altera la forma en que los fármacos actúan sobre el cuerpo (acción alterada de los fármacos) o las condiciones genéticas que se transmiten como factores individuales que alteran la forma en que el cuerpo actúa sobre las drogas (alteración del metabolismo de los fármacos). Estas condiciones farmacogenéticas pueden ocurrir como defectos genéticos raros o como polimorfismos naturales. Por ejemplo, la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es una enzimopatía hereditaria común en la que la principal complicación clínica es la hemólisis después de la ingestión de fármacos oxidantes (antipalúdicos, sulfonamidas, analgésicos, nitrofuranos) y el consumo de frijoles fava.

Un enfoque farmacogenómico para identificar genes que predicen la respuesta farmacológica, conocido como “una asociación de genoma completo”, se basa principalmente en un mapa de alta resolución del genoma humano que consiste en marcadores relacionados con genes ya conocidos (por ejemplo, un mapa de marcadores genéticos “bialélico” que consiste en 60,000-100,000 sitios polimórficos o variables en el genoma humano, cada uno de los cuales tiene dos variantes.) Un mapa genético de alta resolución de este tipo puede compararse con un mapa del genoma de cada uno de un número estadísticamente significativo de pacientes que participan en un ensayo farmacológico de Fase II/III para identificar marcadores asociados con una respuesta farmacológica observada particular o efecto secundario. Alternativamente, dicho mapa de alta resolución puede generarse a partir de una combinación de unos diez millones de polimorfismos de nucleótido único (SNP) conocidos en el genoma humano. Como se usa en este documento, un “SNP” es una alteración común que se produce en una base de nucleótidos única en un tramo de ADN. Por ejemplo, un SNP puede ocurrir una vez por cada 1000 bases de ADN. Un SNP puede estar involucrado en un proceso de enfermedad, sin embargo, la gran mayoría puede no estar asociada a la enfermedad. Dado un mapa genético basado en la ocurrencia de tales SNPs, los individuos pueden agruparse en categorías genéticas dependiendo de un patrón particular de SNPs en su genoma individual. De esta manera, los regímenes de tratamiento pueden adaptarse a grupos de individuos genéticamente similares, teniendo en cuenta los rasgos que pueden ser comunes entre los individuos genéticamente similares.

Alternativamente, se puede utilizar un método denominado “enfoque de genes candidatos” para identificar genes que predicen la respuesta del fármaco. De acuerdo con este método, si se conoce un gen que codifica una diana de fármacos (por ejemplo, un polipéptido del gen diana de la presente divulgación), todas las variantes comunes de ese gen pueden identificarse con bastante facilidad en la población y se puede determinar si tiene una versión del gen frente a otra asociada con una respuesta farmacológica particular.

Como una realización ilustrativa, la actividad de las enzimas metabolizadoras de fármacos es un determinante importante tanto de la intensidad como de la duración de la acción del fármaco. El descubrimiento de polimorfismos genéticos de las enzimas metabolizadoras de fármacos (por ejemplo, la N-acetiltransferasa 2 (NAT 2) y las enzimas del citocromo P450 CYP2D6 y CYP2C19) ha proporcionado una explicación de por qué algunos pacientes no obtienen los efectos farmacológicos esperados o muestran una respuesta farmacológica exagerada. Toxicidad grave después de tomar la dosis estándar y segura de un fármaco. Estos polimorfismos se expresan en dos fenotipos en la población, el metabolizador extenso (EM) y el metabolizador deficiente (PM). La prevalencia de PM es diferente entre las diferentes poblaciones. Por ejemplo, el gen que codifica CYP2D6 es altamente polimórfico y se han identificado varias

mutaciones en PM, lo que conduce a la ausencia de CYP2D6 funcional. Los metabolizadores deficientes de CYP2D6 y CYP2C19 experimentan con bastante frecuencia una respuesta al fármaco exagerada y efectos secundarios cuando reciben dosis estándar. Si un metabolito es la fracción terapéutica activa, las PM no muestran una respuesta terapéutica, como se demuestra para el efecto analgésico de la codeína mediada por su metabolito-morfina formada por CYP2D6. El otro extremo son los llamados metabolizadores ultrarrápidos que no responden a las dosis estándar. Recientemente, se ha identificado que las bases moleculares del metabolismo ultrarrápido se deben a la amplificación del gen CYP2D6.

Alternativamente, se puede utilizar un método denominado "perfil de expresión génica" para identificar genes que predicen la respuesta del fármaco. Por ejemplo, la expresión génica de un animal dosificado con un agente terapéutico de la presente divulgación puede dar una indicación de si se han activado las rutas genéticas relacionadas con la toxicidad.

La información generada a partir de más de uno de los enfoques farmacogenómicos anteriores se puede usar para determinar la dosis apropiada y los regímenes de tratamiento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un individuo. Este conocimiento, cuando se aplica a la dosificación o selección de fármacos, puede evitar reacciones adversas o fallas terapéuticas y, por lo tanto, mejorar la eficacia terapéutica o profiláctica cuando se trata a un sujeto con un agente terapéutico, como se describe en este documento.

Los agentes terapéuticos se pueden probar en un modelo animal apropiado. Por ejemplo, un agente ARNi (o vector de expresión o transgén que codifica lo mismo) como se describe en este documento puede usarse en un modelo animal para determinar la eficacia, toxicidad o efectos secundarios del tratamiento con dicho agente. Alternativamente, se puede usar un agente terapéutico en un modelo animal para determinar el mecanismo de acción de tal agente. Por ejemplo, un agente puede usarse en un modelo animal para determinar la eficacia, la toxicidad o los efectos secundarios del tratamiento con dicho agente. Alternativamente, se puede usar un agente en un modelo animal para determinar el mecanismo de acción de tal agente.

V. Composiciones farmacéuticas

La divulgación se refiere a los usos de los agentes descritos anteriormente para tratamientos terapéuticos como se describe más adelante. De acuerdo con lo anterior, los moduladores de la presente divulgación pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Dichas composiciones comprenden típicamente la molécula de ácido nucleico, proteína, anticuerpo o compuesto modulador y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, el lenguaje "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. Los compuestos activos suplementarios también pueden incorporarse en las composiciones.

Una composición farmacéutica de la divulgación se formula para ser compatible con su ruta de administración prevista. Los ejemplos de rutas de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica) y transmucosa. Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril 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 de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como el cloruro de sodio o la dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede incluir en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples 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 portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) 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 fácil aplicación con jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr 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 de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

5 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, 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 el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución del mismo filtrada previamente estéril.

15 Las composiciones orales en general incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden incluir en cápsulas de gelatina o comprimirse en tabletas. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales también pueden prepararse usando un portador fluido para usar como un enjuague bucal, en donde el compuesto en el portador fluido se aplica oralmente y se agita y expectora o se traga. Agentes de unión farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o esteroides; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo o saborizante de naranja.

25 Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de un aerosol desde un recipiente o dispensador a presión que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas como el dióxido de carbono o un nebulizador.

30 La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, en la formulación se usan penetrantes apropiados para la barrera a permear. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa se puede lograr mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, ungüentos, bálsamos o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

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

35 En una realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, como etilenvinilacetato, 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 liposomales (incluidos los liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos víricos) también pueden usarse como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. No. 4,522,811.

45 Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en este documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la divulgación está dictada por y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se va a lograr, y las limitaciones inherentes a la técnica de composición de dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos

55 La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, 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 LD50/ED50. Se prefieren los compuestos que exhiben grandes índices terapéuticos. Aunque se pueden usar compuestos que exhiben efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado al diseñar un sistema de administración

que dirija dichos compuestos al sitio del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

5 Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para formular un rango de dosis para uso en humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método de la divulgación, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un rango de concentración circulante en plasma que incluya la EC50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una respuesta media máxima) determinada en el cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en los seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

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

15 VI. Organismos transgénicos

Los precursores de ARN diseñados de la divulgación se pueden expresar en animales transgénicos. Estos animales representan un sistema modelo para el estudio de trastornos causados por, o exacerbados por, sobreexpresión o subexpresión (en comparación con el tipo silvestre o normal) de ácidos nucleicos (y sus polipéptidos codificados) dirigidos a la destrucción por los agentes de ARNi, por ejemplo, ARNi_p y shRNAs, y para el desarrollo de agentes terapéuticos que modulan la expresión o actividad de ácidos nucleicos o polipéptidos dirigidos a la destrucción.

20 Los animales transgénicos pueden ser animales de granja (cerdos, cabras, ovejas, vacas, caballos, conejos y similares), roedores (como ratas, cobayas y ratones), primates no humanos (por ejemplo, babuinos, monos y chimpancés), y animales domésticos (por ejemplo, perros y gatos). Se pueden usar invertebrados como *Caenorhabditis elegans* o *Drosophila*, así como vertebrados no mamíferos como peces (por ejemplo, pez cebra) o aves (por ejemplo, pollos).

Se prefieren los precursores de ARN diseñados con vástagos de 18 a 30 nucleótidos de longitud para su uso en mamíferos, como los ratones. Un animal fundador transgénico puede identificarse basándose en la presencia de un transgén que codifica los nuevos precursores de ARN en su genoma y/o la expresión del transgén en tejidos o células de los animales, por ejemplo, mediante PCR o análisis Northern. La expresión se confirma por una disminución en la expresión (ARN o proteína) de la secuencia diana.

30 Se puede usar un animal fundador transgénico para criar animales adicionales que llevan el transgén. Además, los animales transgénicos que llevan un transgén que codifica los precursores de ARN pueden criarse a otros animales transgénicos que llevan otros transgenes. Además, las células obtenidas del animal fundador transgénico o su descendencia se pueden cultivar para establecer estirpes celulares primarias, secundarias o inmortales que contienen el transgén.

1. Procedimientos para hacer animales transgénicos, no humanos

Se han utilizado varios métodos para obtener animales transgénicos, no humanos, que son animales que han adquirido un gen adicional mediante la introducción de un transgén en sus células (por ejemplo, células somáticas y germinales), o en la línea germinal de un ancestro. En algunos casos, los animales transgénicos pueden ser generados por instalaciones comerciales (por ejemplo, la Instalación de *Drosophila* Transgénica en la Universidad Estatal de Michigan, la Instalación Básica de Zebrafish Transgénica en el Colegio Médico de Georgia (Augusta, Ga.), y Xenogen Biosciences (St. Louis, Mes.). En general, la construcción que contiene el transgén se suministra a la instalación para generar un animal transgénico.

45 Los métodos para generar animales transgénicos incluyen la introducción del transgén en la línea germinal del animal. Un método es mediante microinyección de una construcción génica en el pronúcleo de un embrión en etapa temprana (por ejemplo, antes de la etapa de cuatro células; Wagner et al., 1981, Proc. Natl Acad Sci. USA 78: 5016; Brinster et al., 1985, Proc. Natl 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., MP1 ulating the Mouse ErbnLo. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY (1986); U.S. Patent 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. Devl. 1:147; Pursel et al., 1987, Vet. Immunol Histopath. 17:303; Rexroad et al., 1990, J. Reprod. Fert. 41 (supl.): 1 19; Rexroad et al., 1989, Molec. Reprod. Devl. 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 (supl.): 164).

En resumen, el procedimiento consiste en introducir el transgén en un animal mediante la microinyección del constructo en los pronúcleos de los huevos de mamíferos fertilizados para hacer que una o más copias del transgén se retengan en las células de los mamíferos en desarrollo. Después de la introducción de la construcción transgénica en el huevo fertilizado, el huevo puede incubarse in vitro durante cantidades variables de tiempo, o reimplantarse en un huésped sustituto, o en ambos. Un método común es incubar los embriones in vitro durante aproximadamente 1 a 7 días, dependiendo de la especie, y luego reimplantarlos en el huésped sustituto. La presencia del transgén en la progenie de los embriones manipulados transgénicamente se puede probar mediante análisis de transferencia Southern de un segmento de tejido.

Otro método para producir animales transgénicos de línea germinal es mediante el uso de células madre embrionarias (ES). El constructo génico se puede introducir 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) de forma transcripcional. Región activa del genoma. También se puede introducir una construcción adecuada en las células madre embrionarias mediante transfección mediada por ADN, como por ejemplo mediante electroporación (Ausubel et al., 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, AM) y los métodos para hacer animales transgénicos a partir de células madre embrionarias pueden encontrarse en Teratocarcinomas y Células Madre Embrionarias, Un Enfoque Práctico, ed. E. J. Robertson (IRL Press, 1987). En resumen, las células ES se obtienen de embriones de preimplantación cultivados in vitro (Evans et al., 1981, Nature 292: 154-156). Los transgenes pueden introducirse eficazmente en células ES mediante transfección de ADN o mediante transducción mediada por retrovirus. Las células ES transformadas resultantes pueden combinarse después con blastocistos 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 se puede construir para permitir que se herede como un plásmido extracromosómico (Gassmann et al., 1995, Proc. Natl 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 se pueden obtener infectando o transfectando células ya sea in vivo (por ejemplo, inyección directa), ex vivo (por ejemplo, infectando las células fuera del huésped y luego reimplantándolas), 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 diseñados. Los ejemplos de vectores virales adecuados incluyen vectores retrovirales recombinantes (Valerio et al., 1989, Gene 84: 419; Scharfinan et al., 1991, Proc. Natl Acad Sci. USA 88: 462; Miller y Buttimore, 1986, Mol. Cel. Biol. 6: 2895), vectores adenovirales recombinantes (Freidman et al., 1986, Mol. Cel. Biol. 6:3791; Levrero et al., 1991, Gene 101: 195), y vectores virales de Herpes simplex recombinantes (Fink et al., 1992, Human Gene Therapy 3:11). Tales métodos también son útiles para introducir construcciones en células para usos distintos de la generación de animales transgénicos.

Otros enfoques incluyen la inserción de transgenes que codifican los nuevos precursores de ARN modificados por ingeniería genética en vectores virales que incluyen adenovirus recombinantes, virus adenoasociados y virus del herpes simplex-1, o plásmidos recombinantes bacterianos o eucarióticos. Los vectores virales transfectan células directamente. Otros enfoques incluyen el suministro de transgenes, en forma de ADN plasmídico, con la ayuda de, por ejemplo, liposomas catiónicos (lipofectina) o conjugados de polilisina derivados (por ejemplo, anticuerpos conjugados), gramacina S, envolturas virales artificiales u otros portadores intracelulares similares. así como la inyección directa de la construcción transgénica o la precipitación de CaPO₄ llevada a cabo in vivo. Dichos métodos también pueden usarse in vitro para introducir construcciones en células para usos distintos a la generación de animales transgénicos.

Los vectores de retrovirus y los vectores de virus adenoasociados se pueden usar como un sistema de administración desaparecido recombinante para la transferencia de genes exógenos in vivo o in vitro. Estos vectores proporcionan un suministro eficiente de genes a las células, y los ácidos nucleicos transferidos se integran de manera estable en el ADN cromosómico del huésped. El desarrollo de estirpes celulares especializadas (denominadas "células de empaquetamiento") que producen solo retrovirus defectuosos en la replicación ha aumentado la utilidad de los retrovirus para la terapia génica, y los retrovirus defectuosos se caracterizan por su uso en la transferencia de genes con fines de terapia génica (para una revisión, consulte Miller, 1990, Blood 76: 271). Un retrovirus defectuoso de replicación se puede empaquetar en viriones que se pueden usar 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 se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. et al., (Eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Secciones 9.9.14 y otros manuales de laboratorio estándar.

Los ejemplos de retrovirus adecuados incluyen pLJ, pZIP, pWE y pEM que son conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de líneas de virus de empaquetamiento adecuadas para preparar sistemas retrovirales tanto ecotrópicos como anfotrópicos incluyen Psi-Crip, PsiCre, Psi-2 y Psi-Am. Los retrovirus se han utilizado para introducir

una variedad de genes en muchos tipos de células diferentes, incluidas las células epiteliales, in vitro y/o in vivo (ver por ejemplo Eglitis, et al., 1985, Science 230: 1395-1398; Danos y Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6460-6464; Wilson et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3014-3018; Armentano et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 61416145; Huber et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8039-8043; Ferry et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8377-8381; Chowdhury et al., 1991, Science 254: 1802-1805; Van Beusechem. et al., 1992, Proc. Nad Acad Sci. USA 89: 7640-19; Kay et al., 1992, Human Gene Therapy 3: 641-647; Dai et al., 1992, Proc. Natl Acad Sci. USA 89: 10892-10895; Hwu et al., 1993, J. Immunol. 150:4104-4115; Patente de EE.UU. No. 4,868,116; Patente de EE.UU. 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, los vectores retrovirales recombinantes capaces de transducir y expresar genes insertados en el genoma de una célula se pueden producir al transfectar el genoma retroviral recombinante en estirpes celulares de empaquetamiento adecuadas como PA317 y Psi-CRIP (Comette et al., 1991, Human, Gene Therapy 2: 5-10; Cone et al., 1984, Proc. Natl Acad Sci. USA 81: 6349). Se pueden usar vectores adenovirales recombinantes 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 mitóticamente activas para la infección. Otro sistema de administración de genes virales útil en la presente divulgación también utiliza vectores derivados de adenovirus. El genoma de un adenovirus puede manipularse de tal manera que codifique y exprese un producto genético de interés, pero se desactive en términos de su capacidad para replicarse en un ciclo de vida viral lítico normal. Ver, 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 de adenovirus adecuados derivados de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 d1324 u otras cepas de adenovirus (por ejemplo, Ad2, AO, Ad7, etc.) son conocidos por los expertos en la técnica. Los adenovirus recombinantes pueden ser ventajosos en ciertas circunstancias porque no son capaces de infectar células no divisorias y pueden usarse para infectar una amplia variedad de tipos de células, incluidas las células epiteliales (Rosenfeld et al., 1992, citado anteriormente). Además, la partícula de virus es relativamente estable y susceptible de purificación y concentración, y como se puede ver arriba, puede modificarse para afectar el espectro de infectividad. Además, el ADN adenoviral introducido (y el ADN extraño contenido en él) no se integra en el genoma de una célula huésped, sino que permanece episómico, evitando así posibles problemas 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 el ADN extraño es grande (hasta 8 kilobases) en relación con otros vectores de administración de genes (Berkner et al., Citado anteriormente; Haj-Ahmand y Graham, 1986, J. Virol. 57:267).

Otro sistema de vector viral útil para la administración de los transgenes del sujeto es el virus adenoasociado (AAV). El virus adenoasociado es un virus defectuoso que ocurre naturalmente y que requiere otro virus, como un virus de adenovirus o un virus de herpes, como un virus auxiliar para una replicación eficiente y un ciclo de vida productivo. Para una revisión, ver Muzyczka et al. (1992, Curr. Temas en Micro y Immunol. 158: 97-129). También es uno de los pocos virus que pueden integrar su ADN en células que no se dividen, y muestra una alta frecuencia de integración estable (ver, por ejemplo, Flotte et al. (1992, A.m. J. Respir. Célula. Mol. Biol. 7:349-356; Samulski et al., 1989, J. Virol. 63: 3822-3828; y McLaughlin et al. (1989, J. Virol. 62:1963-1973). Los vectores que contienen tan poco como 300 pares de bases de AAV se pueden empaquetar y pueden integrar. El espacio para el ADN exógeno se limita a aproximadamente 4.5 kb. Un vector de AAV como el descrito en Tratschin et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5: 3251-3260 se puede usar para introducir ADN en las células. Una variedad de ácidos nucleicos se ha introducido en diferentes tipos de células utilizando vectores AAV (ver por ejemplo Hennonat et al. (1984) Proc. Nad Acad Sci. USA 8 1: 64666470; Tratschin et al. (1985) Mol. Célula. BioL 4: 2072-2081; Wondisford et al. (1988) Mol Endocrinol 2: 32-39; Tratschin et al. (1984) J ViroL 51: 611-619; y Flotte et al. (1993) J BioL Chem. 268:3781-3790).

Además de los métodos de transferencia viral, como los ilustrados anteriormente, también se pueden emplear métodos no virales para causar la expresión de un ARNhc o un precursor de ARN modificado por ingeniería genética de la divulgación en el tejido de un animal. La mayoría de los métodos no virales de transferencia de genes se basan en los mecanismos nominales utilizados por las células de los mamíferos para la captación y el transporte intracelular de macromoléculas. En realizaciones preferidas, los sistemas de administración de genes no virales de la presente divulgación se basan en rutas endocíticas para la captación del gen sujeto de la divulgación por la célula diana. Los sistemas de administración génica ejemplares de este tipo incluyen sistemas derivados de liposomas, conjugados de poli-lisina y envolturas virales artificiales. Otras realizaciones incluyen sistemas de inyección de plásmidos tales como los descritos en Meuli et al., (2001) J Invest. Derinatology, 116 (1): 131-135; Cohen et al., (2000) Gene Ther., 7 (22): 1896-905; y Tam et al., (2000) Gene Ther., 7 (21): 186774.

En una realización representativa, un gen que codifica un ARNhc o un ARN precursor de la divulgación puede ser atrapado en liposomas que tienen cargas positivas en su superficie (por ejemplo, lipofectinas) y (opcionalmente) que están marcados con anticuerpos contra antígenos de la superficie celular del tejido objetivo (Mizuno et al., (1992) No Shinkei Geka, 20: 547-551; publicación PCT WO91/06309; solicitud de patente japonesa 10473 8 1; y publicación de patente europea EP-A-43 075).

Los animales que albergan el transgén pueden identificarse detectando la presencia del transgén en el ADN genómico (por ejemplo, utilizando el análisis Southern). Además, la expresión del ARNhc o del precursor de ARN modificado por ingeniería genética se puede detectar directamente (por ejemplo, mediante un análisis Northern). La expresión del transgén también se puede confirmar detectando una disminución en la cantidad de proteína correspondiente a la secuencia objetivo. 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.

2. Clones de animales transgénicos

Los clones de los animales transgénicos no humanos descritos en este 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 para salir del ciclo de crecimiento y entrar en la fase G0 para volverse inactiva. La célula inactiva se puede fusionar, por ejemplo, mediante el uso de pulsos eléctricos, a un ovocito enucleado de un animal de la misma especie a partir de la cual se aísla la célula inactiva. El ovocito reconstruido se cultiva de manera tal que se desarrolla en una mórula o blastocito y luego se transfiere a un animal de acogida hembra pseudopreñada. Las crías nacidas de este animal de acogida hembra serán clones del animal a partir del cual se aisló la célula, por ejemplo, la célula somática.

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

Los animales transgénicos de la presente divulgación pueden ser homocigotos o heterocigotos, y uno de los beneficios de la divulgación es que el ARNm diana se degrada eficazmente incluso en heterocigotos. La presente divulgación proporciona animales transgénicos que portan un transgén de la divulgación en todas sus células, así como animales que portan un transgén en algunas, pero no en todas sus células. Es decir, la divulgación prevé animales de mosaico. El transgén se puede integrar como un solo transgén o en concatadores, por ejemplo, tándems de cabeza a cabeza o tándem de cabeza a cola.

Para una revisión de las técnicas que se pueden usar para generar y evaluar animales transgénicos, los expertos pueden consultar a Gordon (IWL Rev. Cytol 1 1 5: 171-229, 1989), y puede 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., *BiolTechnology* 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 de Estados Unidos No. 5,175,385 y Krimpenfort et al., Patente de Estados Unidos No. 5,175,384.

3. Plantas transgénicas

Entre los organismos eucariotas presentados en la divulgación están las plantas que contienen un ácido nucleico exógeno que codifica un precursor de ARN diseñado por ingeniería genética de la divulgación.

De acuerdo con lo anterior, un método de acuerdo con la divulgación comprende preparar una planta que tiene una molécula o construcción de ácido nucleico, por ejemplo, un transgén, descrito en el presente documento. Las técnicas para introducir ácidos nucleicos exógenos en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas son conocidas en la técnica e incluyen, sin limitación, transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por vector viral, electroporación y transformación con pistola de partículas, ver, por ejemplo, Patente de EE.UU. Nos. 5,204,253 y 6,013,863. Si se usa un cultivo celular o de tejido como el tejido receptor para la transformación, las plantas pueden regenerarse a partir de cultivos transformados mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Las plantas transgénicas pueden incorporarse a 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 la selección adicional de otras características deseables. Alternativamente, las plantas transgénicas pueden propagarse vegetativamente para aquellas especies susceptibles a tales técnicas. La progenie incluye descendientes de una planta particular o línea vegetal. La progenie de una planta incluye semillas formadas en F1, F2, F3 y plantas de generación posterior, o semillas formadas en BQ, BC2, BC3 y plantas de generación posterior. Las semillas producidas por una planta transgénica se pueden cultivar y luego se pueden autofecundar (o cruzar y autofecundar) para obtener semillas homocigotas para el ácido nucleico que codifica un nuevo polipéptido.

Un grupo adecuado de plantas con las cuales practicar la divulgación incluye dicotiledóneas, tales como cártamo, alfalfa, soja, colza (ácido erúxico alto y canola), o girasol. También son adecuadas las monocotiledóneas tales como

maíz, trigo, centeno, cebada, avena, arroz, mijo, amaranto o sorgo. También son adecuados los cultivos de hortalizas o los cultivos de raíces como la papa, el brócoli, los guisantes, el maíz dulce, las palomitas de maíz, el tomate, los frijoles (incluidos los frijoles, los frijoles lima, los frijoles secos, los ejotes) y similares. También son adecuados los cultivos frutales como el melocotón, pera, manzana, cereza, naranja, limón, pomelo, ciruela, mango y palma. Por lo tanto, la divulgación tiene uso en una amplia gama de plantas, incluyendo especies de los géneros Anacardium, Arachis, Espárragos, Atropa, Avena, Brassica, Citrus, Citrullus, Capsicum, Carthamus, Cocos, Coffea, Cucumis, Cucurbita, Daucus, Elaeis, Fragaria, Glycine, Gossypium, Helianthus, Heterocallis, Hordeum, Hyoscyalinus, Lactuca, Linum, Lolium, Lupinus, Lycopersicon, Malus, Manihot, and Zea.

El experto en la materia apreciará que los organismos enumerados también son útiles para practicar otros aspectos de la divulgación, por ejemplo, como células huésped, como se describe anteriormente.

Las moléculas de ácido nucleico de la divulgación pueden expresarse en plantas de una manera específica de célula o tejido 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 de la divulgación incluyen, sin limitación, célula de huevo, célula central, célula sinérgica, cigoto, óvulo primordio, núcleo, integumentos, endotelio, células de gametofito hembra, embrión, eje, cotiledones, suspensor, endospermo, cubierta de la semilla, meristema de suelo, haz vascular, cambio, floema, corteza, brotes apicales de raíz o brotes, meristemas de brotes o raíces laterales, meristema floral, primordios de la hoja, células mesófilas de la hoja y células epidérmicas de la hoja, por ejemplo, células epidérmicas involucradas en el fortalecimiento de la capa cuticular. También son adecuadas las células y tejidos cultivados en medios líquidos o en medios semisólidos.

4. 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 diseñado de la divulgación. De acuerdo con lo anterior, un método de acuerdo con la divulgación comprende la introducción de una molécula de ácido nucleico o 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, la patente de EE.UU. Nos. 5,252,726 y 5,070,020. Los hongos transformados pueden cultivarse mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Dichos hongos pueden usarse para introducir un ácido nucleico que codifica un polipéptido en otras cepas fúngicas, para transferir el ácido nucleico a otras especies o para la selección de otras características deseables.

Un grupo adecuado de hongos con los que practicar la divulgación incluye levadura de fisión y levadura en ciernes, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pombe*, *S. carlsbergensis* y *Candida albicans*. Los hongos filamentosos tales como *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. también son útiles.

VII. Células u organismos modificados y/o atenuados

Un uso preferido adicional para los agentes de ARNi de la presente divulgación (o vectores o transgenes que los codifican) es un análisis funcional que se lleva a cabo en células eucarióticas, o organismos no humanos eucarióticos, preferiblemente células u organismos de mamíferos y lo más preferiblemente células humanas, por ejemplo, estirpes celulares como HeLa o 293 o roedores, por ejemplo, ratas y ratones. Al administrar un agente de ARNi adecuado que es suficientemente complementario a una secuencia de ARNm diana para dirigir la interferencia de ARN específica de la diana, se puede obtener un fenotipo modificado o atenuado específico en una célula diana, por ejemplo, en cultivo celular o en un organismo diana.

Por lo tanto, un tema adicional de la divulgación es una célula eucariota o un organismo no humano eucariótico que muestra un fenotipo modificado o atenuado específico del gen diana que comprende una expresión deficiente total o al menos parcialmente de al menos un gen diana endógeno en el que dicha célula o el organismo se transfecta con al menos un vector que comprende ADN que codifica un agente de ARNi capaz de inhibir la expresión del gen diana. Cabe señalar que la presente divulgación permite una eliminación o eliminación específica de un objetivo de varios genes endógenos diferentes debido a la especificidad del agente de ARNi.

Los fenotipos de células o de organismos no humanos específicos de genes modificados o atenuados, en particular de células humanas o de mamíferos no humanos, pueden usarse en procedimientos analíticos, por ejemplo, en el análisis funcional y/o fenotípico de procesos fisiológicos complejos, como el análisis de perfiles de expresión génica y/o proteomas. Preferiblemente, el análisis se lleva a cabo mediante métodos de alto rendimiento utilizando chips basados en oligonucleótidos.

Usando ARNi basado en tecnologías modificadas o atenuadas, la expresión de un gen diana endógeno puede inhibirse en una célula diana o un organismo diana. El gen endógeno puede complementarse con un ácido nucleico diana exógeno que codifica la proteína diana o una variante o forma mutada de la proteína diana, por ejemplo, un gen o un

ADN, que puede fusionarse opcionalmente a una secuencia de ácido nucleico adicional que codifica un péptido o polipéptido detectable, por ejemplo, una etiqueta de afinidad, particularmente una etiqueta de afinidad múltiple.

Las variantes o formas mutadas del gen diana difieren del gen diana endógeno en que codifican un producto génico que difiere del producto génico endógeno en el nivel de aminoácidos por sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos simples o múltiples. Las variantes o formas mutadas pueden tener la misma actividad biológica que el gen diana endógeno. Por otro lado, el gen diana variante o mutado también puede tener una actividad biológica, que difiere de la actividad biológica del gen diana endógeno, por ejemplo, una actividad parcialmente eliminada, una actividad completamente eliminada, una actividad mejorada, etc. La complementación se puede lograr comprimiendo el polipéptido codificado por el ácido nucleico endógeno, por ejemplo, una proteína de fusión que comprende la proteína diana y la etiqueta de afinidad y la molécula de ARN de doble cadena para modificar el gen endógeno en la célula diana. Esta compresión se puede lograr usando un vector de expresión adecuado que exprese tanto el polipéptido codificado por el ácido nucleico endógeno, por ejemplo, la proteína diana modificada con etiqueta y la molécula de ARN de doble cadena o, alternativamente, utilizando una combinación de vectores de expresión. Las proteínas y los complejos de proteínas que se sintetizan de novo en la célula diana contendrán el producto génico exógeno, por ejemplo, la proteína de fusión modificada. Para evitar la supresión del producto génico exógeno por el agente de ARNi, la secuencia de nucleótidos que codifica el ácido nucleico exógeno puede alterarse a nivel de ADN (con o sin provocar mutaciones en el nivel de aminoácidos) en la parte de la secuencia que, por lo tanto, es homólogo al agente ARNi. Alternativamente, el gen diana endógeno puede complementarse con las secuencias de nucleótidos correspondientes de otras especies, por ejemplo, del ratón.

20 VIII. Genómica funcional y/o proteómica.

Las aplicaciones preferidas para la célula u organismo de la divulgación es el análisis de perfiles de expresión génica y/o proteomas. En una realización especialmente preferida, se lleva a cabo un análisis de una variante o forma mutante de una o varias proteínas diana, en donde dicha variante o formas mutantes se reintroducen en la célula u organismo por un ácido nucleico diana exógeno como se describió anteriormente. La combinación de un gen endógeno modificado y el rescate mediante el uso de objetivo exógeno parcialmente modificado, por ejemplo, mutados, tiene ventajas en comparación con el uso de una celda modificada. Además, este método es particularmente adecuado para identificar dominios funcionales de la proteína dirigida. En una realización preferida adicional, una comparación, por ejemplo, de perfiles de expresión génica y/o proteomas y/o características fenotípicas de al menos dos células u organismos se lleva a cabo. Estos organismos se seleccionan de: (i) una célula de control u organismo de control sin inhibición del gen diana, (ii) una célula u organismo con inhibición del gen diana y (iii) una célula u organismo con inhibición del gen diana más la complementación del gen diana mediante un ácido nucleico diana exógeno.

Además, el método de complementación de ARN modificado se puede utilizar para fines preparativos, por ejemplo, para la purificación por afinidad de proteínas o complejos de proteínas de células eucariotas, particularmente células de mamíferos y más particularmente células humanas. En esta realización de la divulgación, el ácido nucleico diana exógeno codifica preferiblemente una proteína diana que se fusiona con la etiqueta de afinidad de la técnica. Este método es adecuado para el análisis del proteoma funcional en células de mamíferos, particularmente células humanas.

Otra utilidad de la presente divulgación podría ser un método para identificar la función génica en un organismo que comprende el uso de un agente de ARNi para inhibir la actividad de un gen diana de función previamente desconocida. En lugar del largo y laborioso aislamiento de los mutantes mediante la selección genética tradicional, la genómica funcional contemplaría determinar la función de los genes no caracterizados empleando la divulgación para reducir la cantidad y/o alterar el tiempo de la actividad del gen diana. La divulgación podría usarse para determinar objetivos potenciales para la industria farmacéutica, comprender los eventos normales y patológicos asociados con el desarrollo, determinar las rutas de señalización responsables del desarrollo/envejecimiento postnatal y similares. La velocidad cada vez mayor de adquirir información de la secuencia de nucleótidos de las fuentes genómicas y genéticas expresadas, incluidas las secuencias totales para los genomas de levadura, *D. melanogaster* y *C. elegans*, se puede acoplar con la divulgación para determinar la función del gen en un organismo (por ejemplo, nematodo). La preferencia de diferentes organismos para usar codones particulares, buscar en las bases de datos de productos genéticos relacionados, correlacionar el mapa de vinculación de rasgos genéticos con el mapa físico del cual se derivan las secuencias de nucleótidos, y se pueden usar métodos de inteligencia artificial para definir marcos de lectura abierta putativos. a partir de las secuencias de nucleótidos adquiridas en tales proyectos de secuenciación. Un ensayo simple sería inhibir la expresión génica de acuerdo con la secuencia parcial disponible a partir de una etiqueta de secuencia expresada (EST). Las alteraciones funcionales en el crecimiento, desarrollo, metabolismo, resistencia a enfermedades u otros procesos biológicos serían indicativos del papel normal del producto genético de EST.

La facilidad con la que se puede introducir el ARN en una célula/organismo intacto que contiene el gen objetivo permite que la presente divulgación se use en el cribado de alto rendimiento (HTS). Las soluciones que contienen agentes de ARNi que son capaces de inhibir los diferentes genes expresados pueden colocarse en pozos individuales colocados en una placa de microtitulación como una matriz ordenada, y las células/organismos intactos en cada pozo pueden analizarse para detectar cualquier cambio o modificación en el comportamiento o desarrollo debido a la inhibición de

- la actividad del gen diana. El ARN amplificado se puede alimentar directamente a la célula/organismo que contiene el gen objetivo, y se inyecta en él. Alternativamente, el agente de ARNi puede producirse a partir de un vector, como se describe en el presente documento. Se pueden inyectar vectores en la célula/organismo que contiene el gen objetivo. La función del gen diana se puede evaluar a partir de los efectos que tiene en la célula/organismo cuando se inhibe la actividad del gen. Este examen podría ser adecuado para pequeños sujetos que pueden procesarse en gran número, por ejemplo: arábidopsis, bacterias, drosophila, hongos, nematodos, virus, pez cebra y células de cultivo de tejidos derivadas de mamíferos. Un nematodo u otro organismo que produce una señal calorimétrica, fluorogénica o luminiscente en respuesta a un promotor regulado (por ejemplo, transfectado con una construcción de gen informador) puede analizarse en un formato HTS.
- La presente divulgación puede ser útil para permitir la inhibición de genes esenciales. Dichos genes pueden ser necesarios para la viabilidad de células u organismos en solo etapas particulares de desarrollo o compartimentos celulares. El equivalente funcional de las mutaciones condicionales puede producirse mediante la inhibición de la actividad del gen objetivo cuando o cuando no se requiere para la viabilidad. La divulgación permite la adición de agentes ARNi en momentos específicos de desarrollo y ubicaciones en el organismo sin introducir mutaciones permanentes en el genoma objetivo.

IX. Ensayos de cribado

- Los métodos de la divulgación también son adecuados para uso en métodos para identificar y/o caracterizar agentes farmacológicos potenciales, por ejemplo, identificando nuevos agentes farmacológicos de una colección de sustancias de prueba y/o caracterizando mecanismos de acción y/o efectos secundarios de agentes farmacológicos conocidos.
- Por lo tanto, la presente divulgación también se refiere a un sistema para identificar y/o caracterizar agentes farmacológicos que actúan sobre al menos una proteína diana que comprende: (a) una célula eucariota o un organismo no humano eucariota capaz de expresar al menos una codificación de genes diana endógena para dicha proteína diana, (b) al menos un agente de ARN capaz de inhibir la expresión de dicho al menos un gen diana endógeno, y (c) una sustancia de prueba o una colección de sustancias de prueba en las que las propiedades farmacológicas de dicha sustancia de prueba o dicha colección debe ser identificada y/o caracterizada. Además, el sistema como se describe anteriormente comprende preferiblemente: (d) al menos un ácido nucleico diana exógeno que codifica la proteína diana o una variante o forma mutada de la proteína diana en la que dicho ácido nucleico diana exógeno difiere del gen diana endógeno en el nivel de ácido nucleico, de modo que la expresión del ácido nucleico diana exógena es sustancialmente menos inhibida por el agente de ARN que la expresión del gen diana endógeno.
- Los compuestos de ensayo de la presente divulgación pueden obtenerse usando cualquiera de los numerosos enfoques en métodos de biblioteca combinatoria conocidos en la técnica, que incluyen: bibliotecas biológicas; bibliotecas de fase sólida o de fase de solución paralelas espacialmente direccionables; métodos de biblioteca sintética que requieren la desconvolución; el método de la biblioteca 'una perla de un compuesto'; y métodos de biblioteca sintética que utilizan la selección por cromatografía de afinidad. El enfoque de la biblioteca biológica se limita a las bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a las bibliotecas de compuestos de péptidos, oligómeros no péptidos o moléculas pequeñas (Lam, K. S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145).
- Se pueden encontrar ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares en la técnica, por ejemplo, en: DeWitt et al. (1993) *Proc. Natl Acad Sci. U.S.A.* 90: 6909; Erb et al. (1994) *Proc. Natl Acad Sci. USA* 91: 11422; Zuckermann et al. (1994). *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho et al. (1993) *Science* 261: 1303; Carrell et al. (1994) *Angew. Chem. Ent. Ed. Engl.* 33:2059; Carrell et al. (1994) *Angew. Chem. Ent. Ed. Engl.* 33: 2061; y en Gallop et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233.

- Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en solución (por ejemplo, Houghten (1992) *Biotechniques* 13: 412-421), o en perlas (Lam (1991) *Nature* 354: 82-84), chips (Fodor (1993) *Nature* 364: 555, 556), bacterias (Ladner USP 5,223,409), esporas (Ladner USP 409), plásmidos (Cull et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1865-1869) o en fagos (Scott y Smith (1990) *Science* 249: 386-390); (Devlin (1990) *Science* 249: 404-406); (Cwirla et al. (1990) *Proc. Natl Acad Sci.* 87:6378-6382); (Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310); (Ladner supra.)).

- En una realización preferida, la biblioteca es una biblioteca de productos naturales, por ejemplo, una biblioteca producida por un cultivo bacteriano, fúngico o de levadura. En otra realización preferida, la biblioteca es una biblioteca de compuestos sintéticos.

- Esta divulgación se ilustra con más detalle con los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes.

Ejemplos

Materiales y métodos

Preparación de lisado

Los lisados de embrión de mosca se prepararon como se describió anteriormente (Tuschl et al. 1999). Los extractos de germen de trigo se prepararon a partir de germen de trigo crudo congelado o envasado al vacío (por ejemplo, Fearn Nature Fresh Raw Wheat Germ, Bread and Circus) como se describe (Erickson and Blobel 1983). El extracto se centrifugó a 14.500 g a 4°C durante 25 minutos; Luego, el sobrenadante se congeló en partes alícuotas en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C. Para el extracto de coliflor, la capa exterior de coliflor fresca (Shaws Supermarket) se recogió con una cuchilla de afeitar y se trituró hasta obtener un polvo bajo nitrógeno líquido en un mortero y luego se homogeneizó con 3 ml de tampón de lisis 1x (acetato de potasio 100 mM), HEPES-KOH 30 mM a pH 7.4, acetato de magnesio 2 mM) que contiene ditioneitol 5 mM (DTT) y 1 mg/ml de Pefabloc SC (Boehringer Mannheim) por gramo de tejido vegetal. El extracto se centrifugó y el sobrenadante se almacenó como se describe para el lisado de embrión de *Drosophila*.

Análisis del procesamiento de ARNbc

Para el análisis del procesamiento de ARNbc, se incubaron 5 nM de ARNbc marcado con α -32P-UTP internamente en una reacción de 10 μ L que contenía 5 μ L de lisado de embrión de *Drosophila* (Tuschl et al. 1999) o germen de extracto de trigo, 100 μ M de GTP, 500 μ M de ATP, 10 mM de fosfato de creatina, 10 μ M g/ml de creatina fosfocinasa, 5 mM de DTT y 0,1 U/ μ L de RNasin (Promega) a 25°C durante 3 h. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 2 x tampón de proteinasa K [Tris-HCl 200 mM a pH 7.5, EDTA 25 mM, NaCl 300 mM, dodecilsulfato de sodio al 2% (p/v)] y se desproteinizaron con ~2 mg/ml de proteinasa K a 65°C durante 15 min. Los productos se precipitaron con 3 volúmenes de etanol frío y se analizaron por electroforesis en un gel de secuenciación de poliacrilamida al 15%.

Gel de filtración y protección de ARNasa

Internamente, los ARNbc marcados con α -32P-UTP se incubaron en extracto de germen de trigo, luego se desproteinizaron a temperatura ambiente con proteinasa K (1 h) y se precipitaron con 3 volúmenes de etanol frío. El ARN se resuspendió en 1 x tampón de lisis y se analizó por filtración en gel como se describe (Nykänen et al. 2001). Para la protección de la ARNasa, los productos de ARN de una reacción de extracto de germen de trigo de 10 μ L se desproteinizaron a temperatura ambiente y se analizaron por protección de ARNasa esencialmente como se describe (Sambrook et al. 1989). Brevemente, los gránulos de ARNip se disolvieron en 10 μ L de tampón de digestión de ARNasa (NaCl 300 mM, Tris-HCl 10 mM a pH 7.4 y EDTA 5 mM a pH 7.5) que contenía [beta]-glicerofosfato 10 mM, 5 mM ATP, 0-6.6 U de RNasa A, y 0-1.1 U de ARNasa T1. Para los experimentos de control, los ARNip sintéticos, de doble cadena radiomarcados en 5'-32P se mezclaron con los productos de una reacción de germen de trigo realizada con ARNbc sin marcar y se coprecipitaron con 3 volúmenes de etanol frío. La protección de la ARNasa fue a 25°C durante 1 h, se detuvo agregando 0.6 μ L de SDS al 10% y 0.3 μ L de 20 mg/mL de proteinasa K, luego se incubó a 25°C por 1 h. Las reacciones se ajustaron luego a 200 μ L con 2x de tampón PK que contenía 0.2 mg/ml de glucógeno (Roche), se extrajeron con un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1; v/v/v) Se precipitó con 3 volúmenes de etanol frío y se analizó en un gel de poliacrilamida con secuenciación al 15%.

ARNip sintéticos utilizados como inhibidores

El inhibidor de ARNip de 21-nt comprendía CGUACGCGGAAUAC UUCGA (5-Yodo-U)U hibridado con UCGAAGUAUUCGCGUACGUG; el 25-mer comprendió AUCACGUACGCGGAAUACUUCGA (5-Iodo-U) U hibridado con UCGAAGUAUUCGCGUACGUGAUUG. Los nucleótidos 5-yodo-U se incluyeron para facilitar los estudios que no se presentan aquí, y no tenemos pruebas de que aumenten la eficacia de los ARNip como inhibidores.

Análisis de la actividad de RdRP

Los ensayos se realizaron en un volumen final de 10 μ L que contenía 5 μ L de lisado, 100 μ M GTP, 100 μ M CTP, 500 μ M ATP, 20 μ M UTP, 5 μ Ci de α -32P-UTP (25 Ci/mmol), 10 mM de fosfato de creatina, 10 μ g/ml de creatina fosfocinasa, 5 mM de DTT, 0.2 U/ μ L de Super-RNasina (Ambion), y 7-metil-G- o A-tapado RNAs. Después de la incubación a 25°C durante 3 h, la reacción se desproteinizó con proteinasa K en 200 μ L de tampón de proteinasa K 2x a 65°C durante 15 min. Después de la extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, la fase acuosa se precipitó con 3 volúmenes de etanol frío, se resuspendió en 10 μ L de tampón de carga de formamida 2x como se describe (Sambrook et al. 1989) y se resolvió en 10% o 15% de geles de secuenciación de poliacrilamida. Para los ensayos cebados, los ARN tapados se preincubaron con cebadores de ARN de 21 nt de cadena simple o dúplex de ARNip a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de agregar los componentes de reacción restantes.

Arabidopsis PHV, PHB y ARN diana PHV mutante

Las secuencias de ADNc de Arabidopsis PHV y PHB que contienen las secuencias complementarias de miR165/166 se amplificaron a partir de una biblioteca de ADNc de flor de Arabidopsis (CD4-6) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes pares de cebadores: cebador 5'-PHV,

GCGTAATACGACTCACTATAGGCGCCGGAACAAGTTGAAG (SEQ ID NO: 7), y cebador 3'-PHV, GACAGTCACGGAACCAAGATG (SEC ID NO: 8); o cebador 5'-PHB, GCGTAATACGACTCACTATAGGTGAGTCTGTGGTCGTGAGTG (SEQ ID NO: 9), y cebador 3'-PHB, GCTGCTGCTAAAGTCGTAGGA (SEQ ID NO: 10). La Arabidopsis G [flecha derecha]. Se amplificó inicialmente una
 5 plantilla phv mutante utilizando el cebador 5'-PHV y CCACTGCAGTTGCGTGAAACAGCTACGATACCAATAGAATCCGGATCAGGCTTCATCCC (SEQ ID NO: 11). Este producto de PCR se diluyó 100 veces, luego se reamplificó con el cebador 5'-PHV y GACAGTCACGGAACCAAGATGGACGATCTTTGAGGATTTTCAGCGACCTTCATGGGTTCTAAACTCAGAGGCCA CAGGCACGTGCTGCTATTCCACTGCAGTTGCGTGAAACAGC (SEQ ID NO:12). La transcripción de ARN in vitro y
 10 el marcado de la tapa fueron los descritos (Tuschl et al. 1999; Zamore et al. 2000). Transcripción de ARN in vitro y etiquetado de tapa fueron como se describió (Tuschl et al. 1999; Zamore et al. 2000).

ARNi in vitro en lisado de embrión de mosca y extracto de germen de trigo

Para ARNi en lisado embrionario de Drosophila, cuatro dúplex de ARNip se sintetizaron químicamente (Dharmacon), se hibridaron y se incubaron en una reacción de ARNi estándar (Zamore et al. 2000). Las secuencias de los ARNip
 15 (cadenas sentido y antisentido) correspondientes a miR165, miR166, PHV y las posiciones de diana phv mutantes fueron miR165, UCGGACCAGGCUUCAUCCCC (SEQ ID NO: 13) y GGGAUGAAGCCUGGUCCGAGG (SEQ ID NO: 14); miR166, UCGGACCAGGCUUCAUCCCC (SEQ ID NO: 15) y GGGAUGAAGCCUGGUCCGAGA (SEQ ID NO: 16); PHV, CCGGACCAGGCUUCAUCCAA (SEQ ID NO: 17) y GGGAUGAAGCCUGGUCCGGAU (SEQ ID NO: 18); y mutante phv, CCGGAUCAGGCUUCAUCCAA (SEQ ID NO: 19) y GGGAUGAAGCCUGAUCCGGAU (SEQ ID
 20 NO: 20). Las reacciones de división diana del extracto de germen de trigo fueron como reacciones de ARNi in vitro de Drosophila estándar, excepto que no se agregaron ARNip exógenos.

Aislamiento de ARN total y análisis de Northern

El ARN total se aisló de los lisados y el análisis Northern se realizó como se describe (Hutvagner y Zamore 2002). Se utilizó ARNip antisentido miR165 sintético radiomarcado 5'-32 P- como sonda.

25 Resumen de los Ejemplos I-VI

Los datos presentados en los Ejemplos I-VI demuestran que los extractos de germen de trigo, introducidos para el estudio de la traducción y la translocación de proteínas en la década de 1970 (Roberts y Paterson 1973), recapitulan muchas de las características clave del silenciamiento de ARN en plantas. Usando este sistema in vitro, se muestra
 30 que, en las plantas, las enzimas similares a Dicer y dependientes de ATP dividen el ARNbc en pequeños ARN que tienen la estructura de los ARNip. A diferencia de los embriones de Drosophila o las células de mamíferos, las plantas convierten el ARNbc en dos clases distintas de ARNip, ARNip largos y cortos. Los estudios con inhibidores indican que una enzima similar a Dicer genera cada clase de ARNip.

Los datos demuestran además que una actividad de RdRP de trigo puede sintetizar ARNbc utilizando ARN de cadena sencilla exógena como plantilla sin un cebador exógeno, y que este ARNbc se convierte preferentemente en ARNip
 35 largos.

Finalmente, se demuestra que los extractos de germen de trigo contienen un RISC endógeno programado con un miARN. Este complejo de miARN endógeno puede dirigir la división eficiente de la secuencia de ARNm de PHAVOLUTA (PHV) de Arabidopsis de tipo silvestre, pero no la de un mutante de PHV dominante previamente descrito que perturba el desarrollo de la hoja. Este hallazgo apoya la opinión de que, en plantas, los ARNi directos dirigen ARNi
 40 y explica las bases moleculares de la mutación de PHV dominante en Arabidopsis. Curiosamente, la complementariedad exacta entre el miARN y el ARNm objetivo no es necesaria para que el miARN dirija la división eficiente del objetivo. De hecho, se demuestra que la eficiencia de la división es mayor cuando un par de bases G: U, también conocido como una oscilación de G:U, está presente cerca del extremo 5' o 3' del complejo formado entre el miARN y el objetivo. La comprensión del mecanismo natural mediante el cual la eficiencia de los miARN media en el
 45 ARNi en las plantas permite el diseño de agentes ARNi mejorados para su uso en la mediación del ARNi no solo en las plantas, sino también en los eucariotas (en particular, en los mamíferos).

Ejemplo I: Dos clases distintas de ARN pequeños derivados de ARNbc en extractos de plantas

Se producen dos clases distintas de ARN pequeños en plantas transgénicas que tienen transgenes silenciados (Hamilton et al. 2002; Mallory et al. 2002). Para probar si la producción de estas dos clases de ARN pequeños fue una
 50 característica normal de la biología de la planta o una respuesta especializada al ADN extraño, se examinó la distribución de longitud de un conjunto no redundante de 423 ARN pequeños endógenos clonados de Arabidopsis thaliana. (Para las secuencias de 143 de los ARN pequeños, ver Llave et al. 2002a; Reinhart et al. 2002). Se excluyen de este análisis los fragmentos clonados de ARNt y ARNr. Se incluyen en el conjunto miARN conocidos y predichos, así como pequeños ARN de función desconocida que corresponden a regiones intragénicas o a secuencias de ARNm

en sentido sentido o antisentido. La distribución de longitudes dentro de este conjunto fue bimodal, con picos a 21 y 24 nt (Figura 1A). En contraste, la distribución de longitud de los pequeños ARN clonados de *C. elegans* forma un solo pico amplio (Lau et al. 2001). Se propuso que las dos clases de ARN pequeños derivados de la proteína fluorescente verde (GFP) fueran ARNip con distintas funciones de silenciamiento del ARN: los ~21-meros para dirigir el silenciamiento postranscripcional mediante la degradación del ARNm y los ~24-meros para activar el silenciamiento sistémico y la metilación de homólogos ADN (Hamilton et al. 2002). El análisis de las dos clases de pequeños ARN endógenos indica que cada clase tiene un sesgo de secuencia distinto, con una 5'-uridina que predomina en la clase más corta y una 5'-adenosina en la clase más larga (Figura 1B). El sesgo de secuencia 5' de la clase corta se produce mediante la inclusión en el conjunto de datos de miARN, que en plantas y animales generalmente comienzan con uridina (Lagos-Quintana et al. 2001, 2002; Lau et al. 2001; Lee y Ambros 2001; Reinhart et al. 2002). Por lo tanto, los ARN pequeños no miARN en la clase más corta muestran un sesgo de secuencia no 5', mientras que una 5'-adenosina está representada en exceso en la clase más larga. Las dos clases son generadas por diferentes enzimas, funcionan en complejos de efector separados, o ambos.

Ejemplo II: Los ARN de plantas pequeñas son ARNip auténticos

Aunque los pequeños ARN que se correlacionan con el silenciamiento postranscripcional de los ARNm diana homólogos se descubrieron por primera vez en plantas (Hamilton y Baulcombe 1999), aún no se ha demostrado que sean los productos directos de la división endonucleolítica del ARNdc largo. Para comenzar a probar si los ARN pequeños son, de hecho, ARNsi, preparamos extractos de plantas y los monitoreamos para detectar actividad similar a Dicer. Cuando el ARNbc radiomarcado uniformemente con ³²P se incubó en extracto de germen de trigo, se dividió de manera eficaz en pequeños ARN (Figura 2A). Como se informó anteriormente para extractos de *Drosophila* (Zamore et al. 2000) y para *Drosophila* purificada (Bernstein et al. 2001) y Dicer humano (Billy et al. 2001), no se detectaron productos intermedios en la conversión de ARNbc en RNAs pequeños. A diferencia de las reacciones de mosca y humana Dicer, se produjeron dos clases de tamaño discreto, una de ~21 nt y la otra de 24-25 nt, a partir del ARNbc tras la incubación en extracto de germen de trigo (Figura 2B). La proporción de trigo de 24-25 mers a ~21 mers en 14 reacciones separadas fue de 4 ± 1.7 , similar a un exceso de aproximadamente 2.5 veces más de secuencias de ARN pequeñas más largas clonadas de *Arabidopsis*. (El exceso de 2.5 veces de los ARN pequeños endógenos clonados de largo a corto subestima la proporción, porque incluye los miARN, que son predominantemente cortos). Hasta el momento, los pequeños ARN relacionados con el silenciamiento solo se han demostrado in vivo para dicotiledóneas, y el trigo es una monocotiledónea. Los extractos de la coliflor dicotiledónea, un miembro de la familia de la mostaza como *Arabidopsis*, también convirtieron el ARNbc en dos tamaños discretos de pequeños ARN, ~21 y ~24 nt (Figura 2C). Tanto en *Drosophila* como en *C. elegans*, Dicer requiere ATP para la producción eficiente de ambos ARNip (Zamore et al. 2000; Bernstein et al. 2001; Nykänen et al. 2001) y miARN (Hutvagner et al. 2001; Ketting et al. 2001). Consistente con la idea de que los ortólogos vegetales de Dicer producen ambas clases de ARN pequeños, la producción eficiente de ambos ARN pequeños de ~21 nt y ~24 nt en el extracto de germen de trigo requirió ATP (Figura 2D).

Aunque los ARN pequeños asociados con el silenciamiento en las plantas se llaman comúnmente ARNsi, y los dúplex de ARNip sintéticos inician el silenciamiento del ARN de la planta (Klahre et al. 2002), no se ha demostrado que los ARN pequeños de la planta sean ARN de doble cadena con 2-nt, 3' extremos sobresalientes y extremos 3'-hidroxilo. Tales atributos reflejan la producción única de ARNip por parte de miembros de la familia Dicer de enzimas ribonucleasa III. Para determinar si los pequeños ARN generados a partir de ARNdc en extractos de germen de trigo eran ARNip auténticos, analizamos su estructura. El ARNbc radiomarcado uniformemente con ³²P se incubó en extracto de germen de trigo, se desproteinizó y se fraccionó por filtración en gel para resolver el ARNip de cadena sencilla desde el de doble cadena (Nykänen et al. 2001). Ambas clases de pequeños productos de ARN de la reacción de germen de trigo in vitro se combinaron con un dúplex de ARNip sintético y con los dúplex de ARNip de *Drosophila* generados por el procesamiento de ARNbc en lisado de embrión de *Drosophila* (Figura 2E). Por lo tanto, los pequeños ARN generados por la incubación de ARNbc en extracto de germen de trigo son de doble cadena.

A continuación, examinamos la estructura final de los ARN pequeños. El tratamiento de los dúplex de ARNip sintéticos radiomarcados en 5'-³²P con las nucleasas específicas de ARN de cadena simple T1 y RNasa A elimina los extremos sobresalientes 2-nt y 3' típicos de los ARNsi, generando ARN más cortos de 1-nt y 2-nt. En un gel de poliacrilamida desnaturante, tales productos de las nucleasas de los ARNip migran más rápido, porque contienen 3'-fosfatos (diagramados en la Figura 2F). Cuando los dúplex de 25-nt sintéticos con salientes 3' 2-nt y 3' se digirieron con T1 y RNasa A, se generaron los productos fosforilados en 3', 24-nt y 23-nt esperados (Figura 2G). Los ARN pequeños producidos por la incubación de ARNbc en el extracto de germen de trigo son una mezcla de especies de ~21-nt y 24-25-nt. La digestión de esta mezcla con nucleasas de cadena sencilla produjo una población de especies de ARN de migración más rápida cuya distribución de longitud es consistente con la mezcla original que tiene los salientes de cadena sencilla y las características corporales de cadena doble de los ARNip (Figura 2G). Ambas clases de tamaño de pequeños ARN producidos después de la incubación del ARNdc en extracto de germen de trigo tienen extremos 2', 3'-hidroxilo y 5' monofosfato (datos no mostrados). En resumen, los ARN pequeños tienen todas las características de los productos de la división mediada por Dicer del ARNbc. Se concluye que son ARNip de buena fe.

Ejemplo III: Diferentes enzimas similares a Dicer producen cada clase de ARNip

Hay al menos dos mecanismos por los cuales el ARNbc largo se puede convertir en plantas en clases de tamaños distintos de ARN pequeños. La secuencia local del ARNbc podría determinar la longitud del ARNip, independientemente de qué ortólogo de Dicer separa el ARNbc. En este caso, anticipamos que las dos clases de ARN pequeños tendrían composiciones de secuencia distintas. En cambio, solo los extremos 5' de las dos clases muestran un sesgo de secuencia (FIG. 1B). Una explicación alternativa es que diferentes ortólogos de Dicer producen cada clase. Tanto los genomas de Arabidopsis como los de arroz codifican al menos cuatro proteínas similares a Dicer diferentes, incluida la proteína de Arabidopsis CARPEL FACTORY/SHORT INTEGUMENTS-1 (CAF). El número de ortólogos de Dicer de trigo es actualmente desconocido, debido a que el genoma del trigo hexaploide aún no se ha secuenciado.

Drosophila Dicer se une fuertemente a los ARNip (P. D. Zamore y B. Haley, inédito). Por lo tanto, razonamos que diferentes ortólogos de Dicer podrían ser inhibidos diferencialmente por sus productos, ARNip. Probamos la capacidad de los dúplex de ARNip sintéticos de 21-nt y 25-nt para inhibir la producción de ARNip en lisados de embrión de Drosophila y la producción de las dos clases distintas de ARNip en extracto de germen de trigo. Drosophila Dicer produce ARNip de 21-22 nt de longitud. Drosophila Dicer se inhibió más fuertemente con un dúplex de ARNip de 21-nt que con un 25-mer (Figura 3A). A la inversa, la producción de ARNip de 24-25-nt por extracto de germen de trigo fue inhibida más fuertemente por un competidor dúplex ARNip sintético de ~25 nt que un 21-mer (Figura 3B). Estos resultados son consistentes con la idea de que el producto de ARNip auténtico de Dicer debería unirse más fuertemente a su sitio activo que un ARNip de una longitud no auténtica. Sorprendentemente, la producción de los ARNip de ~21-nt fue completamente refractaria a la inhibición por dúplex de ARNip sintéticos de 21-nt o 25-nt, a concentraciones de ARNip tan altas como 800 nM (Figura 3B). La explicación más simple para estos datos es que una enzima similar a Dicer genera cada clase de ARNip y que la enzima responsable de producir los ARNip de 24-25-nt está fuertemente inhibida por su producto de ARNip, mientras que la enzima que produce el 21-nt ARNip no es inhibido por el producto ARNip en las concentraciones analizadas. Una explicación alternativa es que la concentración de la enzima que produce los 21-mers es más alta que la concentración más alta de inhibidor que probamos, 800 nM. Para que esto sea cierto, la enzima debería estar presente a una concentración micromolar en el extracto, lo que parece poco probable, ya que correspondería al ~1% de la proteína total. El hallazgo de que la producción de ambas clases de ARNip fue inhibida igualmente y fuertemente por un competidor largo de ARNbc (Figura 3C) también apoya un argumento en contra de esta visión. Si la enzima que genera los ~21-mers estaba presente en el extracto a una concentración muy alta, su actividad no debería haber sido competida por las mismas concentraciones de competidor ARNbc largo que saturan la enzima que produce los productos de 24-25-nt. Se concluye que cada clase de ARNip es producida por la división endonucleolítica dependiente de ATP de ARNbc por un ortólogo de Dicer diferente.

Ejemplo IV: Una actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN en extractos de germen de trigo

La evidencia genética implica una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) en PTGS activada por transgenes que expresan ARNm sentido (S-PTGS; Dalmay et al. 2000; Mourrain et al. 2000). Los RdRP de planta se han propuesto para generar ARNbc a partir de ARN de cadena sencilla expresado aberrantemente, lo que lleva a la producción de ARNip que silencian ese ARN (Vaucheret et al. 2001). Aún no se ha presentado evidencia bioquímica directa que demuestre que tal ruta es plausible.

Los extractos de germen de trigo contienen una actividad RdRP (FIG. 4). Las concentraciones crecientes de ARN de cadena sencilla se incubaron con el extracto y los trifosfatos de ribonucleótido, que incluye un α -³²P-UTP. El ARN de cadena sencilla varió de 77 a 501 nt, ya sea con una estructura de tapa de 7-metil-G(5')ppp(5')G o A(5')ppp(5'), todo ello llevó a la incorporación de ³²P en ARN con aproximadamente la misma longitud que el ARN de cadena sencilla no radioactivo exógeno (Figura 4). Estos ARN radiactivos corresponden al ARN complementario (ARNc) bona fide generado por un RdRP que copió el ARN de cadena sencilla iniciando la síntesis de ARN en el extremo 3' al final del ARN de la plantilla exógena (datos no mostrados). En teoría, estos nuevos ARN radiactivos podrían haber surgido mediante la transferencia de radiomarcador al propio ARN de entrada. Este tipo de transferencia de etiquetas se había observado previamente cuando se realizaron experimentos similares con lisados de embrión de Drosophila, pero no con extracto de germen de trigo. En cambio, el ³²P-ARN representa un ARNc recién sintetizado producido por una enzima de trigo que utiliza ARN de una sola cadena exógeno como plantilla en ausencia de un cebador de ácido nucleico exógeno.

Además de copiar el ARN de cadena sencilla en un ARNc de longitud completa, también se ha informado que las RdRP extienden los cebadores, utilizando el ARN de cadena sencilla como plantilla (por ejemplo, Schiebel et al. 1998). La actividad de RdRP o las actividades en el extracto de germen de trigo podrían extenderse de manera similar a un cebador radiomarcado con ³²P (Figura 5A), pero solo cuando el cebador de ARN era complementario (antisentido) a la plantilla de ARN. En condiciones idénticas, no se detectó tal actividad de extensión del cebador en lisados de embriones de Drosophila de blastodermo sincitial, a pesar de informes anteriores en contrario (Lipardi et al. 2001). Sin embargo, cuando se mezclan extractos de trigo y mosca (Fig. 5A), se detectó actividad dependiente de ARN, cebador-extensión. Ni en el lisado embrionario de Drosophila ni en el extracto de germen de trigo podemos detectar la extensión del cebador de una plantilla de ARN de una sola cadena utilizando un dúplex de siARN de 21-nt en lugar de un cebador antisentido de 21-nt.

Se propone que el ARN de cadena sencilla aberrante desencadena el silenciamiento en las plantas cuando sirve como plantilla para la producción de ARNc, generando ARNds, que luego puede ser dividido por Dicer en dúplex de ARNsi. Estos datos sugieren que dicha copia no requiere cebadores, sino que se desencadena simplemente por una concentración excepcionalmente alta de ARN de cadena sencilla. Para probar si las altas concentraciones de ARNm de cadena sencilla podrían conducir a la producción de ARNsi, las reacciones de RdRP se repitieron utilizando un ARNm de luciferasa de luciérnaga de cadena sencilla de 2.7 kb. Las concentraciones crecientes del ARNm se incubaron en extracto de germen de trigo o en lisado embrionario de *Drosophila* en presencia de ATP, CTP, GTP y [alpha]-32P-UTP, y se examinaron para la producción de ARN radiactivos de 21-25-nt. La figura 5B (izquierda) muestra que cuando las incubaciones se realizaron en lisados de germen de trigo, se produjo una única clase de ARN pequeño, de ~24 nt de largo, con concentraciones crecientes del ARN molde exógeno de una sola cadena. No se observó tal producto radioactivo en los lisados de embriones de *Drosophila*, pero se observa que estos lisados contienen UTP endógena, lo que puede impedir la detección de pequeños ARN de 32P. Para probar si los productos de ~24-nt radiomarcados se generaron mediante la síntesis de novo de ARN, se repitió el experimento, reemplazando CTP y GTP con 3'-deoxi CTP y 3'-deoxi GTP, inhibidores de la síntesis de ARN. En presencia de estos inhibidores, no se observaron ARN pequeños radioactivos en la reacción del trigo (Figura 5B, derecha). Por lo tanto, el ARN de cadena sencilla puede desencadenar en el extracto de germen de trigo la síntesis de novo de pequeños ARN de ~24-nt.

En particular, la producción de ARN de 21-nt no se detectó en este ensayo. El ensayo debería haber detectado dichos ARN pequeños de 21-nt si estuvieran presentes en 1/10 de la concentración de los ~24-mers, pero sería poco probable que los detectáramos muy por debajo de este umbral. Los experimentos con ARN de doble cadena sugieren que los 21-mers se producen en el trigo a aproximadamente 1/4 de la velocidad de los ARN pequeños de 24-25-nt (Fig. 2). Por lo tanto, la producción de ARNbc por la actividad RdRP se puede acoplar a la producción de la clase más larga de ARN pequeños. Se observa que dicho acoplamiento no implica que la producción de ARNip de ~24-nt a partir de ARNdc exógeno requiera la participación de un RdRP. Se propone que el ARNbc generado por la copia RdRP de ARN de cadena sencilla sea procesado preferentemente por un ortólogo de trigo Dicer que produce ARNip largos, quizás porque las dos proteínas están físicamente vinculadas.

A continuación, se abordó la cuestión de si los ARN de ~24-nt sintetizados en las reacciones de RdRP son productos reales de la división de Dicer del ARNbc. La producción de ARNip de 24-25-nt de trigo a partir de ARNb radiomarcado con 32P se inhibe eficazmente mediante dúplex de ARNip sintéticos; Los dúplex de ARNip sintéticos de 25-nt son inhibidores más potentes que los dúplex de 21-nt (Figura 3B). Por lo tanto, se realizó un experimento para determinar si la producción de los ARN pequeños de ~24-nt en las reacciones de RdRP se inhibía de manera similar mediante dúplex de ARNip sintéticos. La figura 5C muestra que la producción de ARN pequeños de ~24-nt en las reacciones de RdRP programadas con una plantilla de ARN de cadena simple de 2,7 kb fue inhibida por los dúplex de ARNip sintéticos. Al igual que la producción de ARNip de 24-25-nt a partir de ARNdc exógeno, la producción de ~24-mers sintetizados de novo se inhibió en mayor medida mediante dúplex de ARNip sintético de 25-nt que por dúplex de 21-nt (Figura 5C). La inhibición a medias de la producción de ARN pequeño en las reacciones dependientes de RdRP se produjo aproximadamente en la misma concentración de dúplex de ARNip sintético que la inhibición del procesamiento de ARNbc 32P (ver las figuras 5C y 3B). Se concluye que, en el extracto de germen de trigo, el ARN de cadena sencilla exógeno proporciona la plantilla para la síntesis de ARNc por un RdRP y que el híbrido plantilla-ARN:ARNc resultante se escinde preferentemente en ARNip de ~24-nt por una enzima de tipo Dicer.

40 **Ejemplo V: Los miARN actúan como ARNip en plantas**

Además de los ARNip, otra clase de ARN pequeños, microARN (miARN), se ha detectado en plantas (Llave et al. 2002a; Park et al. 2002; Reinhart et al. 2002). Al igual que sus contrapartes animales, los miARN de plantas son generados por un miembro de la familia Dicer, CAF. Los miARN se codifican en los ARN precursores de bucle troncal que son divididos por CAF en pequeños ARN de cadena simple de 21-24-nt (Park et al. 2002; Reinhart et al. 2002). Los precursores de miARN exógenos no se procesaron fielmente en miARN maduros en el extracto de germen de trigo (datos no mostrados). En cambio, los pre-miARN transcritos in vitro se dividieron en pequeños ARN demasiado largos para corresponder a los auténticos miARN maduros. Quizás el ortólogo de Dicer responsable de la maduración de miARN en CAF de trigo presumiblemente está ausente de los extractos de germen de trigo. En *Arabidopsis*, se han informado transcripciones de CAF que codifican una proteína con una señal de localización nuclear, lo que sugiere que la proteína CAF puede ser nuclear (Jacobsen et al. 1999). Debido a que los extractos de germen de trigo son esencialmente citoplasma, el CAF nuclear podría no estar presente en el extracto.

Los miARN de plantas difieren de los miARN de animales en que hay secuencias de ARNm correspondientes en los genomas de *Arabidopsis* y arroz con una complementariedad significativa con las secuencias de miARN (Llave et al. 2002a, b; Reinhart et al. 2002; Rhoades et al. 2002). El alto grado de complementariedad entre 14 miARN de plantas analizadas recientemente y familias específicas de ARNm de plantas de gran importancia en el desarrollo llevó a la propuesta de que los miARN de plantas directamente controlaran la destrucción de ARNm (Rhoades et al. 2002). Es decir, una vez que los miARN de la planta son generados por la división de pre-miARN por CAF, ingresan a la ruta de ARNi y funcionan como ARNip. En contraste, se cree que los miARN animales actúan como represores de la traducción (para revisión, ver Ruvkun 2001). Una característica no probada de esta propuesta es que una ruta similar

a ARNi en plantas tolera los tres o cuatro emparejamientos incorrectos observados a veces entre un miARN y su objetivo de ARNm predicho.

Si los miARN de plantas son mediadores endógenos de ARNi, entonces los extractos de germen de trigo deben contener complejos programados por miARN que especifiquen la división endonucleolítica de los ARN diana correspondientes. En particular, miR165 ha sido propuesto para regular a la baja la expresión de ARNm de PHV y PHABULOSA (PHB) en Arabidopsis por un mecanismo similar a ARNi (Rhoades et al. 2002). PHV y PHB codifican los factores de transcripción de la cremallera de homeodominio-leucina implicados en la percepción de la posición radial en los tejidos del brote que dan lugar a las hojas (McConnell y Barton 1998; McConnell et al. 2001). Las mutaciones *phv* y *phb* dominantes alteran un solo aminoácido (glicina → ácido glutámico) en el dominio de unión a esterol/lípido de las proteínas, lo que sugiere que el fenotipo mutante es el resultado de un cambio en la función de PHV y PHB (McConnell y Barton 1998; McConnell et al. 2001). Sin embargo, el descubrimiento de miARN de plantas complementarios a este sitio en PHV condujo a la sugerencia de que la base molecular de la dominancia es la persistencia de la expresión de PHV y PHB en las etapas de desarrollo cuando estos ARNm se destruyen normalmente (Rhoades et al., 2002). Esta hipótesis es coherente con el aumento de los niveles generales de ARNm de PHB en el mutante dominante y el aumento de la actividad de un ARNm de *phb* mutante dominante en el dominio abaxial, en lugar de en el adaxial, del primordio de la hoja (McConnell y Barton 1998; McConnell et al. 2001).

miR165 o miR166 está presente en extractos de germen de trigo (Figura 6A). miR165 y miR166 difieren en una única transición de C a U que disminuye la complementariedad de miR166 a PHV y PHB al cambiar un par de bases G:C a una oscilación G:U. El arroz (*Oryza*) es el genoma secuenciado más estrechamente relacionado con el trigo. Aunque el genoma del arroz no codifica un homólogo de miR165, codifica seis copias de miR166 (Reinhart et al. 2002). Debido a que las condiciones de hibridación Northern utilizadas aquí no pueden distinguir entre miR165 y miR166, el miARN endógeno de trigo se denomina miR165/166.

Para comenzar a probar la hipótesis de que los miARN de la planta funcionan para regular la expresión del gen diana mediante un mecanismo similar a ARNi, se prepararon ARN diana que codifican una porción de la secuencia de tipo silvestre de Arabidopsis PHV o la mutación puntual dominante de G → A, que cae dentro de las secuencias de PHV propuestas para emparejarse con miR165/166. Los ARN diana y los miARN relevantes se muestran en la FIG. 6C. Los ARN diana marcados en 5' se incubaron con extracto de germen de trigo y luego se analizaron en un gel de secuenciación desnaturalizante. En ausencia de cualquier otro ARN exógeno, el ARN objetivo de PHV de tipo silvestre, pero no el mutante dominante de G → A, se dividió de manera eficiente dentro de la región complementaria de miR165/166 (Fig. 7A, B). Esta región de 21-nt es idéntica en PHV y PHB, y un ARN diana que contenía la secuencia del ARNm de Arabidopsis PHB también se dividió dentro de las secuencias complementarias de miR165/166 tras la incubación en el extracto de germen de trigo (datos no mostrados). En la ruta de ARNi, una característica clave de la pequeña destrucción dirigida por ARN es que el pretratamiento con la enzima específica de ácido nucleico de cadena sencilla, la nucleasa microcócica, elimina la actividad RISC (Hammond et al. 2000). La división del ARN objetivo de PHV también fue abolida por el tratamiento previo del extracto con nucleasa microcócica (datos no mostrados), de acuerdo con la opinión de que miR165/166 actúa como una guía para la división directa del objetivo. La diferencia en la tasa de división entre los ARN diana de tipo silvestre y mutante, que difieren solo en un solo nucleótido, fue >14 veces (Figura 7B). Por lo tanto, la resistencia del ARN del *phv* mutante a la división por una nucleasa tipo ARNi endógena puede explicar por qué la mutación es dominante.

A continuación, se analizó la división del ARN diana de PHV por varios ARNip en lisado de embrión de *Drosophila* (Figura 6C). Un ARNip con una complementariedad perfecta con el sitio predicho para emparejarse con miR165/166 y un ARNip dúplex en el que una cadena tenía la secuencia de miR165 o miR166 división dirigida del ARN diana del PHV, que produce el producto 5' de división 514-nt predicho (FIG. 7C). Ninguno de estos tres ARNip dividió eficientemente la diana mutante de PHV (Figura 7C). La cuantificación de la división mediada por el ARNip con complementariedad perfecta en comparación con la mediada por miR165 demuestra que miR165 media más eficazmente la división diana. Se supone que esto se debe al hecho de que miR 165 forma dos pares de bases oscilantes G:U con el ARNm objetivo, uno en la posición 1 y otro en la posición 17 (con respecto al extremo 5' de la cadena de ARNip antisentido) (FIG. 8).

El fracaso del dúplex miR165-ARNip para escindir el PHV mutante fue una consecuencia directa de su reducida complementariedad con el ARN diana en la posición 6 (con respecto al extremo 5' de la cadena de ARNip antisentido), debido a que un ARNip con perfecta complementariedad con la secuencia mutante (Figura 6B) dividió eficazmente el ARN mutante (Figura 7C). El producto de división 5' producido en las reacciones de ARNi programadas con ARNip comigraba con el producido cuando el ARN diana de PHV se incubaba en extracto de germen de trigo sin ARNip exógeno (Figura 7C).

La explicación más simple para la especificidad de secuencia de la nucleasa es que está guiada por miR165/166: la división requiere un componente de ácido nucleico, ocurre en el mismo sitio en el ARN diana del PHV como lo indica un dúplex ARNip con la secuencia de miR165 o miR166 en lisado embrionario de *Drosophila* y, como el ARNip, es ineficaz con el ARN Gv mutante G → A. En la ruta de ARNi, un complejo de endonucleasa programado con ARNip se

llama RISC (Hammond et al. 2000). Estos datos sugieren que el miR165/166 de trigo está en un RISC, apoyando la propuesta de que los miARN de las plantas regulan la expresión de sus dianas de ARNm por ARNi endógeno.

Ejemplo VI: miR165/166 dirige múltiples rondas de división diana

5 La siguiente pregunta que se abordó fue si el RISC programado para miR165/166 actúa como una enzima. La hibridación Northern cuantitativa demuestra que las reacciones del extracto de germen de trigo contenían 0.083 nM de miR165/166 (Figura 6B). La concentración de ARN objetivo en estas reacciones fue de 5 nM, y más de la mitad del ARN objetivo se destruyó en 80 minutos (Figura 7A). Por lo tanto, cada miR165/166 ARN dirigió la división de ~30 moléculas de ARN diana. Por lo tanto, el RISC programado con miR165/166 es una enzima de recambio múltiple.

Discusión

10 Los datos anteriores muestran que los extractos de germen de trigo recapitulan in vitro muchos aspectos del silenciamiento del ARN en las plantas. Los extractos de germen de trigo convierten el ARNbc exógeno en dos clases distintas de ARN pequeños. El análisis detallado de estos ARN pequeños indica que son ARNip auténticos. Por lo tanto, los ARNip de plantas se derivan directamente de ARNdc más largos, al igual que en los animales. Los datos indican que distintas enzimas similares a Dicer generan las dos clases funcionalmente distintas de ARNsi. Los datos
15 pequeños endógenos clonados de Arabidopsis también forman dos clases distintas de longitud, cuyos extremos 5' indican que están formados por enzimas distintas. Una visión alternativa, de que una o más enzimas similares a Dicer pueden generar ambas clases de ARN pequeños, con las diferentes longitudes como un subproducto del contexto de secuencia local, no es consistente con la observación anterior de que la producción de ARN de 24-25-nt en germen de trigo el extracto fue inhibido por los dúplex de ARNip sintéticos, mientras que la producción de ARNip de ~21-nt no lo fue. Si la producción de ARNip está estrechamente relacionada con el ensamblaje de los complejos de efector aguas
20 abajo, su producción por diferentes ortólogos de Dicer puede asegurar que las dos clases de ARNip funcionen en diferentes rutas celulares (ver también Hamilton et al. 2002).

Un sello de PTGS en plantas y ARNi en nematodos es la propagación de señales de silenciamiento a lo largo de la longitud de la diana de ARNm. En las plantas, la propagación se produce en las direcciones 5' y 3' y requiere el gen
25 putativo RdRP, SGS2. La propagación se observa incluso cuando el silenciamiento se inicia mediante una única secuencia de ARNip (Klahre et al. 2002). Una hipótesis es que la propagación en 5' se inicia mediante la copia antisentido de cebado de ARNip del ARNm objetivo mediante un RdRP, lo que produce ARNbc. La propagación de 3' no puede explicarse por dicho mecanismo. Tanto la propagación de 5' como la de 3' podrían ser catalizadas por la conversión de fragmentos de ARNm en ARNbc por un RdRP que inicia la síntesis en el extremo 3' de los dos
30 fragmentos generados cuando un RISC corta el ARN objetivo. Este ARNbc sería luego dividido por una enzima similar a Dicer para producir ARNip secundarios (Lipardi et al. 2001; Sijen et al. 2001). Dicha síntesis de ARN ocurriría sin la participación de un cebador. Los datos anteriores demuestran que el ARN de cadena única exógeno se copia en el ARNc en el extracto por un RdRP de trigo que actúa sin la ayuda de un cebador exógeno. El ARNbc resultante se divide preferentemente en la clase más larga de ARNip, lo que sugiere que el RdRP está físicamente vinculado a un
35 ortólogo de Dicer específico. La función bioquímica específica de los ARNip de 24-25-nt generados en esta reacción queda por determinar.

Función de los miARN como ARNip en plantas

Los datos anteriores muestran además que los miARN en las plantas funcionan de la misma manera que los dúplex
40 de ARNip funcionan en Drosophila y en los humanos: como guías para un complejo de endonucleasas. Cada complejo de endonucleasa puede catalizar múltiples rondas de división diana, lo que indica que el miARN no se consume en la reacción. La entrada de un miARN en un complejo de enzimas ARNi de recambio múltiple no tiene precedentes; en células humanas, el miARN let-7 es un componente de un RISC, aunque el genoma humano no parece contener ninguna secuencia de ARNm con suficiente complementariedad para ser dividido por este RISC (Hutvagner y Zamore
45 2002). Al igual que el RISC programado con miR165/166 de la planta, el RISC programado con let-7 puede catalizar múltiples rondas de división del objetivo.

El soporte adicional para la idea de que la división directa del miARN de planta de dianas de ARNm complementarias proviene del trabajo adicional de Carrington y sus colegas, quienes demostraron recientemente que una familia de
50 ARNm de Arabidopsis que codifica los factores de transcripción de SCARECROW-LIKE (SCL) se divide por un proceso similar a ARNi por miR171, un miARN que es completamente complementario a sus objetivos de ARNm, a diferencia de miR165/166 (Llave et al. 2002b). Al igual que el trigo miR165/166, Arabidopsis miR171 parece dirigir la división endonucleolítica de sus ARNm diana. A este respecto, miR171 funciona como si se tratara de un ARNip de cadena sencilla. Los ARNip de cadena sencilla pueden desencadenar ARNi tanto en Drosophila como en extractos de células de mamíferos e in vivo en células HeLa (Martínez et al. 2002a; Schwarz et al. 2002), aunque se requieren concentraciones mucho mayores de ARNip de cadena sencilla que para dúplex (Schwarz et al. 2002). Además, un
55 RISC humano individual contiene solo una cadena del dúplex siARN exógeno utilizado para desencadenar ARNi (Martínez et al. 2002a).

La observación de que, en el lisado embrionario de *Drosophila*, un ARNip con la secuencia de miR165, que contiene tres emparejamientos incorrectos con su ARNm diana, es al menos tan potente como un ARNip con complementariedad perfecta con la misma secuencia diana, demuestra que los emparejamientos incorrectos por sí mismos no bloquear la división diana. Más bien, la posición y secuencia específicas de emparejamientos incorrectos de ARNip:ARN diana determinan si permiten o interrumpen el ARNi. Los datos también sugieren que los miARN en plantas evolucionaron para optimizar la eficiencia de división en lugar de maximizar la complementariedad con sus dianas. Se predice que tres o cuatro emparejamientos incorrectos entre un miARN (o la cadena guía de un dúplex siARN) y su ARN diana, colocados correctamente de manera que aún permitan la división del ARNm, facilitarán la liberación del ARN diana dividido del complejo RISC, por lo tanto, aumentando la tasa de recambio de enzimas.

10 Función miARN y propagación de señales de silenciamiento a lo largo de una secuencia silenciada

La propagación de señales de silenciamiento a lo largo de una secuencia de ARNm silenciada es una característica común del silenciamiento de ARN de plantas. Debido a que los miARN actúan como ARNip, uno podría anticipar que también provocarían la propagación. Sin embargo, la propagación inducida por miARN no es compatible con la genética de los mutantes PHV y PHB; la existencia misma de un mutante de PHV dominante excluye la propagación de 5' y 3'. La propagación de la señal de silenciamiento, es decir, la generación de nuevos ARNip 5' o 3' al sitio de la división objetivo inicial, produciría ARNip que contienen secuencias comunes a los ARNm de PHV de tipo silvestre y mutantes. Si se generaran tales ARNsi, dirigirían la destrucción del ARNm del PHV mutante. En tal caso, el mutante de PHV solo podría haberse recuperado como un alelo recesivo, no como un alelo dominante. Los estudios genéticos (McConnell et al., 2001) muestran que la división endonucleolítica de los ARN diana por los complejos RISC dirigidos por miARN no desencadena la propagación en las plantas. Esto sigue siendo cierto incluso cuando el miARN es el complemento perfecto de su diana de ARNm (Llave et al. 2002b).

¿Cómo, entonces, se puede reconciliar el fenómeno de propagación bien documentado observado para S-PTGS con la ausencia de propagación en la división de dianas dirigida por miARN? Se propone que las plantas contengan dos mecanismos separados para la destrucción del ARNm diana; los ARNm endógenos están regulados por la división endonucleolítica dirigida por complejos RISC programados por miARN, mientras que los desencadenantes silenciadores exógenos, como los transgenes o los virus, podrían iniciar ciclos sucesivos de cebado con ARNip, RdRP -catalizó la síntesis de ARNbc, seguido de la división del ARNbc en ARNip por enzimas similares a Dicer, un mecanismo denominado PCR de degradación aleatoria (Lipardi et al. 2001). Los complejos RISC no cumplirían una función en la ejecución de los ARN objetivo en este ciclo. La observación de que una única secuencia de ARNip puede desencadenar la propagación 3' (Klahre et al. 2002) es difícil de reconciliar con un mecanismo de cebado. Curiosamente, el silenciamiento de ARN mediado por VIGS de genes endógenos no se asocia con la propagación del silenciamiento en regiones de la secuencia objetivo 5' o 3' al activador de silenciamiento inicial (Vaistij et al., 2002), aunque dicho silenciamiento claramente debe incluir ARN/si derivados de ARNbc viral, no miARN endógenos.

Una hipótesis alternativa es que la concentración absoluta de una diana de ARN podría determinar si los fragmentos de división 5' y 3' generados por la división de diana se convierten en ARNbc por un RdRP. Solo cuando los productos de la división de diana mediada por RISC se acumulen en una concentración suficientemente alta, servirán como sustratos para el RdRP y, en consecuencia, desencadenarán la propagación. Los experimentos con tomates silenciados con poligalacturonasa apoyan esta visión (Han y Grierson 2002). En estas plantas, los ARNip se produjeron a partir del transgén que induce el silenciamiento, pero no del endógeno silenciado correspondiente. Los ARNip se produjeron preferentemente a partir del extremo 3' del transgén, lo que concuerda con la idea de que los RdRP de la planta actúan sin la ayuda de un cebador. Además, estos autores detectaron productos de degradación del ARNm compatibles con la división endonucleolítica del endógeno poligalacturonasa dirigido. Por lo tanto, la división mediada por RISC per se no parece desencadenar la propagación a lo largo de la secuencia de ARN diana. Más probablemente, la división endonucleolítica del ARNm transgénico produce una concentración suficientemente alta de fragmentos de ARNm para reclutar un RdRP, dando como resultado la producción de ARNip a partir del producto de división 3'. La segmentación dirigida por miARN de las dianas reguladoras de plantas naturales no conduciría a la propagación, ya que las dianas endógenas de ARNm no están presentes en concentraciones suficientemente altas para reclutar el RdRP. Este modelo predice que el putativo RdRP SGS2 (SDE1) requerido para PTGS, no será necesario para la destrucción dirigida por miARN de dianas de ARNm endógeno. De hecho, no se han reportado anomalías de desarrollo para los mutantes SGS2 (Mourrain et al. 2000), incluidas las mutaciones que probablemente sean fuertemente hipomorfos o funcionalmente nulas (Dalmay et al. 2000), lo que sugiere que las plantas que carecen de la proteína SGS2 tienen una biogénesis y función de miARN normal.

Referencias

Beclin, C., Boutet, S., Waterhouse, P., and Vaucheret, H. 2002. A branched pathway for transgene- induced ARN silencing in plants. *Curr. Biol.* 12: 684-688.

Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of ARN interference. *Nature* 409: 363-366.

- Billy, E., Brondani, V., Zhang, H., Muller, U., and Filipowicz, W. 2001. Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded ARN in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 14428-14433.
- 5 Celotto, A.M. and Graveley, B.R. 2002. Exon-specific ARNi: A tool for dissecting the functional relevance of alternative splicing. *ARN* 8: 8-24.
- Chiu, Y.-L. and Rana, T.M. 2002. ARNi in human cells: Basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol. Cell* 10: 549-561.
- Cogoni, C. and Macino, G. 1999. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent ARN polymerase. *Nature* 399: 166-169.
- 10 Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., and Baulcombe, D.C. 2000. An RNA-dependent ARN polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101: 543-553.
- Djikeng, A., Shi, H., Tschudi, C., and Ullu, E. 2001. ARN interference in *Trypanosoma brucei*: Cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. *ARN* 7: 1522-1530.
- 15 Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. 2001a. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate ARN interference in mammalian cell culture. *Nature* 411: 494-498.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. 2001b. ARN interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Dev.* 15: 188-200.
- 20 Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. 2001c. Functional anatomy of ARNip for mediating efficient ARNi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20: 6877-6888.
- Erickson, A.H. and Blobel, G. 1983. Cell-free translation of messenger ARN in a wheat germ system. *Methods Enzymol.* 96: 38-50.
- 25 Fagard, M., Boutet, S., Morel, J.-B., Bellini, C., and Vaucheret, H. 2000. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and ARN interference in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 11650-11654.
- Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C.C. 2001. Genes and mechanisms related to ARN interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106: 23-34.
- 30 Hamilton, A.J. and Baulcombe, D.C. 1999. A species of small antisense ARN in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L., and Baulcombe, D. 2002. Two classes of short interfering ARN in ARN silencing. *EMBO J.* 21: 4671-4679. Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.J. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296.
- 35 Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., and Hannon, G.J. 2001. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of ARNi. *Science* 293: 1146-1150.
- Han, Y. and Grierson, D. 2002. Relationship between small antisense RNAs and aberrant RNAs associated with sense transgene mediated gene silencing in tomato. *Plant J.* 29: 509-519.
- Hannon, G.J. 2002. ARN interference. *Nature* 418: 244-251.
- 40 Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M.T., Babaie, E., and Prydz, H. 2002. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res.* 30: 1757-1766. Hutvagner, G. and Zamore, P.D. 2002. A microRNA in a multiple-turnover ARNi enzyme complex. *Science* 297: 2056-2060.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P.D. 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293: 834-838.

- Jacobsen, S.E., Running, M.P., and Meyerowitz, E.M. 1999. Disruption of an ARN helicase/RNase III gene in Arabidopsis causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* 126: 5231-5243. Kennerdell, J.R., Yamaguchi, S., and Carthew, R.W. 2002. ARNi is activated during Drosophila oocyte maturation in a manner dependent on aubergine and spindle-E. *Genes & Dev.* 16: 1884-1889.
- 5 Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H. 2001. Dicer functions in ARN interference and in synthesis of small ARN involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & Dev.* 15: 2654-2659.
- Klahre, U., Crete, P., Leuenberger, S.A., Iglesias, V.A., and Meins, F., Jr. 2002. High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 11981-11986.
- 10 Kooter, J.M., Matzke, M.A., and Meyer, P. 1999. Listening to the silent genes: Transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci.* 4: 340-347.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294: 853-858. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. 2002. Identification of tissue-specific microARN from mouse. *Curr. Biol.* 12: 735-739.
- 15 Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., and Bartel, D.P. 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 858-862.
- Lee, R.C. and Ambros, V. 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 862-864.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.C., and Ambros, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854.
- 20 Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S., and Kim, V.N. 2002. MicroRNA maturation: Stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 21: 4663-4670.
- Li, W.X. and Ding, S.W. 2001. Viral suppressors of ARN silencing. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 150-154. Lipardi, C., Wei, Q., and Paterson, B.M. 2001. ARNi as random degradative PCR. ARNi primers convert ARNm into ARNbs that are degraded to generate new ARNi. *Cell* 107: 297-307.
- 25 Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A., and Carrington, J.C. 2002a. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 14: 1605-1619.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K.D., and Carrington, J.C. 2002b. Cleavage of Scarecrow-Like ARNm targets directed by a class of Arabidopsis miARN. *Science* 297: 2053-2056.
- 30 Mallory, A.C., Reinhart, B.J., Bartel, D., Vance, V.B., and Bowman, L.H. 2002. A viral suppressor of ARN silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 15228-15233.
- Martens, H., Novotny, J., Oberstrass, J., Steck, T.L., Postlethwait, P., and Nellen, W. 2002. ARNi in Dictyostelium: The role of RNA-directed ARN polymerases and double-stranded RNase. *Mol. Biol. Cell* 13: 445-453.
- 35 Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R., and Tuschl, T. 2002a. Single-stranded antisense ARNi guide target ARN cleavage in ARNi. *Cell* 110: 563.
- Martinez, L.A., Naguibneva, I., Lehmann, H., Vervisch, A., Tchénio, T., Lozano, G., and Harel-Bellan, A. 2002b. Synthetic small inhibiting RNAs: Efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 14849-14854.
- 40 Matzke, M.A., Matzke, A.J., Pruss, G.J., and Vance, V.B. 2001. RNA-based silencing strategies in plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11: 221-227.
- McConnell, J.R. and Barton, M.K. 1998. Leaf polarity and meristem formation in Arabidopsis. *Development* 125: 2935-2942.
- McConnell, J.R., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J., and Barton, M.K. 2001. Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots. *Nature* 411: 709-713.

- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A.K., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. 2002. miRNPs: A novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes & Dev.* 16: 720-728.
- Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Jouette, D., Lacombe, A.M., Nikic, S., Picault, N. et al. 2000. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101: 533-542.
- Nykänen, A., Haley, B., and Zamore, P.D. 2001. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107: 309-321. Pal-Bhadra, M., Bhadra, U., and Birchler, J.A. 2002. RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Mol. Cell* 9: 315-327.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., and Chen, X. 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* 12: 1484-1495. Parrish, S. and Fire, A. 2001. Distinct roles for RDE-1 and RDE-4 during RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *RNA* 7: 1397-1402.
- Parrish, S., Fleenor, J., Xu, S., Mello, C., and Fire, A. 2000. Functional anatomy of an RNAi trigger. Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol. Cell* 6: 1077-1087. Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Muller, P. et al. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408: 86-89.
- Plasterk, R.H. 2002. RNA silencing: The genome's immune system. *Science* 296: 1263-1265. Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403: 901-906.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., and Bartel, D.P. 2002. MicroRNAs in plants. *Genes & Dev.* 16: 1616-1626.
- Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B., and Bartel, D.P. 2002. Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110: 513-520.
- Roberts, B.E. and Paterson, B.M. 1973. Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70: 2330-2334. Roignant, J.-Y., Carré, C., Mugat, B., Szymczak, D., Lepesant, J.-A., and Antoniewski, C. 2003. Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*. *RNA* (In press).
- Ruvkun, G. 2001. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 294: 797-799. Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schiebel, W., Pelissier, T., Riedel, L., Thalmeir, S., Schiebel, R., Kempe, D., Lottspeich, F., Sanger, H.L., and Wassenegger, M. 1998. Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell* 10: 2087-2101.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Haley, B., and Zamore, P.D. 2002. Evidence that RNAi function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol. Cell* 10: 537-548.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H., and Fire, A. 2001. On the role of RNA amplification in RNAi-triggered gene silencing. *Cell* 107: 465-476.
- Smardon, A., Spoerke, J., Stacey, S., Klein, M., Mackin, N., and Maine, E. 2000. EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 10: 169-178.
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., and Mello, C.C. 1999. The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99: 123-132.
- Tijsterman, M., Ketting, R.F., Okihara, K.L., Sijen, T., and Plasterk, R.H. 2002. RNA helicase MUT-14- dependent gene silencing triggered in *C. elegans* by short antisense RNAs. *Science* 295: 694-697.
- Tuschl, T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P., and Sharp, P.A. 1999. Targeted RNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & Dev.* 13: 3191-3197.
- Vaistij, F.E., Jones, L., and Baulcombe, D.C. 2002. Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell* 14: 857-867.

Vaucheret, H., Beclin, C., and Fagard, M. 2001. Post-transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell Sci.* 114: 3083-3091.

Waterhouse, P.M., Wang, M.B., and Lough, T. 2001. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411: 834-842.

- 5 Williams, R.W. and Rubin, G.M. 2002. ARGONAUTE1 is required for efficient ARN interference in *Drosophila* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 6889-6894.

Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., and Bartel, D.P. 2000. ARNi: Double-stranded ARN directs the ATP-dependent cleavage of ARNm at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101: 25-33.

Equivalentes

- 10 Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar utilizando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la divulgación descritas en este documento.

REIVINDICACIONES

1. El uso de un agente de ARNi para mejorar el silenciamiento de ARN de un ARNm diana en un método no terapéutico de silenciamiento de ARN realizado en una célula que tiene una ruta de ARNi;
- 5 en el que el agente ARNi tiene al menos un nucleótido terminal sustituido con un nucleótido que forma un par de base oscilante G:U con el nucleótido correspondiente en el ARNm diana, en el que el nucleótido terminal está dentro de 5 o menos nucleótidos del extremo 3' del ARNi agente;
- 10 en el que el agente de ARNi tiene al menos un nucleótido terminal sustituido con un nucleótido que forma un par de bases oscilantes G:U con el nucleótido correspondiente en el ARNm diana, en el que el nucleótido terminal está dentro de 5 o menos nucleótidos del extremo 5' del agente ARNi; y en el que al menos dos nucleótidos terminales están sustituidos, en el que los dos nucleótidos terminales sustituidos están en el extremo 3' del agente de ARNi,
- en el que el método comprende poner en contacto la célula con el agente de ARNi en condiciones tales que se mejore el silenciamiento.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sustitución es una sustitución $A \rightarrow G$, formando el G un par de bases oscilante G:U con una U en el ARNm diana correspondiente.
- 15 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sustitución es una sustitución $C \rightarrow U$, formando la U un par de bases oscilante G:U con una G en el ARNm diana correspondiente.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se sustituyen al menos tres, cuatro o cinco nucleótidos terminales.
- 20 5. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el agente se sintetiza químicamente.
6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el agente se sintetiza enzimáticamente.
7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el agente se deriva de un precursor diseñado.
8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la célula es una célula vegetal.
- 25 9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la célula es una célula de mamífero.
10. El uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el agente de ARNi es una horquilla corta de ARN (ARNhc).
11. Un agente de ARNi para uso en la mejora del silenciamiento de ARN de un ARNm objetivo en un método terapéutico de silenciamiento de ARN de un ARN objetivo en un sujeto;
- 30 en el que el agente ARNi tiene al menos un nucleótido terminal sustituido con un nucleótido que forma un par de bases oscilantes G:U con el nucleótido correspondiente en el ARNm diana, en el que el nucleótido terminal está dentro de 5 o menos nucleótidos del extremo 3' del ARNi agente;
- 35 en el que el agente de ARNi tiene al menos un nucleótido terminal sustituido con un nucleótido que forma un par de bases oscilantes G:U con el nucleótido correspondiente en el ARNm objetivo, en el que el nucleótido terminal está dentro de 5 o menos nucleótidos del extremo 5' del agente ARNi; y en el que al menos dos nucleótidos terminales están sustituidos, en el que los dos nucleótidos terminales sustituidos están en el extremo 3' del agente de ARNi,
- en el que el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende el agente de ARNi de tal manera que se mejore el silenciamiento.
- 40 12. El agente de ARNi para uso como se reivindica en la reivindicación 11, en el que la sustitución es una sustitución $A \rightarrow G$, formando el G un par de bases oscilante G:U con una U en el ARNm diana correspondiente.
13. El agente de ARNi para uso como se reivindica en la reivindicación 11, en el que la sustitución es una sustitución $C \rightarrow U$, formando la U un par de bases oscilante G:U con una G en el ARNm diana correspondiente.

14. El agente de ARNi para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que al menos tres, cuatro o cinco nucleótidos terminales están sustituidos.
15. El agente de ARNi para uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que el agente se sintetiza químicamente.
- 5 16. El agente ARNi para uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 11-14 en el que el agente se sintetiza enzimáticamente.
17. El agente ARNi para uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en el que el agente se deriva de un precursor manipulado.
- 10 18. El agente de ARNi para uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, en el que el agente de ARNi es una horquilla corta de ARN (ARNhc).
19. Un método no terapéutico para mejorar la actividad silenciadora del ARN de un agente de ARNi, que comprende:
- (i) seleccionar una secuencia de ARNm diana; y
- (ii) sintetizar un agente de ARNi en el que al menos un nucleótido terminal está sustituido con un nucleótido que forma un par de bases oscilante G:U con el nucleótido correspondiente en el ARNm objetivo, en el que el nucleótido terminal está dentro de 5 o menos nucleótidos del extremo 3' del agente ARNi;
- 15 en el que el agente de ARNi tiene al menos un nucleótido terminal sustituido con un nucleótido que forma un par de bases oscilantes G:U con el nucleótido correspondiente en el ARNm objetivo, en el que el nucleótido terminal está dentro de 5 o menos nucleótidos del extremo 5' del agente de ARNi; y en el que al menos dos nucleótidos terminales están sustituidos, en el que los dos nucleótidos terminales sustituidos están en el extremo 3' del agente de ARNi.
- 20 20. El método de la reivindicación 19, en el que la sustitución es una sustitución $A \rightarrow G$, formando G un par de bases oscilante G:U con una U en el ARNm diana correspondiente.
21. El método de la reivindicación 19, en el que la sustitución es una sustitución $C \rightarrow U$, formando la U un par de bases oscilante G:U con una G en el ARNm diana correspondiente.
22. El método de la reivindicación 19, en el que al menos tres, cuatro o cinco nucleótidos terminales están sustituidos.
- 25 23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 19-22, en el que el agente se sintetiza químicamente.
24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 19-22, en el que el agente se sintetiza enzimáticamente.
25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 19-24, en el que el agente se deriva de un precursor diseñado.
26. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 19-24, en el que el agente de ARNi es una ARN de horquilla corta (ARNhc).
- 30 27. El uso de la reivindicación 1, el agente de ARNi para el uso de la reivindicación 11, o el método de la reivindicación 19, en el que el par de bases oscilante G:U media la división selectiva del ARNm diana de tipo silvestre con respecto a la división de un mutante de ARNm diana de tipo silvestre.

FIG. 1B

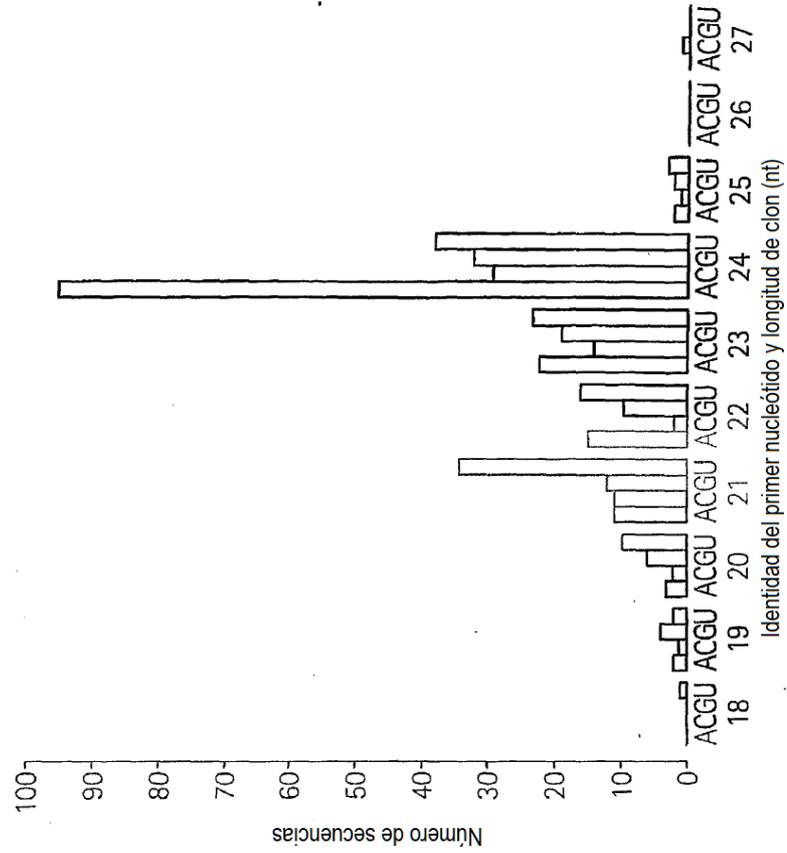


FIG. 1A

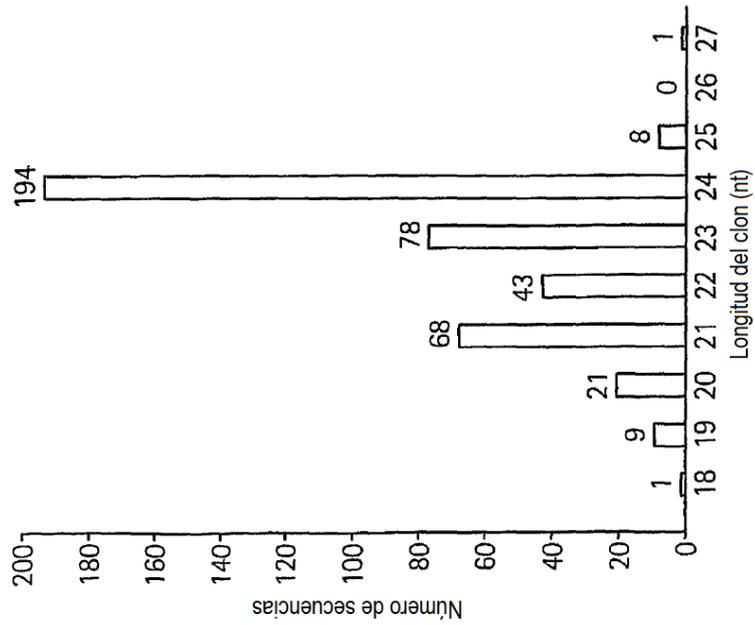


FIG. 2D

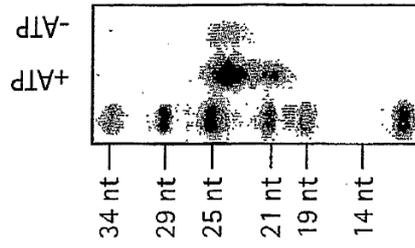


FIG. 2C

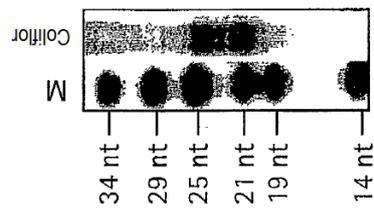


FIG. 2B

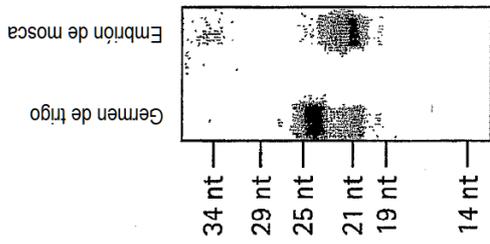


FIG. 2A

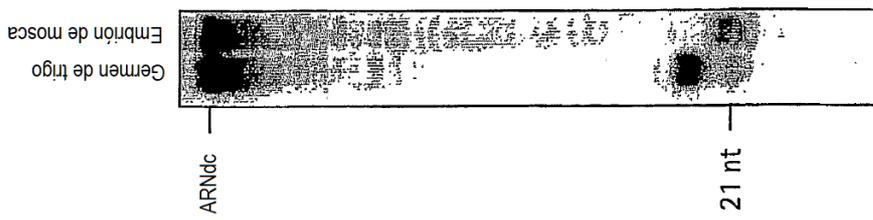


FIG. 2E

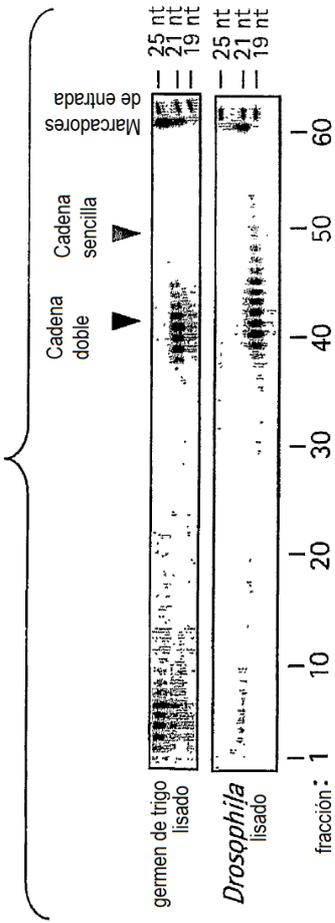


FIG. 2G

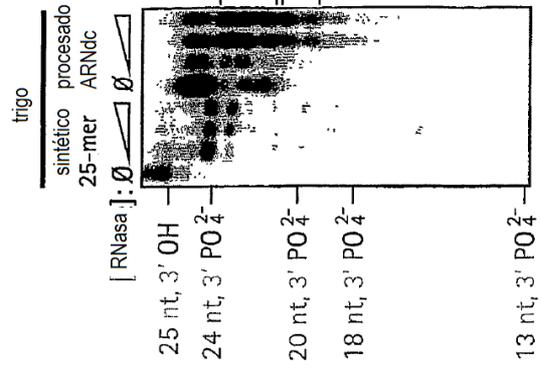


FIG. 2F

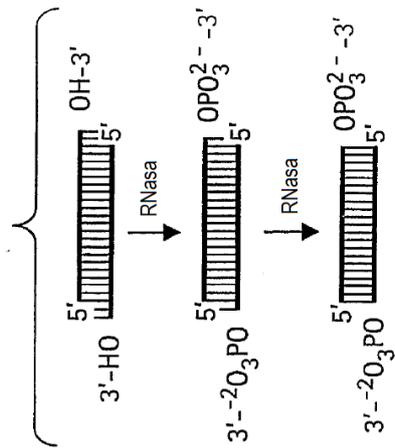


FIG. 3A

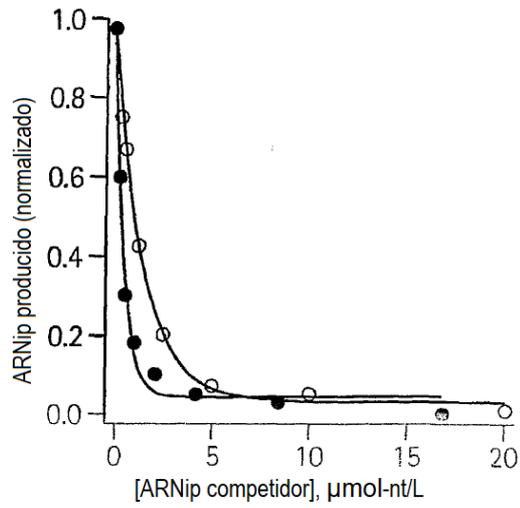


FIG. 3B

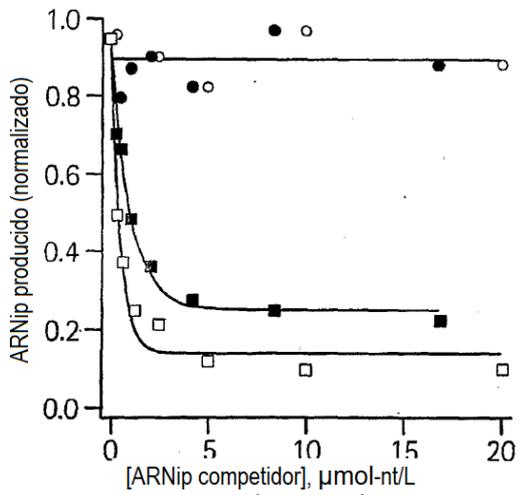


FIG. 3C

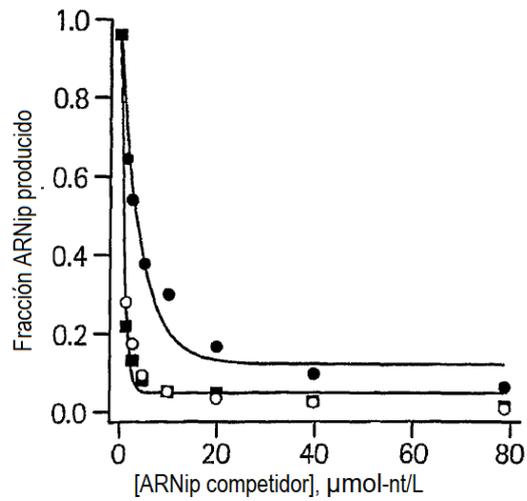


FIG. 4

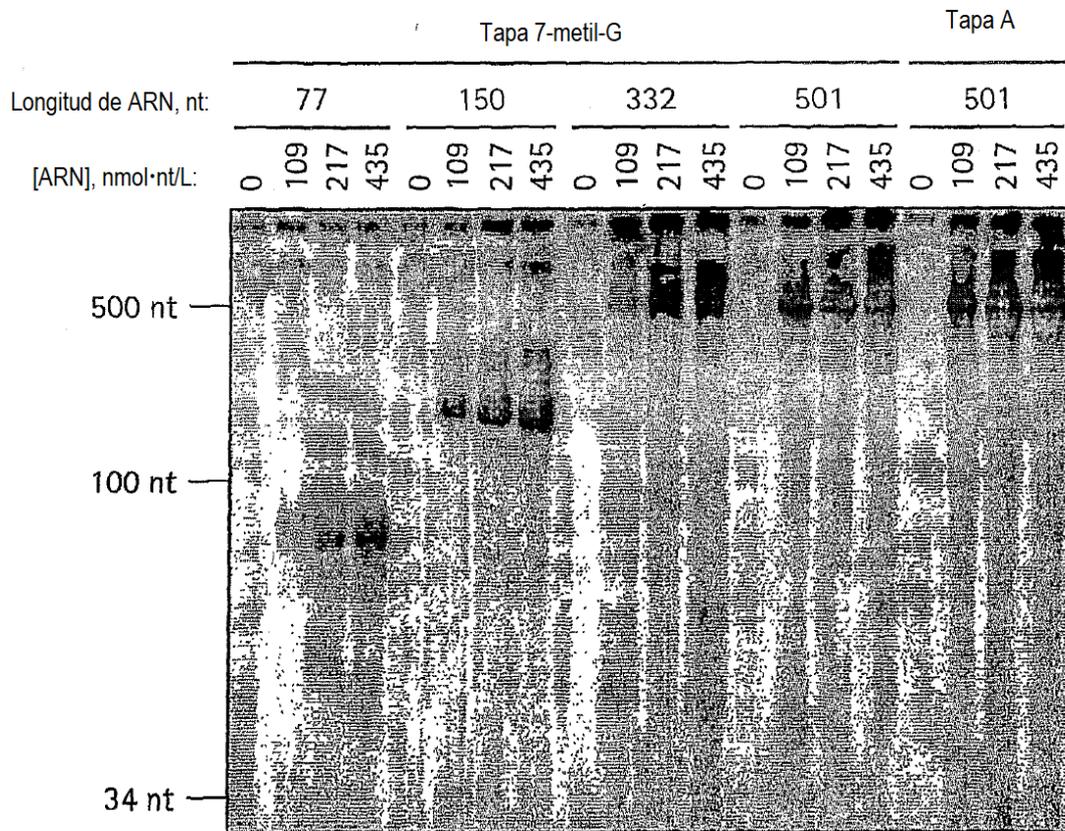


FIG. 5A

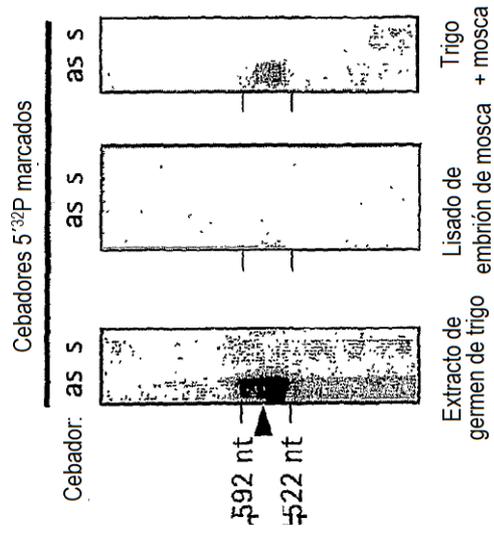


FIG. 5B

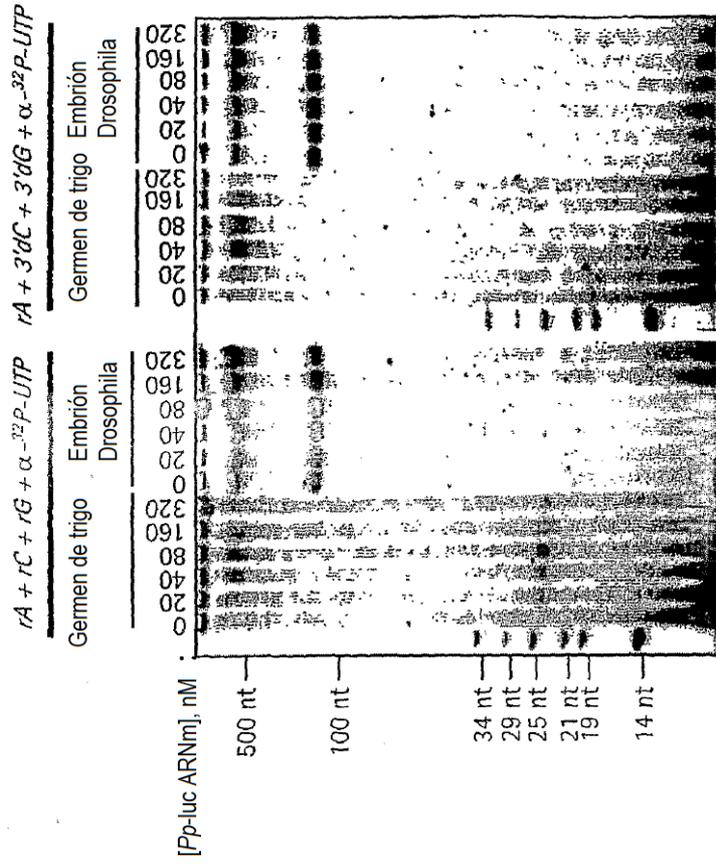


FIG. 5C

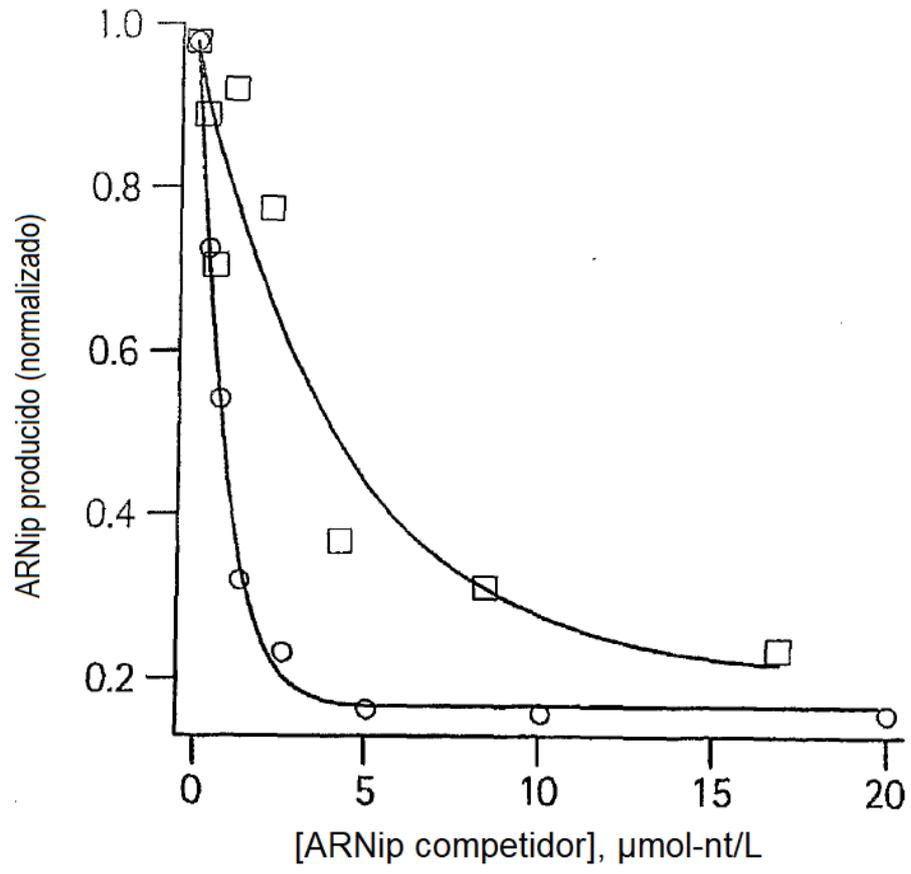


FIG. 6A

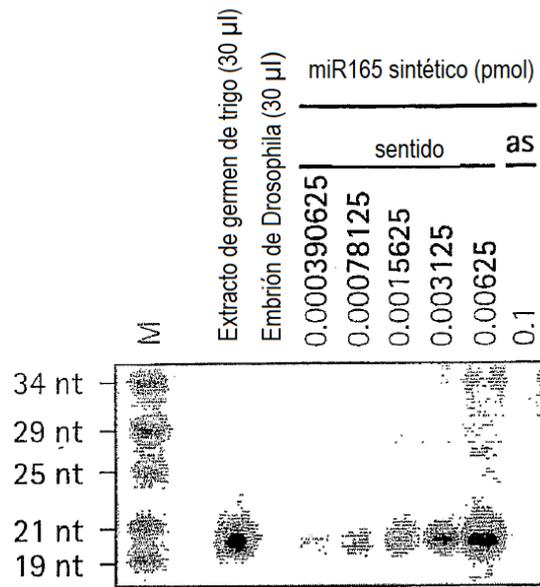


FIG. 6B

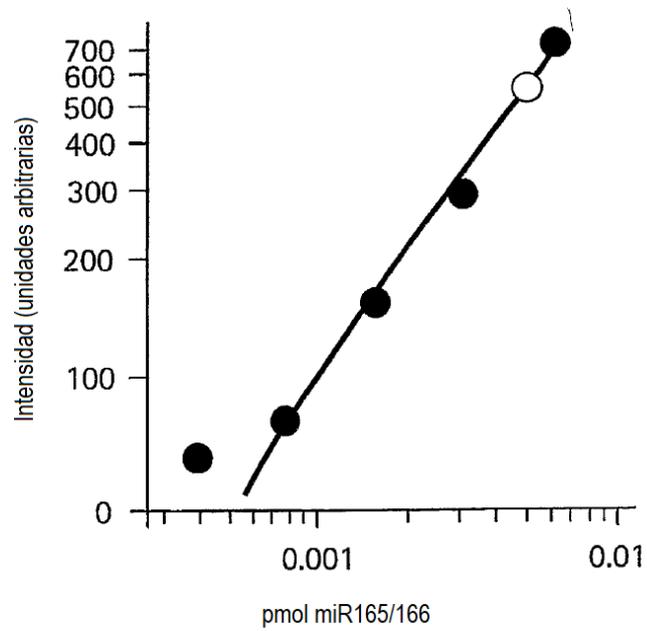


FIG. 6C

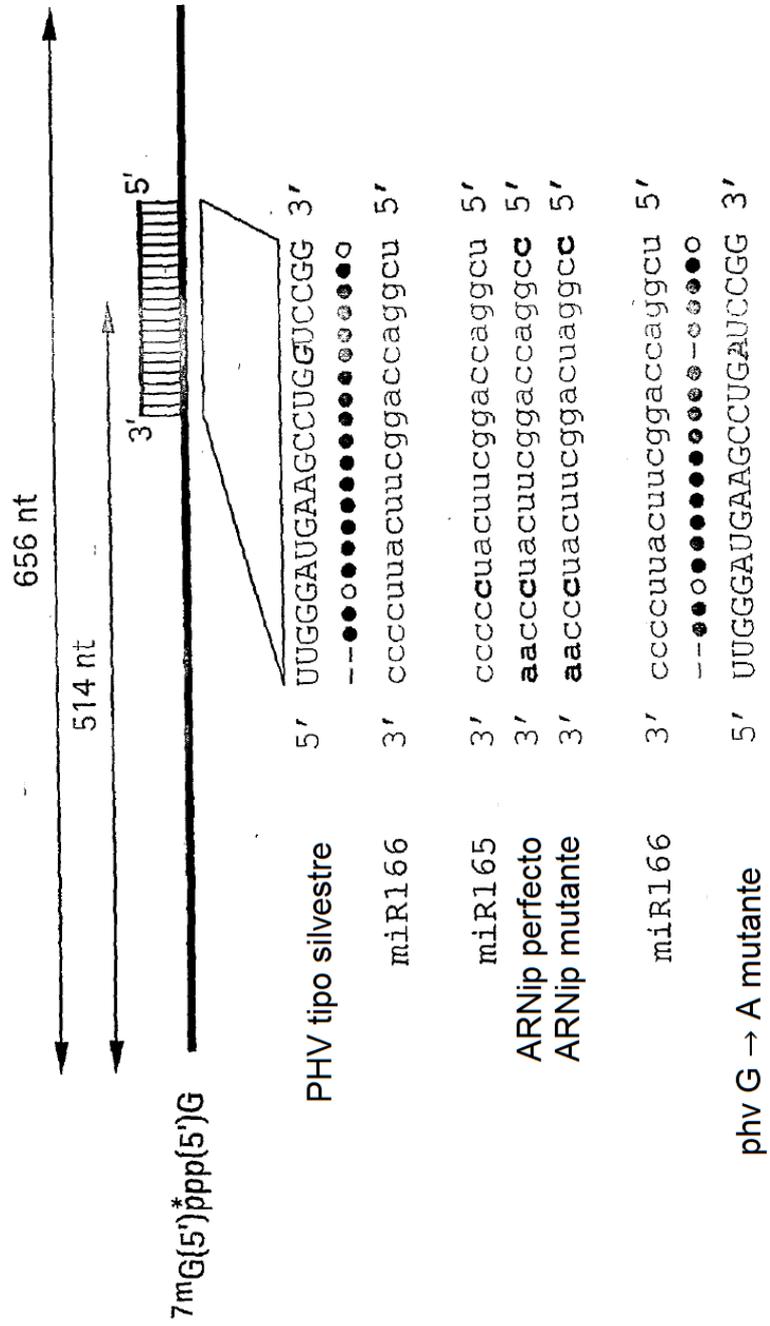


FIG. 7A

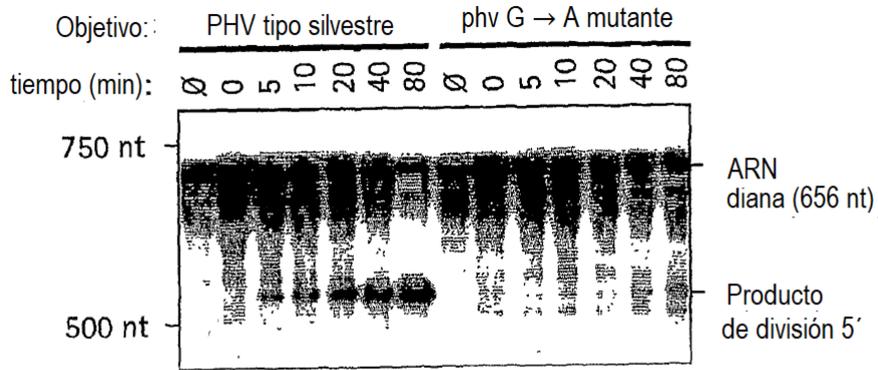


FIG. 7B

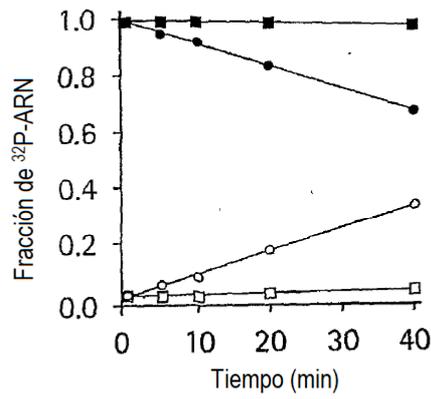


FIG. 7C

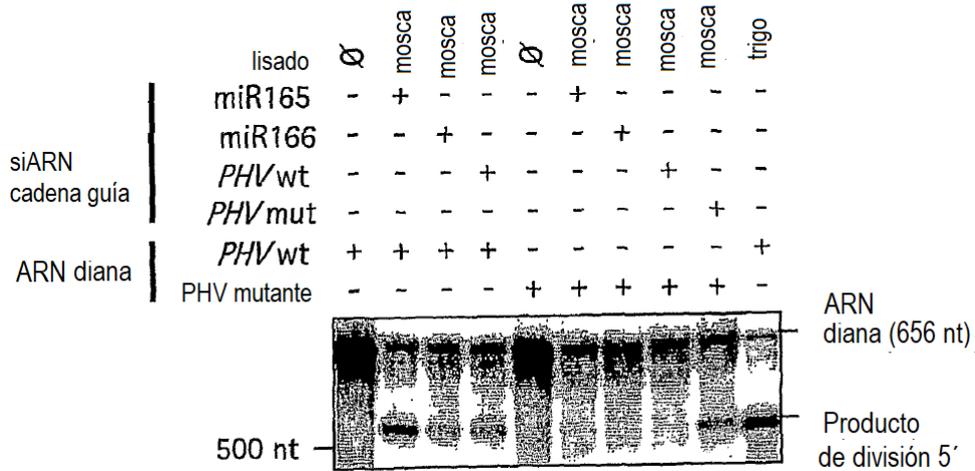


FIG. 8

