

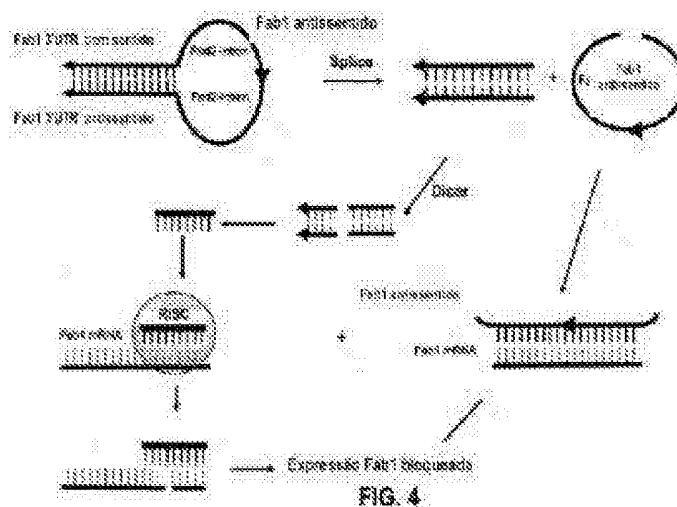
(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2008.03.20	(73) Titular(es): BROOKHAVEN SCIENCE ASSOCIATES, LLC BUILDING 475D UPTON, NY 11973-5000 US
(30) Prioridade(s): 2007.03.21 US 896212 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2009.12.09	(72) Inventor(es): JOHN SHANKLIN US TAM NGUYEN US
(45) Data e BPI da concessão: 2015.05.06 168/2015	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES COMBINADAS DE GANCHO DE CABELO E ANTISSENTIDO E MÉTODOS PARA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO**

(57) Resumo:

UMA CONSTRUÇÃO DE NUCLEÓTIDOS CONTENDO UMA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA QUE FORMA UMA HASTE E UMA ANSA, EM QUE A ANSA COMPREENDE UMA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA QUE MODULA A EXPRESSÃO DE UM ALVO, EM QUE A HASTE COMPREENDE UMA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA QUE MODULA A EXPRESSÃO DE UM ALVO E EM QUE O ALVO MODULADO PELA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA NA ANSA E O ALVO MODULADO PELA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA NA HASTE PODEM SER IGUAIS OU DIFERENTES. SÃO IGUALMENTE DIVULGADOS VECTORES, MÉTODOS DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ALVOS, MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE UMA CÉLULA E MÉTODOS DE TRATAMENTO DE CONDIÇÕES COMPREENDENDO A SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA.

RESUMO**"COMPOSIÇÕES COMBINADAS DE GANCHO DE CABELO E ANTISSENTIDO
E MÉTODOS PARA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO"**

Uma construção de nucleótidos contendo uma sequência nucleotídica que forma uma haste e uma ansa, em que a ansa compreende uma sequência nucleotídica que modula a expressão de um alvo, em que a haste compreende uma sequência nucleotídica que modula a expressão de um alvo e em que o alvo modulado pela sequência nucleotídica na ansa e o alvo modulado pela sequência nucleotídica na haste podem ser iguais ou diferentes. São igualmente divulgados vectores, métodos de regulação da expressão de alvos, métodos de obtenção de uma célula e métodos de tratamento de condições compreendendo a sequência nucleotídica.

DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÕES COMBINADAS DE GANCHO DE CABELO E ANTISSENTIDO E MÉTODOS PARA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO"

ANTECEDENTES

A supressão antissentido refere-se à ligação de uma cadeia "antissentido" de um ácido nucleico a um gene ou mRNA, evitando assim a expressão do gene ou tradução do mRNA. Tipicamente, para a supressão antissentido, desenha-se uma cassette de expressão para expressar uma molécula de RNA complementar da totalidade ou de parte de um mRNA codificador de um alvo. A expressão excessiva da molécula de RNA antissentido pode resultar na expressão reduzida do gene nativo.

O polinucleótido para usar na supressão antissentido pode corresponder à totalidade ou a parte do complemento da região não traduzida 5' e/ou 3' do transcrito alvo e/ou à totalidade ou parte do complemento da região codificadora e das regiões não traduzidas de um transcrito codificador do alvo. Ainda, o polinucleótido antissentido pode ser totalmente complementar (*i.e.*, 100% idêntico ao complemento da sequência alvo) ou parcialmente complementar (*i.e.*, menos de 100% idêntico ao complemento da sequência alvo) da sequência alvo. A supressão antissentido pode ser

usada para inibir a expressão de múltiplas proteínas na mesma célula ou organismo, como descrito, por exemplo, na Pat. US No. 5952657. Ainda, porções dos nucleótidos antissentido podem ser usadas para destruir a expressão do gene alvo. De um modo geral, podem ser usadas sequências de pelo menos 50, 100, 200, 300, 500 ou 550 nucleótidos. Os métodos para usar supressão antissentido para inibir a expressão de genes endógenos em plantas estão descritos, por exemplo, em Liu *et al.* (2002) *Plant Physiol.* 129:1732-1753 e Pat. U.S. Nos. 5,759,829 e 5,952,657. A eficiência da supressão antissentido pode ser aumentada através da inclusão de uma região poli-dT na cassete de expressão numa posição 3' relativamente à sequência antissentido e 5' relativamente ao sinal de poliadenilação. Ver, Patente U.S. No. 20020058815.

A interferência por RNA refere-se ao processo de silenciamento transcricional de genes específico de sequência, em animais, mediada por curtos RNAs de interferência (siRNA) (Fire *et al.*, 1998, *Nature*, 391, 806; Hamilton *et al.*, 1999, *Science*, 286, 950-951). O processo correspondente em plantas é normalmente referido como silenciamento de genes pós-transcricional ou silenciamento de RNA e é também referido como supressão ("quelling") nos fungos. O processo de silenciamento pós-transcricional de genes pensa-se que seja um mecanismo de defesa celular evolutivamente conservado, usado para prevenir a expressão de genes estranhos, e é geralmente partilhado por diversas plantas e filos (Fire *et al.*, 1999, *Trends Genet.*, 15, 358).

Tal protecção da expressão de genes estranhos pode ter evoluído como resposta à expressão de RNAs de cadeia dupla (dsRNAs) derivados da infecção viral ou da integração ao acaso de elementos transposições num genoma hospedeiro via uma resposta celular que especificamente destrói RNA de cadeia simples homólogo ou RNA genómico viral. A presença de dsRNA nas células induz a resposta de RNAi através de um mecanismo que ainda não está totalmente caracterizado. Este mecanismo parece ser diferente da resposta de interferência que resulta da activação mediada por dsRNA da cinase de proteínas PKR e sintetase de 2',5'-oligoadenilato resultando em clivagem não específica de mRNA pela ribonuclease L.

A presença nas células de dsRNAs longos estimula a actividade de uma enzima ribonuclease III referida como "dicer". A dicer está envolvida no processamento do dsRNA em pequenos fragmentos de dsRNA conhecidos como pequenos RNAs de interferência (siRNAs) (Hamilton *et al.*, *supra*; Bernstein *et al.*, 2001, *Nature*, 409, 363). Os pequenos RNAs de interferência derivados da actividade dicer possuem tipicamente cerca de 21 a cerca de 23 nucleótidos de comprimento (Hamilton *et al.*, *supra*; Elbashir *et al.*, 2001, *Genes Dev.*, 15, 188). A dicer tem também sido implicada na excisão de pequenos RNAs temporais de 21 e 22 nucleótidos (stRNAs) do RNA precursor de estrutura conservada que estão implicados no controlo da tradução (Hutvagner *et al.*, 2001, *Science*, 293, 834). A resposta de RNAi também inclui um complexo de endonuclease, normalmente referido como um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), o qual

medeia a clivagem de RNA de cadeia simples tendo sequência complementar da cadeia antissentido da cadeia dupla de siRNA. A clivagem do RNA alvo ocorre no meio da região complementar da cadeia antissentido da cadeia dupla de siRNA (Elbashir *et al*, 2001, *Genes Dev.*, 15, 188).

O RNAi tem sido estudado numa variedade de sistemas. Fire *et al.*, 1998, *Nature*, 391, 806, foram os primeiros a observar RNAi em *C. elegans*. Bahramian and Zarbl, 1999, *Molecular and Cellular Biology*, 19, 274-283 and Wianny and Goetz, 1999, *Nature Cell Biol*, 2, 70, descrevem RNAi mediado por dsRNA em sistemas de mamíferos. Hammond *et al.*, 2000, *Nature*, 404, 293, descrevem RNAi em células de *Drosophila* transfectadas com dsRNA. Elbashir *et al.*, 2001, *Nature*, 411, 494, descrevem RNAi induzido pela introdução de duplas cadeias de RNAs sintéticos de 21 nucleótidos em células de mamífero em cultura, incluindo células de rim embrionário humano e HeLa. Os métodos para usar dsRNA de interferência para inibir a expressão de genes vegetais endógenos estão descritos em Waterhouse *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95:13959-13965, Liu *et al.* (2002) *Plant Physiol.* 129:1732-1753 e WO 99/59029, WO 99/53050, WO 99/61631 e WO 00/59035.

Foram descritos outros métodos de RNAi relacionados com a inibição da expressão de um ou mais alvos obtida através de interferência por RNA em gancho de cabelo (hprRNA) ou interferência por RNA em gancho de cabelo contendo intrões (ihprRNA). Estes métodos são altamente

eficientes na inibição da expressão de genes endógenos. Ver, Waterhouse and Helliwell (2003) Nat. Rev. Genet. 5:29-38 e as referências aí citadas.

Para a interferência por hpRNA, a cassette de expressão é desenhada para expressar uma molécula de RNA que hibrida com ela própria para formar uma estrutura em gancho de cabelo que compreende uma região de ansa de cadeia simples e uma haste de cadeia dupla. A região da haste de cadeia dupla compreende uma sequência com sentido correspondendo à totalidade ou a parte do RNA mensageiro endógeno codificador do gene cuja expressão se pretende inibir e uma sequência antissentido que é totalmente ou parcialmente complementar da sequência com sentido. Assim, a região de haste de cadeia dupla da molécula, de um modo geral, determina a especificidade da interferência por RNA. As moléculas de hpRNA são altamente eficientes na inibição da expressão de genes endógenos e a interferência por RNA que induzem é herdada pelas gerações subsequentes. Ver, por exemplo, Chuang and Meyerowitz (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:5985- 5990; Stoutjesdijk *et al.* (2002) Plant Physiol. 129: 1723-1731 ; e Waterhouse and Helliwell (2003) Nat. Rev. Genet. 5:29-38. Os métodos para usar interferência por hpRNA para inibir ou silenciar a expressão de genes estão descritos, por exemplo, em Chuang and Meyerowitz (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:5985- 5990; Stoutjesdijk *et al.* (2002) Plant Physiol. 129:1723- 1731; Waterhouse and Helliwell (2003) Nat. Rev. Genet. 5:29-38; Pandolfi *et al.* BMC Biotechnology 3:7, e U.S. Patent

Publication No. 20030175965. Um ensaio transitório para a eficiência das construções de hpRNA para silenciar a expressão de genes *in vivo* foi descrito por Panstruga *et al.* (2003) Mol. Biol. Rep. 30:135-150.

Para ihpRNA, as moléculas de interferência possuem a mesma estrutura geral de hpRNA, mas a molécula de RNA ainda compreende um intrão que é capaz de ser cortado na célula em que o ihpRNA é expresso. O uso de um intrão minimiza o tamanho da ansa na molécula de RNA em gancho de cabelo após *splicing*, o que aumenta a eficiência da interferência. Ver, por exemplo, Smith *et al.* (2000) Nature 507:319-320. De facto, Smith *et al.* mostram 100% de supressão da expressão de genes endógenos usando interferência mediada por ihpRNA. Métodos para usar interferência por ihpRNA para inibir a expressão de genes estão descritos, por exemplo, em Smith *et al.* (2000) Nature 507:319-320; Wesley *et al.* (2001) Plant J. 27:581-590; Wang and Waterhouse (2001) Curr. Opin. Plant Biol. 5:156-150; Waterhouse and Helliwell (2003) Nat. Rev. Genet. 5:29-38; Helliwell and Waterhouse (2003) Methods 30:289-295, e Publicação de Patente U.S. No. 20030180955.

Outros descreveram vários RNAi e sistemas de silenciamento de genes. Por exemplo, Parrish *et al.*, 2000, Molecular Cell, 6, 1077-1087, descrevem construções de siRNA específicas quimicamente modificadas para atingir o gene *unc-22* de *C. elegans*. Grossniklaus, Publicação Internacional PCT No. WO 01/38551, descreve determinados

métodos para regular a expressão de genes *polycomb* em plantas usando dsRNAs. Churikov *et al.*, International PCT Publication No. WO 01/42443, descrevem determinados métodos para modificar características genéticas de um organismo usando certos dsRNAs. Cogoni *et al.*, Publicação Internacional PCT No. WO 01/53475, descrevem determinados métodos para o isolamento de um gene silenciador de *Neurospora* e suas utilizações. Reed *et al.*, Publicação Internacional PCT Publication No. WO 01/68836, descrevem determinados métodos para o silenciamento de genes em plantas. Honer *et al.*, Publicação Internacional PCT No. WO 01/70944, descrevem determinados métodos de rastreio de fármacos usando nemátodos transgênicos como modelos da doença de Parkinson usando determinados dsRNA. Deak *et al.*, Publicação Internacional PCT No. WO 01/72774, descreve determinados produtos de genes derivados de *Drosophila* que podem estar relacionados com RNAi em *Drosophila*. Arndt *et al.*, Publicação Internacional PCT No. WO 01/92513 descreve determinados métodos para mediar a supressão de genes usando factores que estimulam RNAi. Tuschl *et al.*, International PCT Publication No. WO 02/44321, descrevem determinadas construções de siRNA sintéticas. Pachuk *et al.*, Publicação Internacional PCT No. WO 00/63364, e Satishchandran *et al.*, Publicação Internacional PCT No. WO 01/04313, descrevem determinados métodos e composições para inibição da função de certas sequências polinucleotídicas usando determinados dsRNAs. Echeverri *et al.*, Publicação Internacional PCT No. WO 02/38805, descrevem determinados genes de *C. elegans* identificados via RNAi. Kreutzer *et*

al., Publicações Internacionais PCT Nos. WO 02/055692, WO 02/055693 e EP 1144623 B1 descrevem determinados métodos para inibição da expressão de genes usando RNAi. Graham *et al.*, Publicações Internacionais PCT Nos. WO 99/49029 e WO 01/70949 e AU 4037501 descrevem determinadas moléculas de siRNA expressas em vectores. Fire *et al.*, Pat. U.S. No. 6,506,559, descrevem determinados métodos para inibição da expressão de genes *in vitro* usando determinadas construções de dsRNA longos (mais de 25 nucleótidos) que medeiam RNAi.

Se bem que tenha sido feito muito trabalho na área do silenciamento de genes usando tecnologias de RNAi e antissentido, melhoramentos que permitam melhor modulação da expressão de genes relativamente a tecnologia de RNAi ou antissentido serão uma mais-valia na arte.

DIVULGAÇÃO DO INVENTO

O presente invento proporciona um método de regulação da expressão, o método compreendendo: introdução de uma construção nucleotídica numa célula, em que a referida construção nucleotídica compreende: uma primeira e uma segunda sequência nucleotídica que hibridam para formar a haste de uma estrutura haste-ansa e uma terceira sequência nucleotídica colocada entre a primeira e a segunda sequências nucleotídicas e locais de *splicing* operacionalmente colocados e orientados de forma a permitir a separação da porção da ansa da estrutura haste-ansa, em que as primeira e segunda sequências nucleotídicas, quando emparelhadas,

geram um pequeno ácido nucleico de interferência que modula a expressão de um alvo, em que a terceira sequência nucleotídica é de comprimento suficiente para permitir que as primeira e segunda sequências nucleotídicas emparelhem estavelmente uma com a outra e em que a terceira sequência nucleotídica compreende uma sequência nucleotídica antissentido capaz de modular a expressão de um alvo através da supressão antissentido e em que o alvo modulado pela sequência nucleotídica antissentido e o alvo modulado pelo pequeno ácido nucleico de interferência podem ser os mesmos ou diferentes; e cultura da referida célula.

Numa realização, uma construção nucleotídica, compreende: uma sequência nucleotídica que forma uma haste e uma ansa; em que a ansa compreende uma primeira sequência nucleotídica que modula a expressão de um alvo; em que a haste compreende uma segunda sequência nucleotídica que modula a expressão de um alvo; e em que o alvo modulado pela primeira sequência nucleotídica e o alvo modulado pela segunda sequência nucleotídica podem ser os mesmos ou diferentes.

Numa outra realização exemplificativa, a primeira sequência nucleotídica que modula a expressão de um alvo modula a expressão do alvo através da via de RNAi. Numa outra realização exemplificativa, a primeira sequência nucleotídica que modula a expressão de um alvo modula a expressão do alvo através da modulação antissentido da expressão.

Numa realização particular, uma construção nucleotídica compreende: uma sequência nucleotídica que forma uma haste e uma ansa; e um gene de interesse ligado operacionalmente a um promotor, em que a haste compreende uma segunda sequência nucleotídica que modula a expressão de um alvo e em que a ansa compreende uma primeira sequência nucleotídica que pode ou não modular a expressão de um alvo. Ainda numa outra realização exemplificativa, o gene de interesse operacionalmente ligado a um promotor está situado na ansa.

Uma outra realização proporciona um vector compreendendo as sequências codificadoras das sequências nucleotídicas, como anteriormente descrito. Uma realização alternativa proporciona um vector compreendendo um promotor operacionalmente ligado a uma sequência codificadora de uma sequência nucleotídica que forma uma haste e uma ansa; em que a ansa compreende uma primeira sequência nucleotídica que modula a expressão de um alvo; e em que a haste compreende uma segunda sequência nucleotídica que modula a expressão de um alvo.

Uma realização exemplificativa proporciona um método de regulação da expressão de um alvo, o método compreendendo: introdução numa célula de uma sequência compreendendo uma sequência nucleotídica que forma uma haste e uma ansa; em que a ansa compreende uma primeira sequência nucleotídica que modula a expressão do alvo; e em

que a haste compreende uma segunda sequência nucleotídica que modula a expressão do alvo; e cultura da referida célula.

Uma realização exemplificativa proporciona um método de regulação da expressão de um alvo, o método compreendendo a introdução numa célula de um vector compreendendo um promotor operacionalmente ligado a uma sequência codificadora de uma sequência nucleotídica que forma uma haste e uma ansa; em que a ansa compreende uma primeira sequência nucleotídica que modula a expressão do alvo; e em que a haste compreende uma segunda sequência nucleotídica que modula a expressão do alvo; e expressão da sequência nucleotídica a partir do referido vector na referida célula.

Uma outra realização proporciona um método de tratamento de uma condição num indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo da sequência anteriormente descrita compreendendo a sequência nucleotídica que forma uma haste e uma ansa. Uma realização particular compreendendo a administração ao indivíduo de um vector compreendendo um promotor operacionalmente ligado a uma sequência codificadora de uma sequência nucleotídica que forma uma haste e uma ansa.

Uma realização particular proporciona um medicamento compreendendo: uma sequência compreendendo uma sequência nucleotídica que forma uma haste e uma ansa; em

que a ansa compreende uma primeira sequência nucleotídica que modula a expressão de um alvo; e em que a haste compreende uma segunda sequência nucleotídica que modula a expressão de um alvo e um veículo, diluente e/ou adjuvante aceite em termos farmacêuticos. Uma realização alternativa proporciona um medicamento compreendendo uma sequência compreendendo um vector que inclui um promotor operacionalmente ligado a uma sequência codificadora de uma sequência nucleotídica que forma uma haste e uma ansa.

Uma realização exemplificativa proporciona uma célula compreendendo a sequência nucleotídica anteriormente descrita que forma uma haste e uma ansa. Uma realização alternativa compreende a obtenção de uma célula compreendendo um vector que inclui um promotor operacionalmente ligado a uma sequência codificadora de uma sequência nucleotídica que forma uma haste e uma ansa.

Uma realização exemplificativa proporciona um método de produção de uma construção para a regulação de um alvo, o método compreendendo: combinação numa única sequência de ácido nucleico uma primeira e uma segunda sequências capaz de emparelhamento de bases para formar uma estrutura de haste-ansa na construção, e uma terceira sequência, colocada entre a primeira e a segunda sequências; em que as referidas primeira e segunda sequências, quando emparelhadas, são capazes de gerar um siRNA; em que a referida terceira sequência tem o tamanho suficiente para permitir que a primeira e a segunda sequências emparelhem

estavelmente uma com a outra; e em que a referida terceira sequência compreende uma sequência capaz de modular um alvo através de supressão antissentido.

Uma realização exemplificativa proporciona um método de preparação de uma construção para regulação de um alvo, o método compreendendo: combinação numa única sequência de ácido nucleico de uma primeira e segunda sequência capaz de emparelhamento de bases para formar uma estrutura haste-ansa na construção; uma terceira sequência, colocada entre a primeira e a segunda sequência; e uma quarta sequência compreendendo um gene de interesse operacionalmente ligado a um promotor, em que as referidas primeira e segunda sequências, quando emparelhadas, são capazes de gerar um siRNA; em que a referida terceira sequência é de tamanho suficiente para permitir que a primeira e a segunda sequências emparelhem estavelmente uma com a outra; e em que a referida terceira sequência pode ou não compreender uma sequência capaz de modular um alvo através de supressão antissentido alvo.

Uma outra realização proporciona um método de produção de uma planta com níveis modificados de componentes endógenos ácidos gordos. O método inclui a modulação dos níveis de um gene heterólogo, como seja um gene da síntese de ácidos gordos ou do metabolismo de lípidos.

O presente invento pode ainda ser utilizado em

combinação com várias metodologias de silenciamento de genes usando tecnologias de RNAi e antissentido, que são conhecidas na arte como proporcionando maior modulação da expressão de genes, dirigidas a um ou mais genes e/ou vias genéticas específicas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

FIG. 1 é uma representação gráfica das construções de pPHAS-Fab1-AS, pPHAS- Fab1-HP e pPHAS-Fab1-HPAS.

FIG. 2 é uma representação gráfica das construções de pPHAS-Fad2-AS, pPHAS- Fad2-HP, pPHAS-Fad2-HPAS e pPHAS-Fad2-HP-GUS.

FIG. 3 é uma representação gráfica das construções de pPHAS-Fad3-AS, pPHAS- Fad3-HP e pPHAS-Fad3-HPAS.

FIG. 4 é um diagrama que mostra como a construção pPHAS-Fab1-HPAS pode ser processada numa célula para modular a expressão de Fab1.

FIG. 5 é um diagrama esquemático da produção de ácidos gordos em *Arabidopsis*.

FIG. 6 mostra curvas de cromatografia gasosa indicando os níveis de vários ácidos gordos em sementes contendo pPHAS-Fab1-HP e pPHAS-Fab1-HPAS comparativamente com a estirpe de base.

FIG. 7 é um sumário gráfico indicando os níveis de vários ácidos gordos em sementes contendo pPHAS-Fab1-HP e pPHAS-Fab1-HPAS comparativamente com a estirpe de base.

FIG. 8 mostra curvas de cromatografia gasosa indicando os níveis de vários ácidos gordos em sementes contendo pPHAS-Fad2-AS comparativamente com a estirpe selvagem.

FIG. 9 mostra curvas de cromatografia gasosa indicando os níveis de vários ácidos gordos em sementes contendo pPHAS-Fad2-HP e pPHAS-Fad2-HPAS comparativamente com o mutante Fad2-MT.

FIG. 10 é um sumário gráfico indicando os níveis de vários ácidos gordos em sementes contendo pPHAS-Fad2-AS, [rho]PHAS-Fad2-HP e pPHAS-Fad2-HPAS comparativamente com o mutante Fad2-MT e a estirpe de fundo.

FIG. 11 mostra curvas de cromatografia gasosa indicando os níveis de vários ácidos gordos em sementes contendo pPHAS-Fad2-HP-GUS comparativamente com a estirpe de fundo.

FIG. 12 mostra uma fotografia contendo as sementes selvagens (sementes mais leves) e sementes que expressam GUS a partir de pPHAS-Fad2-HP-GUS (sementes mais escuras).

FIG. 13 mostra curvas de cromatografia gasosa indicando os níveis de vários ácidos gordos em sementes contendo pPHAS-Fad3-AS comparativamente com a estirpe selvagem.

FIG. 14 mostra curvas de cromatografia gasosa indicando os níveis de vários ácidos gordos em sementes contendo pPHAS-Fad3-HP e pPHAS-Fad3-HPAS comparativamente com o mutante Fad3-MT.

FIG. 15 é um sumário gráfico indicando os níveis de vários ácidos gordos em sementes contendo pPHAS-Fad3-AS, pPHAS-Fad3-HP e pPHAS-Fad3-HPAS comparativamente com o mutante Fad3-MT e a estirpe de fundo.

MODOS PARA REALIZAÇÃO DO INVENTO

Um aspecto do presente invento está relacionado com métodos úteis para a modulação da expressão de um alvo numa célula. São igualmente divulgadas composições úteis para a modulação da expressão de um alvo numa célula. Especificamente, os aspectos da presente divulgação e invenção relacionam-se ou usam sequências nucleotídicas capazes de modular a expressão de um alvo, como seja um gene, sequência oligonucleotídica e/ou proteína, através de interferência por RNA (RNAi) e/ou supressão antissentido. De um modo geral, as moléculas de sequência nucleotídica moduladoras (mNS) podem incluir uma estrutura haste-ansa,

em que a haste proporciona um substrato de dicer, podendo actuar para suprimir um alvo através da via de RNAi, e em que a porção da ansa da estrutura pode compreender uma primeira sequência, podendo actuar para suprimir um gene através de supressão antissentido. As moléculas de mNS podem ser, na totalidade ou em parte, modificadas quimicamente e/ou criadas por síntese química. O uso de mNS quimicamente modificadas pode melhorar várias propriedades das moléculas mNS, por exemplo, através do aumento de resistência à degradação por nucleases *in vivo* e/ou melhor internalização pelas células. As moléculas de mNS quimicamente modificadas proporcionam reagentes e métodos úteis para uma variedade de aplicações terapêuticas, de diagnóstico, agrícolas, de validação de alvos, descoberta genómica, engenharia genética e farmacogenómica.

Numa realização particular, as moléculas de mNS compreendem uma estrutura de haste-ansa (gancho de cabelo), em que a haste contém uma sequência de ácido nucleico de cadeia dupla (dsNA) capaz de ser cortada por dicer e libertação de pelo menos um pequeno ácido nucleico de interferência (siNA) que é capaz de suprimir um mRNA através da via de RNAi. Ainda, a ansa da molécula de mNS contém pelo menos um ácido nucleico antissentido (asNA). De um modo geral, tais moléculas serão referidas aqui como ácidos nucleicos formadores de ganchos de cabelo com antissentido na ansa ou "hpNAas".

O siNA e a ansa dos hpNAas podem ter como alvo a

mesma localização no mesmo gene e/ou mRNA. Numa outra realização exemplificativa, o siRNA e a ansa dos hpNAs podem ter como alvo uma localização diferente no mesmo gene e/ou mRNA. O siRNA e a ansa dos hpNAAs podem também ter como alvo genes e/ou mRNAs diferentes.

A porção da haste dos hpNAAs pode conter mais de uma sequência capaz de gerar um siNA. Caso exista mais de um siNA gerado a partir da haste dos hpNAAs, estes siNAs podem ter como alvo o mesmo local no mesmo mRNA. Os siNAs podem ter como alvo locais diferentes no mesmo mRNA. Os siNAs podem ter como alvo diferentes mRNAs.

A porção da ansa dos hpNAAs pode conter mais uma sequência asNA. Caso exista mais de um asNA na ansa dos hpNAAs, estes asNAs podem ter como alvo o mesmo local no mesmo gene e/ou mRNA. Os asNAs podem ter como alvo diferentes locais no mesmo gene e/ou mRNA. Os asNAs podem também ter como alvo diferentes genes e/ou mRNAs.

Numa outra realização exemplificativa, a porção da haste dos hpNAAs pode conter mais de uma sequência capaz de gerar um siNA e a porção da ansa dos hpNAAs pode conter mais de uma sequência asNA. Estes siNAs e asNAs podem ter como alvo o mesmo local no mesmo mRNA, diferentes locais no mesmo mRNA, diferentes mRNAs ou qualquer combinação dos mesmos.

Numa realização particular, um único siNA e/ou

asNA de um hpNAas podem ter como alvo mais de um gene, sequência nucleotídica e/ou proteína. Devido a muitos genes poderem partilhar algum grau de homologia de sequências uns com os outros, as moléculas de siNA e/ou asNA podem ser projectadas para ter como alvo uma classe de genes (e genes associados de receptores ou ligandos) ou, como alternativa, genes específicos através da selecção de sequências que são partilhadas por diferentes genes alvo ou, como alternativa, que podem ser únicos relativamente a um alvo de gene específico. Numa realização exemplificativa, a molécula de siNA e/ou asNA pode ser projectado para ter como alvo regiões conservadas de, por exemplo, uma sequência de RNA tendo homologia entre vários genes de forma a atingir vários genes ou famílias de genes (e.g., diferentes isoformas de genes, variantes de *splicing* genes mutantes, etc.) com uma molécula de siNA e/ou asNA. Numa outra realização exemplificativa, a molécula de siNA e/ou asNA pode ser projectada para atingir uma sequência que é única de um gene, sequência nucleotídica e/ou proteína específica devido ao elevado grau de especificidade que a molécula de siNA e/ou asNA requer para mediar uma actividade moduladora.

Numa outra realização exemplificativa, as moléculas de hpNAas podem conter um ou mais locais de *splicing*. Estes locais de *splicing* podem estar operacionalmente colocados e orientados de forma a permitirem a clivagem da porção da ansa dos hpNAas a partir da porção da haste do hpNAas como se fosse um intrão. hpNAas contendo tais locais

de *splicing* colocados de forma operacionalmente orientada serão daqui em diante referidos como "hpNAas contendo intrões" ou "ihpNAas".

Numa outra realização, mNS podem conter um gene de interesse operacionalmente ligado a um promotor. Quando o mNS possuir uma estrutura em gancho de cabelo ou uma ansa, realizações particulares permitem a presença do promotor e do gene de interesse dentro da ansa. Noutras realizações, o asNA pode estar presente ou ausente na ansa contendo o promotor e o gene de interesse.

O gene de interesse pode ser qualquer gene que um utilizador pretenda expressar. O gene pode ser o mesmo ou relacionado com o alvo do mNS. Como exemplo não limitante, o mNS poderá ter como alvo uma forma mutada de um gene de interesse ao mesmo tempo proporcionando uma cópia normal ou manipulada geneticamente como substituição. Numa outra realização exemplificativa, o promotor e o gene de interesse podem estar perto ou dentro de uma ou mais sequências que promovam a integração num genoma. Exemplos de promotores úteis no presente invento incluem, mas não lhes estão limitados, promotores virais, retrovirais, de mamífero, vegetais, bacterianos, constitutivos, reguláveis, fúngicos, de leveduras, de algas e de insectos. Os promotores vegetais úteis no presente invento incluem, por exemplo, os identificados em *Arabidopsis*, girassol, algodão, colza (incluindo canola), milho, trigo, castor, palma, tabaco, amendoim, sorgo, cana sacarina ou soja.

Promotores adequados úteis no presente invento incluem, por exemplo, promotores específicos de sementes, promotores induzíveis, promotores constitutivos, incluindo mas não lhes estando limitados, proteína de reserva 2S, faseolina, CaMV 35S, napina, cruciferina, ubiquitina, oelosina, vírus do mosaico das nervuras da mandioca, prunina, legumina e sintetase de octopina.

A introdução de nucleótidos quimicamente modificados ou sintéticos e/ou açúcares nas moléculas de mNS pode proporcionar uma poderosa ferramenta para ultrapassar potenciais limitações de estabilidade e biodisponibilidade *in vivo* inerentes às moléculas de RNA nativas que são cortadas exogenamente. Por exemplo, o uso de mNS quimicamente modificados ou mNS contendo nucleótidos sintéticos pode permitir uma dose mais baixa de um mNS particular para um determinado efeito terapêutico, uma vez que estas moléculas tendem a ter uma semivida mais longa no soro. Ainda, determinadas modificações químicas podem melhorar a biodisponibilidade das moléculas de ácido nucleico através do alvejamento de células ou tecidos particulares, e/ou melhoramento da internalização celular da molécula de ácido nucleico. Assim, mesmo se a actividade de uma molécula de ácido nucleico quimicamente modificada ou sintética for reduzida comparativamente com uma molécula de ácido nucleico nativa (e.g., quando comparado com uma molécula completa de ácido nucleico RNA), a actividade global da molécula de ácido nucleico modificada ou sintética pode ser superior à da molécula nativa devido a maior estabilidade

e/ou entrega da molécula. Ao contrário de siRNA não modificado nativo, siNA quimicamente modificado pode também minimizar a possibilidade de activar a actividade de interferência em seres humanos.

Numa realização exemplificativa, um mNS pode compreender uma ou mais modificações e/ou bases sintéticas. Exemplos de modificações e/ou bases sintéticas incluem, mas não lhes estão limitadas, 2'-amino, 2'-O-metilo, 2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-desoxi, 2'-metoximetil, 4'-tio, 5-C-metilo, "base universal", "ácido nucleico trancado (LNA)", morfolino e "nucleótidos acíclicos" assim como nucleótidos contendo uma ponte metileno 2'-O ou 4'-C, glicerilo terminal e/ou incorporação do resíduo desoxi abásico invertido, ligações fosforotioato internucleótidos e nucleótidos tendo uma conformação Northern (e.g., ciclo de pseudorotação Northern, ver por exemplo Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag ed., 1984). O mNS pode ainda compreender um ou mais desoxirribonucleótidos e/ou didesoxirribonucleótidos.

O termo "base universal" como aqui usado refere-se a análogos de bases nucleotídicas que formam pares de bases com cada uma das bases de DNA/RNA naturais com pouca discriminação entre elas. Exemplos não limitantes de bases universais incluem C-fenilo, C-naftilo e outros derivados aromáticos, inosina, azole, azole carboxamidas e derivados de nitroazole tais como 3-nitropirrole, 4-nitroindole, 5-nitroindole e 6-nitroindole como conhecido na arte (ver por

exemplo Loakes, 2001, Nucleic Acids Research, 29, 2437-2447). O termo "nucleótido acíclico" como aqui usado refere-se a qualquer nucleótido tendo um açúcar ribose acíclico, por exemplo em que qualquer um dos carbonos da ribose (C1, C2, C3, C4 ou C5) estão, independentemente ou em combinação, ausentes do nucleótido.

As bases num mNS podem ser modificadas, por exemplo, através da adição de substituintes ou modificação de uma ou mais posições, por exemplo, nas pirimidinas e purinas. A adição de substituintes pode ou não saturar uma dupla cadeia, por exemplo, das pirimidinas e purinas. Exemplos de substituintes incluem, mas não lhes estão limitados, grupos alquilo, grupos nitro, halogénios e/ou hidrogénios. Os grupos alquilo podem ter qualquer comprimento, de preferência entre um e seis carbonos. Os grupos alquilo podem ser saturados ou insaturados; e podem ser de cadeia linear, ramificada ou cíclica. Os halogénios podem ser qualquer um dos halogénios incluindo, mas não lhes estando limitados, brómio, iodo, flúor e/ou cloro.

Outra modificação das bases pode ser conseguida por permuta e/ou substituição dos átomos nas bases. Exemplos não limitantes incluem: permuta das posições de um átomo de azoto e de um átomo de carbono nas bases, substituição de um átomo de carbono por um átomo de azoto e/ou um átomo de silício, substituição de um átomo de enxofre por um átomo de oxigénio e/ou substituição de um átomo de oxigénio por um átomo de azoto. Outras

modificações das bases incluem, mas não lhes estão limitadas, a fusão de um anel adicional com as bases, tais como um anel adicional de cinco ou seis membros. O anel fundido pode possuir vários outros grupos.

Exemplos específicos de bases modificadas incluem, mas não lhes estão limitadas, 2,6- diaminopurina, 2-aminopurina, pseudoisocitosina, E-base, tiouracilo, ribotimidina, di-hidro-uridina, pseudo-uridina, 4-tiouridina, 3-metilcitidina, 5-metilcitidina, N⁶-metiladenosina, N⁶-isopenteniladenosina, -metilguanosina, queuosina, viosina, eteno-adenina, eteno-citosina, 5-metilcitosina, bromotimina, azadenina, azaguanina, 2-fluoro-uridina e 2'-fluoro-citidina.

mNS pode compreender nucleótidos modificados e/ou sintéticos como uma percentagem do número total de nucleótidos presentes na molécula mNS. Como tal, uma molécula mNS pode, de um modo geral, compreender nucleótidos modificados e/ou sintéticos entre cerca de 5 e cerca de 100% das posições nucleotídicas (e.g., 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% das posições nucleotídicas). A percentagem real de nucleótidos modificados presentes numa determinada molécula mNS depende do número total de nucleótidos presentes no mNS.

Numa realização particular, mNS compreende um esqueleto molecular que liga os vários nucleótidos em

sequência. Realizações exemplificativas de mNS podem ter esqueletos moleculares incluindo, mas não lhes estando limitados, ribose, 2'-O-alkilribose, 2'-O-metilribose, 2'-O-alilribose, desoxirribose, 2-desoxirribose, morfolino e/ou esqueletos peptídicos. O esqueleto pode compreender unidades de açúcar e/ou de não açúcar. Estas unidades podem ser ligadas umas às outras através de qualquer modo conhecido na arte. Os nucleótidos podem ser ligados através de grupos de ligação. Alguns exemplos de grupos de ligação incluem, mas não lhes estão limitados, fosfato, tiofosfato, ditiofosfato, metilfosfato, amidato, fosforotioato, metilfosfonato, fosforotioato e/ou fosforodiamidato. Como alternativa, os nucleótidos podem ser ligados directamente uns aos outros.

Um esqueleto de açúcar pode compreender qualquer açúcar natural. Exemplos de açúcares naturais incluem, mas não lhes estão limitados, ribose, desoxirribose e/ou 2-desoxirribose. As unidades de açúcar de um esqueleto podem ser modificadas de forma que o esqueleto de açúcar modificado seja resistente ao corte. Os açúcares de um esqueleto podem ser modificados por métodos conhecidos na arte, por exemplo, para conseguir resistência ao corte por nucleases. Exemplos de açúcares modificados incluem, mas não lhes estão limitados, 2'-O-alkil riboses, tais como 2'-O-metilribose e 2'-O-alilribose. As unidades de açúcar podem ser ligadas através de ligantes fosfato. Unidades de açúcar típicas podem ser ligadas umas às outras através de ligações 3'-5', 3'-3' ou 5'-5'. Ainda, as ligações 2'-5' são também possíveis se o 2'OH não estiver modificado.

Um esqueleto que não seja de açúcar pode compreender qualquer molécula que não seja de açúcar à qual podem ser ligadas bases. Os esqueletos que não são de açúcar são conhecidos na arte. Exemplos incluem, mas não lhes estão limitados, morfolino e ácidos peptidonucleicos (PNAs). Um esqueleto morfolino é construído com anéis morfolino (tetra-hidro-1,4-oxazina) e pode ser ligado por grupos não iônicos de fosforodiamidato. Morfolinos modificados conhecidos na arte podem ser usados no presente invento.

Os PNAs resultam quando as bases são ligadas a um esqueleto de aminoácidos através de ligações moleculares. Exemplos de tais ligações incluem, mas não lhes estão limitados, ligações de metileno carbonilo, etileno carbonilo e etilo. Os aminoácidos podem ser quaisquer aminoácidos, natural ou não natural, modificado ou não modificado, e são de preferência alfa-aminoácidos. Os aminoácidos podem ser idênticos ou diferentes uns dos outros. Um exemplo não limitante de um aminoácido adequado inclui um amino alquil-aminoácido, como seja (2-aminoetil)-aminoácido.

Exemplos de PNAs incluem, mas não lhes estão limitados, N-(2-aminoetil)-glicina, ciclo-hexil PNA, retro-inverso, fosfona, propinil e aminoprolina-PNA. PNAs podem ser quimicamente sintetizados por métodos conhecidos na arte. Exemplos incluem, mas não lhes estão limitados,

protocolos de síntese de péptidos modificados Fmoc e/ou tBoc.

Para além dos oligonucleótidos antissentido uniformes atrás referidos, é aparente para os familiarizados com a arte que múltiplos tipos de esqueleto podem ser misturados numa única molécula mNS. Por exemplo, uma molécula mNS simples pode conter um ou mais 2'-O-metil nucleótidos, um ou mais morfolinos, um ou mais nucleótidos de RNA e um ou mais PNAs.

Em realizações exemplificativas onde o mNS inclui um hpANas, o comprimento do siNA e/ou asNA num hpANas não é crítico, desde que o comprimento seja suficiente para hibridar especificamente com o alvo. Por exemplo, o segmento de emparelhamento de bases pode ter cerca de duas a cerca de 100 bases, entre cerca de 10 e 50 bases, cerca de 25 bases ou qualquer número individual entre cerca de 10 e cerca de 75 bases.

Vários factores podem ser considerados quando se determina o comprimento dos segmentos de siNA e/ou asNA, assim como a especificidade do alvo, a estabilidade da ligação, o transporte celular e/ou a entrega *in vivo*. Os segmentos de siNA e/ou asNA deverão ser suficientemente longos para se ligarem estavelmente ao alvo de interesse. Igualmente, os segmentos de siNA e/ou asNA deverão ser suficientemente longos para permitir razoável especificidade de ligação uma vez que uma sequência mais pequena

possui maior probabilidade de ocorrer algures no genoma relativamente a uma sequência maior. Outras considerações relacionadas com o comprimento de um segmento de siNA e/ou asNA incluem, a eficiência da entrega *in vivo* ou *ex vivo*, a estabilidade dos segmentos de siNA e/ou asNA *in vivo* ou *in vitro*, e/ou estabilidade do alvo de interesse ligado ou não ligado a um segmento de siNA e/ou asNA.

Numa outra realização exemplificativa, uma molécula de mNS pode ser modificada para otimizar o seu uso em várias aplicações. A optimização pode incluir, mas não lhes está limitada, uma ou mais modificações para melhorar a entrega, internalização celular, localização intracelular e/ou farmacocinética. Uma forma pela qual uma molécula de mNS pode ser modificada é através da adição de sequências sinal específicas. Exemplos incluem, mas não lhes estão limitadas, sinais de retenção nuclear, sinais de localização nuclear e/ou sequências que promovem o transporte através das membranas celulares, a barreira hematocefálica e/ou a barreira placentária. Exemplos específicos incluem, mas não lhes estão limitados, polilisina, poli(E-K), o sinal de localização nuclear do antígeno T do SV40, o extremo N da proteína Tat do HIV, péptidos derivados da proteína Antennapedia de *Drosophila*, um péptido de entrega transdérmica como seja, por exemplo, os descritos por Chen *et al.*, Nature Biotechnology, 24:4455-460, e/ou o péptido Tat de Dowdy. Sequências que localizam oligonucleótido antissentido para locais específicos da célula estão igualmente contemplados. Numa

realização, a divulgação apresenta um ingrediente activo compreendendo uma molécula de mNS.

Numa outra realização exemplificativa, um mNS pode ser combinado com um ou mais veículos, adjuvantes e/ou diluentes, para formar um medicamento ou tratamento químico para um organismo vivo. Exemplos de tais veículos, adjuvantes e/ou diluentes incluem, mas não lhes estão limitados, água, soro fisiológico, solução de Ringer, colesterol e/ou derivados de colesterol, lipossomas, lipofectina, lipofectamina, polietilenoglicol ancorado a lípidos, copolímeros de bloco F108 e/ou fosfatidos, tais como dioleooxifosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, alfa-tocoferol e/ou ciclosporina. Em qualquer dos casos, as moléculas de mNS podem ser misturadas com um ou mais veículos, adjuvantes e/ou diluentes para formarem uma composição ou medicamento disperso que pode ser usado para tratar uma doença, infecção ou condição. Ver, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences; Goodman and Gilman's The Pharmacologic Basis of Therapeutics; Current Protocols in Molecular Biology. Deverá ser aparente para os familiarizados com a área que tal composição dispersa pode igualmente ser usada para destruir a expressão correcta dos genes, sequências nucleotídicas e/ou proteínas envolvidas em processos de doença ou infecciosos ou na produção de produtos animais ou vegetais. Por exemplo, a composição pode ser usada para produzir uma planta com níveis aumentados de um produto de um gene da síntese de ácidos gordos ou do metabolismo de lípidos.

As moléculas mNS, com ou sem um adjuvante e/ou um veículo, podem ser administradas a um organismo ou indivíduo de forma a permitir que as moléculas mNS modulem a expressão de um alvo. Exemplos incluem, mas não lhes estão limitados, injeção específica de local, injeção sistémica e/ou administração intravenosa, oralmente e/ou topicamente. Os organismos e indivíduos contemplados pelo invento incluem, mas não lhes estão limitados, bactérias, células, sistemas de culturas celulares, plantas, fungos, animais, nemátodos, insectos e/ou mamíferos, tais como seres humanos. As plantas contempladas pelo invento incluem, por exemplo, *Arabidopsis*, girassol, algodoeiro, colza (incluindo canola), milho, trigo, castor, palma, tabaco, amendoim, sorgo, cana sacarina e soja.

O alvo pode ser, por exemplo, um ácido nucleico que pode ser um gene endógeno, um gene exógeno, um ácido nucleico viral ou RNA, como seja um gene de mamífero, gene vegetal, gene viral, gene fúngico, gene bacteriano, gene de vírus de plantas ou gene de vírus de mamífero. Exemplos de vírus de mamíferos incluem, mas não lhes estão limitados, vírus da hepatite C, vírus da imunodeficiência humana, vírus da hepatite B, vírus herpes simples, citomegalovírus, vírus do papiloma humano, vírus sincicial respiratório, vírus da gripe e vírus da síndrome respiratória aguda (SARS).

Como será aparente para os familiarizados com a

arte, um alvo pode ser uma sequência nucleotídica ou proteína. Como será igualmente compreendido, as moléculas mNS não tendem a alterar a própria proteína, mas antes atingir as moléculas que controlam a geração daquela proteína. Exemplos de proteínas incluem, mas não lhes estão limitadas, proteína endógena, uma proteína exógena, uma proteína de mamífero, proteína vegetal, proteína viral, proteína fúngica, proteína bacteriana, proteína de vírus das plantas ou proteína de vírus de mamíferos. Exemplos de sequências nucleotídicas incluem, mas não lhes estão limitadas, sequências de DNA, RNA ou PNA.

Numa realização exemplificativa, uma molécula de mNS compreende uma região com sentido e uma região antissentido, em que a região com sentido inclui um grupo de protecção terminal no extremo 5', no extremo 3' ou em ambos os extremos 5' e 3'. O grupo protector pode ser um grupo abásico desoxi invertido, um grupo desoxitimidina invertido ou um grupo timidina.

Uma realização particular proporciona um vector compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificadora de pelo menos uma molécula nMS, numa forma que permite a expressão da molécula de ácido nucleico. Exemplos de vectores incluem, mas não lhes estão limitados, plasmídeos, cosmídeos, vectores retrovirais, agrobactérias, vectores virais, vectores bacterianos, vectores de leveduras, vectores eucarióticos, vectores vegetais e vectores de mamíferos. Outras realizações proporcionam células de

mamífero, células vegetais ou agrobactérias compreendendo tal vector. A célula pode ser de mamífero, como seja, por exemplo, uma célula humana. A molécula mNS do vector pode compreender uma região com sentido, uma região antissentido, uma sequência antissentido e/ou um gene.

Numa realização, as moléculas de mNS caracterizam-se por serem uma molécula de ácido nucleico de interferência (siNA) quimicamente modificada, capaz de mediar a interferência por RNA (RNAi) dentro de uma célula ou sistema reconstituído *in vitro*, em que a modificação química compreende um conjugado ligado a uma molécula de siNA quimicamente modificada. O conjugado pode ser ligado à molécula de siNA quimicamente modificada através de uma ligação covalente. Numa realização específica, o conjugado é ligado à molécula de siNA quimicamente modificada através de um ligante biodegradável. A molécula de conjugado pode ser ligada ao extremo 3' da cadeia com sentido, cadeia antissentido ou de ambas as cadeias da molécula de siNA quimicamente modificada. A molécula de conjugado pode ser ligada ao extremo 5' da cadeia com sentido, cadeia antissentido ou de ambas as cadeias da molécula de siNA quimicamente modificada. A molécula de conjugado pode também ser ligada ao extremo 3' e 5' da cadeia com sentido, cadeia antissentido ou de ambas as cadeias da molécula de siNA quimicamente modificada ou qualquer combinação das mesmas. A molécula do conjugado pode compreender uma molécula que facilite a entrega de uma molécula de siNA quimicamente modificada num sistema biológico, como seja uma célula. Numa realização particular, a molécula de

conjugado ligada à molécula de siNA quimicamente modificada é um polietilenoglicol, albumina sérica humana ou um ligando de um receptor celular que pode mediar a internalização celular. Exemplos de moléculas de conjugado específicas contempladas no presente invento, que podem ser ligadas a moléculas de siNA quimicamente modificadas, estão descritas em Vargeese *et al.*, U.S. Ser. No. 10/201,394. O tipo de conjugados usados e o grau de conjugação das moléculas de siNA podem ser avaliados relativamente aos perfis farmacocinéticos, biodisponibilidade e/ou estabilidade das construções de siNA, enquanto ao mesmo tempo se mantém a capacidade do siNA para mediar a actividade de RNAi. Como tal, os familiarizados com a arte pode testar construções de siNA que estejam modificadas com vários conjugados para determinar se o complexo de conjugado de siNA possui melhores propriedades mantendo ao mesmo tempo a capacidade de mediar RNAi, como seja, por exemplo, modelos animais que são geralmente conhecidos na arte.

Numa outra realização, o invento descreve um método para modulação da expressão de um gene dentro de uma célula. O método inclui a síntese de uma molécula de mNS, a qual pode ser quimicamente modificada, em que a molécula de mNS compreende uma segunda sequência complementar do RNA do gene. A molécula de mNS pode incluir uma sequência substancialmente similar à sequência do RNA alvo, A molécula mNS pode então ser introduzida numa célula em condições adequadas para modular a expressão do gene na célula.

Numa outra realização exemplificativa, o invento descreve um método para modulação da expressão de mais de um gene dentro de uma célula. O método inclui a síntese de uma molécula MNS, a qual pode ser quimicamente modificada, em que a molécula mNS pode ser então introduzida numa célula em condições adequadas para modular a expressão dos genes na célula.

Numa outra realização exemplificativa, o invento descreve um método para modulação da expressão de mais de um gene dentro de uma célula. O método inclui a síntese de uma molécula mNS, a qual pode ser quimicamente modificada, em que a molécula mNS compreende uma sequência complementar do RNA do gene e em que a molécula mNS compreende uma sequência substancialmente similar à sequência do RNA alvo. A molécula mNS pode ser então introduzida numa célula em condições adequadas para modular a expressão dos genes na célula.

Numa realização particular, as moléculas mNS são usadas como reagentes em aplicações *ex vivo*. Por exemplo, as moléculas mNS podem ser introduzidas em tecidos ou células que são transplantadas num organismo ou indivíduo para efeito terapêutico. As células e/ou tecido podem derivar de um organismo ou indivíduo que mais tarde recebe o explante. Como alternativa, as células e/ou tecido podem derivar de um outro organismo ou indivíduo antes do transplante. As moléculas mNS podem ser usadas para modular a expressão de um ou mais genes nas células ou tecidos, de

forma que as células ou tecidos obtêm um fenótipo pretendido e são capazes de efectuar uma função quando transplantadas *in vivo*. Numa realização exemplificativa, determinadas células alvo são extraídas de um organismo ou indivíduo. Estas células extraídas são colocadas em contacto com moléculas mNS tendo como alvo uma sequência nucleotídica específica dentro das células em condições adequadas para a internalização das moléculas mNS por estas células (e.g. usando reagentes de entrega tais como lípidos catiónicos, lipossomas e similares, ou usando técnicas tais como electroporação para facilitar a entrega das moléculas mNS nas células). As células são então introduzidas novamente no mesmo organismo ou noutros organismos. Exemplos não limitantes de aplicações *ex vivo* incluem o uso em transplante de órgãos/tecidos, enxerto de tecidos ou no tratamento de doença pulmonar (e.g. reestenose) ou para prevenção de hiperplasia neointimal e aterosclerose em enxertos de veias. Tais aplicações *ex vivo* podem também ser usadas para tratar condições associadas a falência de enxerto para derivação periférica, por exemplo, tais métodos podem ser usados conjuntamente com cirurgia de enxerto para derivação vascular periférica e cirurgia de enxerto para derivação das artérias coronárias. Outras aplicações incluem o uso em transplantes para tratar lesões do SNC, incluindo o uso no tratamento de condições neurodegenerativas tais como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, epilepsia, demência, doença de Huntington ou esclerose lateral amiotrófica (ALS).

Numa outra realização, o invento descreve um método de modulação da expressão de um gene num organismo. O método inclui a síntese de uma molécula mNS, em que a molécula mNS compreende uma sequência complementar do RNA do gene. A molécula mNS pode ser então introduzida no organismo em condições adequadas para modular a expressão do gene no organismo.

Numa outra realização exemplificativa, o invento descreve um método de modulação da expressão de mais de um gene num organismo. O método inclui a síntese de uma molécula mNS, em que a molécula mNS compreende uma sequência complementar do RNA dos genes. A molécula mNS pode ser então introduzida no organismo em condições adequadas para modular a expressão dos genes no organismo. Numa realização alternativa, o invento descreve um método para modulação da expressão de um gene dentro de uma célula através da síntese de uma molécula mNS, em que a molécula mNS compreende uma sequência tendo complementaridade com RNA do gene. A molécula mNS pode ser então introduzida numa célula em condições adequadas para modular a expressão do gene na célula.

Noutras realizações, o invento descreve um método de modulação da expressão de mais de um gene dentro de uma célula, o qual inclui a síntese de moléculas mNS, em que a molécula mNS compreende uma sequência tendo complementaridade com o RNA dos genes. A molécula mNS pode então ser posta em contacto com uma célula *in vitro* ou *in vivo*, em

condições adequadas para modular a expressão dos genes na célula. Numa outra realização, o invento inclui um método de modulação da expressão de um gene num organismo. Uma molécula mNS tendo complementaridade com o RNA do gene pode ser sintetizada e a molécula mNS pode ser introduzida no organismo em condições adequadas para modular a expressão do gene no organismo. Uma outra realização descreve um método de modulação da expressão de mais de um gene num organismo através da síntese de moléculas mNS que incluem uma sequência tendo complementaridade com RNA dos genes e introdução das moléculas mNS no organismo em condições adequadas para modular a expressão dos genes no organismo. Uma outra realização inclui um método de modulação da expressão de um gene num organismo através do contacto do organismo com a molécula mNS em condições adequadas para modular a expressão do gene no organismo. Ainda, uma outra realização alternativa descreve um método de modulação da expressão de mais de um gene num organismo através do contacto do organismo com uma ou mais moléculas mNS, em condições adequadas para modular a expressão dos genes no organismo. As moléculas mNS podem ser projectada para inibirem a expressão do gene alvo através do alvejamento por RNAi de uma variedade de moléculas de RNA. Numa realização, as moléculas de mNS podem ser usadas para atingir vários RNAs correspondendo a um gene alvo. Exemplos não limitantes de tais RNAs incluem o RNA mensageiro (mRNA), variantes de *splicing* alternativo do RNA de um ou mais genes alvo, RNA modificado pós-transcrição para um ou mais genes alvo, pré-mRNA de um ou mais genes alvo e/ou

matrizes de RNA. Se o *splicing* alternativo produzir uma família de transcritos que se distinguem pelo uso de exões adequados, o presente invento pode ser usado para inibir a expressão de genes através dos exões adequados para especificamente inibir ou distinguir entre as funções dos membros da família de genes. Por exemplo, uma proteína que possua domínios transmembranares de *splicing* alternativo pode ser expressa nas formas ligada à membrana e secretada. O uso do invento para atingir o exão contendo o domínio transmembranar pode ser usado para determinar as consequências funcionais do alvejamento farmacêutico da proteína ligada à membrana em oposição à forma secretada da proteína. Exemplos não limitantes de aplicações do invento relacionadas com o alvejamento destas moléculas de RNA incluem aplicações farmacêuticas terapêuticas, aplicações de descoberta molecular e farmacêutica, modificação de produtos/moléculas animais e vegetais, aplicações em diagnóstico molecular e funções de genes e mapeamento de genes, por exemplo, usando mapeamento de polimorfismos de nucleótidos isolados com moléculas de siNA. Tais aplicações podem ser implementadas usando sequências de genes conhecidas ou a partir de sequências parciais disponíveis a partir de uma marca de sequência expressa (EST). Numa realização, a modificação envolve um gene da síntese de ácidos gordos ou um gene do metabolismo de lípidos numa planta.

Numa outra realização, as moléculas de mNS podem ser usadas para atingir sequências conservadas correspondendo a uma família de genes ou famílias de genes. Como

tal, moléculas de mNS tendo como alvo múltiplos genes podem proporcionar maior efeito biológico ou um efeito modificado (como seja na produção da síntese de ácidos gordos numa planta ou semente). Ainda, as moléculas mNS podem ser usadas para caracterizar vias da função do gene numa variedade de aplicações. Por exemplo, o presente invento pode ser usado para inibir a actividade de um ou mais genes alvo numa via, para determinar a função de um ou mais genes não caracterizados na análise da função de genes, na análise da função de mRNA ou na análise da tradução. O invento pode ser usado para determinar potenciais vias de alvejamento de genes envolvidos em várias doenças e condições para desenvolvimento de produtos, moléculas ou fármacos. O invento pode ser usado para compreender as vias de expressão de genes envolvidos, por exemplo, em desenvolvimento, como seja desenvolvimento pré-natal e desenvolvimento pós-natal e/ou progressão e/ou manutenção de cancro, doença infecciosa, auto-imunidade, inflamação, distúrbios endócrinos, doença renal, doença pulmonar, doença cardiovascular, defeitos congénitos, envelhecimento, qualquer outra doença ou condição relacionada com a expressão de genes. O invento pode ser usado para modificar a expressão de genes em plantas ou animais ou pode ser usado para modificar a síntese de produtos animais ou vegetais, tais como, por exemplo, modificação da síntese de ácidos gordos em plantas e sementes de plantas.

Numa outra realização, o invento descreve um método para validação de um gene alvo. O método inclui a

síntese de uma molécula mNS, a qual pode ser quimicamente modificada, e ainda inclui uma sequência complementar do RNA de um gene alvo. A molécula mNS pode então ser introduzida num sistema biológico em condições adequadas para modulação da expressão do gene alvo no sistema biológico. A função do gene pode ser determinada através de ensaios para determinar qualquer alteração fenotípica no sistema biológico.

Por "sistema biológico" pretende-se significar material, numa forma purificada ou não purificada, derivado de fontes biológicas, incluindo, mas não lhes estando limitados, fontes humanas, animais, vegetais, de insecto, bacterianas, virais ou outras, em que o sistema compreende os componentes necessários para a actividade de RNAi. O termo "sistema biológico" inclui, por exemplo, uma célula, tecido ou organismo ou extracto dos mesmos. O termo sistema biológico também incluir sistemas de RNAi reconstituídos que podem ser usados num contexto *in vitro*.

Por "alteração fenotípica" pretende-se significar qualquer alteração detectável numa célula que ocorra como resposta ao contacto ou ao tratamento com uma molécula de ácido nucleico (e.g., mNS). Tais alterações detectáveis incluem, mas não lhes estão limitadas, alterações na forma, tamanho, proliferação, motilidade, expressão proteica ou expressão de RNA ou outras alterações físicas ou químicas que possam ser testadas pelos métodos conhecidos na arte. A alteração detectável pode também incluir a expressão de

genes/moléculas repórter tais como Proteína Fluorescente verde (GFP) ou outras marcas que sejam usadas para identificar uma proteína expressa ou qualquer outro componente celular que possa ser testado.

Numa realização particular, a divulgação descreve um kit contendo uma molécula mNS, a qual pode ser usada para modular a expressão de um alvo numa célula, tecido ou organismo. Numa outra realização, a divulgação descreve um kit contendo mais de uma molécula mNS, a qual pode ser modificada quimicamente, que pode ser usada para modular a expressão de mais de um gene alvo numa célula, tecido ou organismo. Ainda numa outra realização, a divulgação descreve um kit contendo um vector codificador de uma molécula mNS que pode ser usado para modular a expressão de um gene num sistema biológico. Numa outra realização, a divulgação descreve um kit contendo um vector codificador de mais de uma molécula mNS que pode ser usada para modular a expressão de mais de um gene alvo num sistema biológico.

Uma outra realização descreve uma célula contendo uma ou mais moléculas mNS. Numa realização particular, é proporcionada uma célula contendo um vector codificador de uma ou mais moléculas mNS. A célula contendo uma molécula mNS pode ser uma célula de mamífero ou uma célula vegetal. Por exemplo, as células contendo uma molécula mNS podem ser de *Arabidopsis*, girassol, algodão, colza (incluindo canola), milho, trigo, castor, palma, tabaco, amendoim, sorgo, cana sacarina ou soja.

O invento também inclui moléculas mNS que medeiam RNAi numa célula ou sistema reconstituído, em que a molécula mNS compreende uma ou mais modificações químicas aqui descritas que modulam a actividade de polimerase de uma polimerase celular capaz de gerar moléculas de siRNA endógenas adicionais tendo homologia de sequências com a molécula de mNS quimicamente modificada.

A divulgação inclui uma molécula mNS que medeia RNAi numa célula ou sistema reconstituído, em que a molécula mNS compreende uma ou mais modificações químicas aqui descritas que modulam a internalização celular da molécula mNS. Numa realização específica, a divulgação descreve a molécula mNS que medeia a expressão de um alvo, em que a molécula mNS compreende uma ou mais modificações químicas aqui descritas que aumenta a biodisponibilidade da molécula mNS, por exemplo, através da ligação de conjugados poliméricos tais como polietilenglicol ou conjugados equivalentes que melhoram a farmacocinética da molécula mNS ou através da ligação de conjugados que têm como alvo tipos específicos de tecidos ou células *in vivo*. Exemplos não limitantes de tais conjugados estão descritos em Vargeese *et al*, U.S. Ser. No. 10/201,394.

Numa realização exemplificativa, a divulgação descreve um método de geração de uma molécula mNS com biodisponibilidade melhorada, compreendendo (a) introdução de um conjugado na estrutura de uma molécula mNS e (b)

realização de testes com a molécula de mNS do passo (a) em condições adequadas para o isolamento da molécula mNS tendo melhor biodisponibilidade. Tais conjugados podem incluir ligandos de receptores celulares, tais como péptidos derivados de ligandos proteicos naturais; sequências de localização de proteínas, incluindo sequências codificadoras de ZIP celular; anticorpos; aptâmeros de ácido nucleico; vitaminas e outros cofactores, tais como folato e N-acetilgalactosamina; polímeros, tais como polietilenoglicol (PEG); fosfolípidos; colesterol; poliaminas, tais como espermina ou espermidina; e outros. Numa outra realização, polietilenoglicol (PEG) pode ser ligado covalentemente à molécula mNS. O PEG ligado pode ser de qualquer massa molecular, de preferência entre cerca de 2000 e cerca de 50000 daltons (Da).

O presente invento pode ser usado sozinho ou como um componente de um kit tendo pelo menos um dos reagentes necessários à realização da introdução *in vitro* ou *in vivo* de RNA para testar amostras e/ou indivíduos. Por exemplo, componentes adequados do kit podem incluir uma molécula mNS e um veículo que promova a introdução da molécula MNS nas células de interesse como aqui descrito (*e.g.*, usando lípidos e outros métodos de transfecção conhecidos na arte, ver por exemplo Beigelman *et al*, Pat. U.S. No. 6,395,713). O kit pode ser usado para a validação de alvos, como seja na determinação da função e/ou actividade de genes ou na optimização de fármacos e na descoberta de fármacos (ver por exemplo, Usman *et al.*, U.S. Ser. No. 60/402,996). Tal

kit pode também incluir instruções para permitir que um utilizador do kit execute o invento.

O termo "pequeno ácido nucleico de interferência", "siRNA", "pequeno RNA de interferência", siRNA, "molécula pequena de ácido nucleico de interferência", "molécula de pequeno oligonucleótido de interferência" ou "molécula de pequeno ácido nucleico de interferência quimicamente modificada" como aqui usado refere-se a qualquer molécula de ácido nucleico capaz de inibir ou regular negativamente a expressão de genes ou replicação viral, por exemplo através da mediação da interferência por RNA, "RNAi", ou silenciamento de genes numa forma específica de sequência; ver por exemplo Bass, 2001, *Nature*, 411, 428-429; Elbashir *et al.*, 2001, *Nature*, 411, 494-498; e Kreutzer *et al.*, Publicação Internacional PCT No. WO 00/44895; Zernicka-Goetz *et al.*, Publicação Internacional PCT No. WO 01/36646; Fire, International PCT Publication No. WO 99/32619; Plaetinck *et al.*, Publicação Internacional PCT No. WO 00/01846; Mello and Fire, Publicação Internacional PCT No. WO 01/29058; Deschamps-Depaillette, Publicação Internacional PCT No. WO 99/07409; and Li *et al.*, Publicação Internacional PCT No. WO 00/44914; Allshire, 2002, *Science*, 297, 1818-1819; Volpe *et al.*, 2002, *Science*, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, *Science*, 297, 2215-2218; e Hall *et al.*, 2002, *Science*, 297, 2232-2237; Hutvagner and Zamore, 2002, *Science*, 297, 2056-60; McManus *et al.*, 2002, *RNA*, 8, 842-850; Reinhart *et al.*, 20.02, *Gene & Dev.*, 16, 1616-1626; e Reinhart &

Bartel, 2002, Science, 297, 1831). Por exemplo, o siRNA pode ser uma molécula polinucleotídica de cadeia dupla, compreendendo regiões complementares com sentido e antissentido, em que a região antissentido compreende a sequência nucleotídica que é complementar da sequência nucleotídica numa molécula de ácido nucleico alvo ou numa porção da mesma e a região com sentido possui a sequência nucleotídica correspondendo à sequência de ácido nucleico alvo ou uma porção da mesma.

O siRNA pode ser montado a partir de dois oligonucleótidos separados, em que uma cadeia é a cadeia com sentido e a outra é a cadeia antissentido e em que as cadeias antissentido e com sentido são complementares (*i.e.* cada uma das cadeias compreende a sequência nucleotídica que é complementar da sequência nucleotídica na outra cadeia; como seja quando a cadeia antissentido e com sentido formam uma estrutura de cadeia dupla, por exemplo em que a região de cadeia dupla tem cerca de 19 pares de bases). A cadeia antissentido compreende uma sequência nucleotídica que é complementar da sequência nucleotídica numa molécula de ácido nucleico alvo ou numa porção da mesma e a cadeia com sentido compreende uma sequência nucleotídica correspondendo à sequência de ácido nucleico alvo ou a uma porção da mesma. Como alternativa, o siRNA pode ser montado a partir de um único oligonucleótido, em que as regiões com sentido e antissentido complementares do siRNA estão ligadas por meio de um ácido nucleico baseado em ligantes não baseados em ácido nucleico. O siRNA pode

ser um polinucleótido com uma estrutura de dupla cadeia, dupla cadeia assimétrica, estrutura em gancho de cabelo ou estrutura secundária em gancho de cabelo assimétrica, tendo regiões com sentido e antissentido complementares, em que a região antissentido compreende a sequência nucleotídica que é complementar da sequência nucleotídica numa molécula de ácido nucleico alvo separada ou numa porção da mesma e a região com sentido possui sequência nucleotídica correspondendo à sequência de ácido nucleico alvo ou a uma porção da mesma. O siRNA pode ser um polinucleótido de cadeia simples circular, tendo duas ou mais estruturas em ansa e uma haste compreendendo regiões complementares com sentido e antissentido, em que a região antissentido compreende uma sequência de ácido nucleico que é complementar de uma sequência nucleotídica numa molécula de ácido nucleico alvo ou porção da mesma e a região com sentido possui uma sequência nucleotídica correspondendo à sequência de ácido nucleico alvo ou uma porção da mesma). O polinucleótido de cadeia simples pode ainda compreender um grupo fosfato terminal, como seja um 5'-fosfato (ver, e.g., Martinez *et al*, 2002, *Cell*, 110, 563-574 e Schwarz *et al*, 2002, *Molecular Cell*, 10, 537-568), ou um 5'-3'-difosfato.

Em determinadas realizações, a molécula de siRNA do invento pode incluir sequências ou regiões com sentido e antissentido separadas, em que as regiões com sentido e antissentido são ligadas covalentemente através de moléculas de ligação nucleotídicas ou não nucleotídicas como é conhecido na arte. Como alternativa, as regiões com

sentido e antissentido podem ser ligadas de forma não covalente através de interações iônicas, ligações de hidrogénio, interações de van der Waals, interações hidrofóbicas, e/ou interações de empilhamento. Em determinadas realizações, as moléculas de siRNA compreendem uma sequência nucleotídica que é complementar da sequência nucleotídica de um gene alvo. A molécula de siRNA pode interagir com a sequência nucleotídica de um gene alvo de forma a causar inibição da expressão do gene alvo. As moléculas de siRNA não necessitam de estar limitadas às moléculas contendo apenas RNA, podendo ainda incluir nucleótidos quimicamente modificados e não nucleótidos. Em determinadas realizações, as pequenas moléculas de ácido nucleico de interferência não possuem nucleótidos contendo 2'-hidroxi (2'-OH). Realizações particulares incluem pequenos ácidos nucleicos de interferência que não requerem a presença de nucleótidos tendo um grupo hidroxilo 2' para mediar RNAi e, como tal, as pequenas moléculas de ácido nucleico de interferência facultativamente não incluem quaisquer ribonucleótidos (*i.e.*, nucleótidos tendo um grupo 2'-OH). Tais moléculas de siRNA que não requerem a presença de ribonucleótidos dentro da molécula de siRNA para suportar RNAi podem, no entanto, ter um ou mais ligantes ligados ou outros grupos, fracções ou cadeias ligados ou associados contendo um ou mais nucleótidos com grupos 2'-OH. Facultativamente, as moléculas de siRNA podem compreender ribonucleótidos com cerca de 5, 10, 20, 30, 40, ou 50% das posições nucleotídicas.

As pequenas moléculas de ácido nucleico de interferência modificadas podem ser igualmente referidas como pequenos oligonucleótidos de interferência modificados "siMON". Como aqui usado, o termo siNA é equivalente a outros termos usados para descrever moléculas de ácido nucleico que são capazes de mediar RNAi específica de sequência, como seja, por exemplo, pequeno RNA de interferência (siRNA), RNA de cadeia duplas (dsRNA), micro-RNA (miRNA), pequeno RNA em gancho de cabelo (shRNA), pequeno oligonucleótido de interferência, pequeno ácido nucleico de interferência, pequeno oligonucleótido de interferência modificado, siRNA quimicamente modificado, RNA de silenciamento de genes pós-transcrição (ptgsRNA). Ainda, como aqui usado, o termo RNAi é equivalente a outros termos usados para descrever RNA de interferência específico de sequência, como seja silenciamento de genes pós-transcrição ou epigenético. Por exemplo, as moléculas de siRNA podem ser usadas para silenciamento epigenético de genes ao nível de pós-transcrição e de pré-transcrição. Como exemplo não limitantes, a regulação epigenética da expressão de genes por moléculas de siRNA pode resultar da modificação mediada por RNA da estrutura da cromatina para alterar a expressão de genes (ver, por exemplo, Allshire, 2002, *Science*, 297, 1818-1819; Volpe *et al.*, 2002, *Science*, 297, 1833- 1837; Jenuwein, 2002, *Science*, 297, 2215-2218; and Hall *et al.*, 2002, *Science*, 297, 2232- 2237).

O termo "gancho de cabelo assimétrico" significa uma molécula de siRNA linear compreendendo uma região

antissentido, uma porção de ansa que pode compreender ou não nucleótidos e uma região com sentido que compreende menos nucleótidos que a região antissentido (até ao ponto em que a região com sentido possua suficientes nucleótidos complementares para emparelharem com a região antissentido e formar uma cadeia dupla com ansa). Por exemplo, uma molécula de siNA em gancho de cabelo assimétrico pode compreender uma região antissentido tendo um comprimento suficiente para mediar RNAi numa célula ou sistema *in vitro* (e.g. cerca de 19 a cerca de 22 nucleótidos) e uma região de ansa compreendendo cerca de 4 a cerca de 8 nucleótidos e uma região com sentido tendo cerca de 3 a cerca de 18 nucleótidos que são complementares da região antissentido. A molécula de siNA em gancho de cabelo assimétrico pode também compreender um grupo fosfato terminal 5' que pode ser quimicamente modificado. A porção da ansa da molécula de siNA em gancho de cabelo assimétrico pode compreender nucleótidos, não nucleótidos, moléculas de ligantes ou moléculas de conjugado como aqui descrito.

O termo "modular" significa que a expressão do gene ou nível da molécula de RNA ou moléculas de RNA equivalentes codificadoras de uma ou mais proteínas ou subunidades proteicas, é regulada positivamente ou regulada negativamente, de forma que a expressão, nível ou actividade é superior ou inferior ao observado na ausência do modulador. Por exemplo, o termo "modular" pode significar "inibir" mas não está limitado a esta definição.

O termo "inibir", "regular negativamente" ou "reduzir" significa que a expressão do gene ou nível de moléculas de RNA ou moléculas de RNA equivalentes codificadores de uma ou mais proteínas ou subunidades proteicas ou actividade de uma ou mais proteínas ou subunidades proteicas, é reduzido abaixo do observado na ausência das moléculas mNS. Numa realização particular, inibição, regulação negativa ou redução com uma molécula de mNS resulta num nível que está abaixo do nível observado na presença de uma molécula inactiva ou atenuada. Igualmente, a inibição, regulação negativa ou redução com moléculas mNS resulta num nível que está abaixo do nível observado na presença, por exemplo, de uma molécula mNS com sequência mista ou com desemparelhamentos. Num outro exemplo, a inibição, regulação negativa ou redução da expressão do gene com uma molécula de ácido nucleico é superior na presença da molécula de ácido nucleico relativamente à sua ausência.

Por "gene" ou "gene alvo" pretende-se significar um ácido nucleico que codifica um RNA, por exemplo, sequências de ácido nucleico incluindo, mas não lhes estando limitado, genes estruturais codificadores de um polipéptido. O gene alvo pode ser um gene derivado de uma célula, um gene endógeno, um transgene ou genes exógenos, tais como genes de um agente patogénico (e.g. um vírus) que está presente na célula após infecção. A célula contendo o gene alvo pode ser derivada ou contidas em qualquer organismo, como seja uma planta, animal, protozoário, vírus,

bactéria ou fungo. Exemplos não limitantes de plantas incluem monocotiledóneas, dicotiledóneas ou gimnospérmicas e mais especificamente *Arabidopsis*, girassol, algodão, colza, milho, palma, tabaco, amendoim ou soja. Exemplos não limitantes de fungos incluem fungos filamentosos ou leveduras.

"Região de sequência altamente conservada" significa uma sequência nucleotídica de uma ou mais regiões num gene alvo que não varia significativamente de uma geração para outra ou de um sistema biológico para outro.

"Região com sentido" significa uma sequência nucleotídica de uma molécula de siNA tendo complementaridade com uma região antissentido da molécula de siNA. A região com sentido de uma molécula de siNA pode compreender uma sequência de ácido nucleico tendo homologia (*i.e.* identidade de sequência ou identidade parcial) com uma sequência de ácido nucleico alvo.

"Região antissentido" significa uma sequência nucleotídica de uma molécula de siNA tendo complementaridade com uma sequência de ácido nucleico alvo. Ainda, a região antissentido de uma molécula siNA pode facultativamente compreender uma sequência de ácido nucleico tendo complementaridade com uma região com sentido da molécula de siNA.

"Ácido nucleico alvo" significa qualquer sequên-

cia de ácido nucleico cuja expressão ou actividade se pretende modular. O ácido nucleico alvo pode ser DNA ou RNA, como seja DNA ou RNA endógeno, DNA viral ou RNA viral ou outro RNA codificado por um gene de um vírus, bactéria, fungo, animal ou planta.

Como referido neste pedido, "tratar" ou "tratamento" não requer uma alteração completa de um fenótipo. Significa que os sintomas da condição subjacente são pelo menos reduzidos e/ou que uma ou mais das causas ou mecanismos celulares, fisiológicas ou bioquímicas que causam os sintomas são reduzidas e/ou eliminadas. Deve-se entender que reduzido, como usado neste contexto, significa relativo ao estado da condição, incluindo o estado molecular da condição, não apenas o estado fisiológico da condição.

Por "condição" pretende-se significar qualquer estado num indivíduo ou organismo que se possa pretender alterar. Tal estado deverá ser atribuído à expressão ou ausência de expressão de um gene, sequência nucleotídica e/ou proteína. Exemplos de condições incluem, mas não lhes estão limitados, doenças, anormalidades genéticas, infecções, cancro, mutações e condições cosméticas incluindo, mas não lhes estando limitados, alopecia, obesidade e enrugamento da pele. Um outro exemplo não limitante de uma condição é o estado normal num indivíduo. Por exemplo, a produção normal de ácidos gordos numa planta (e.g. *Arabidopsis*, girassol, algodão, colza, milho, trigo, castor, palma, tabaco, amendoim ou soja) é uma condição que

poderá ser alterada usando as composições da divulgação e métodos do presente invento. Como tal, o termo condição inclui qualquer estado que deverá ser alterado por razões científicas, agrícolas, médicas e/ou pessoais.

Por "complementaridade" pretende-se significar que um ácido nucleico pode formar ligações de hidrogénio com uma outra sequência de ácido nucleico através do tradicional emparelhamento de bases de Watson-Crick Hoogstein e/ou emparelhamento de bases reverso de Hoogstein ou outros tipos não tradicionais, como referência às moléculas de ácido nucleico, a energia livre da ligação para uma molécula de ácido nucleico com a sua sequência complementar é suficiente para permitir que a função relevante do ácido nucleico seja permitida (e.g. actividade de RNAi). A determinação das energias livres de ligação para as moléculas de ácido nucleico é conhecida dos familiarizados com a arte (ver, e.g., Turner *et al.*, 1987, CSH Symp. Quant. Biol. LII pp. 123-133; Frier *et al.*, 1986, Proc. Nat. Acad. Sci USA 83:9373-9377; Turner *et al.*, 1987, J. Am. Chem. Soc. 109:3783-3785).

Uma percentagem de complementaridade indica a percentagem de resíduos contíguos numa molécula de ácido nucleico que pode formar ligações de hidrogénio (e.g., emparelhamento de bases de Watson-Crick) com uma segunda sequência de ácido nucleico (e.g., 5, 6, 7, 8, 9, 10 de 10 sendo 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, e 100% de complementaridade). "Complementaridade perfeita" significa que todos os

resíduos contíguos de uma sequência de ácido nucleico formarão ligações de hidrogénio com o mesmo número de resíduos contíguos numa segunda sequência de ácido nucleico.

As moléculas de siNA representam uma nova abordagem terapêutica a um espectro largo de doenças e condições, incluindo cancro ou doença cancerosa, doença infecciosa, doença cardiovascular, doença neurológica, doenças dos priões, doença inflamatória, doença renal, doença hepática, doença mitocondrial, doença endócrina, doenças e condições relacionadas com a reprodução, síntese de produtos animais ou vegetais e quaisquer outras indicações que possam responder ao nível de um produto de gene expresso numa célula ou organismo.

Como aqui usado, "célula" é usado no seu sentido biológico habitual e não se refere a um organismo multicelular completo. A célula pode estar presente num organismo (e.g. plantas e animais, incluindo mamíferos). A célula pode ser procariótica (e.g. célula bacteriana) ou eucariótica (e.g. célula de mamífero ou vegetal). A célula pode ser somática ou de origem germinativa, totipotente ou pluripotente, capaz de se dividir ou não. A célula pode igualmente derivar ou compreender um gâmeta ou embrião, uma célula estaminal ou uma célula totalmente diferenciada, como seja, por exemplo, de um animal, bactéria, planta ou semente.

As moléculas mNS podem ser adicionadas directa-

mente ou podem ser complexadas com lípidos catiónicos, encapsuladas em lipossomas ou de outra forma entregue a células ou tecidos alvo. O ácido nucleico ou complexos de ácido nucleico podem ser administrados localmente a tecidos relevantes *ex vivo* ou *in vivo* através, por exemplo, de injeção, entrega com revólver de genes, bomba de infusão ou neoprótese, com ou sem a sua incorporação em biopolímeros.

Num outro aspecto, a divulgação proporciona células contendo uma ou mais moléculas mNS. As moléculas mNS podem, independentemente, ser dirigidas contra o mesmo local ou locais diferentes.

"RNA" significa uma molécula compreendendo pelo menos um resíduo de ribonucleótido. Por "ribonucleótido" pretende-se significar um nucleótido com um grupo hidroxilo na posição 2' de um grupo β -D-ribo-furanose. Os termos incluem RNA de cadeia dupla, RNA de cadeia simples, RNA isolado como seja RNA parcialmente purificado, essencialmente RNA puro, RNA sintético, RNA produzido por via recombinante, assim como RNA alterado que difere do RNA natural pela adição, deleção, substituição e/ou alteração de um ou mais nucleótidos. Tais alterações podem incluir a adição de material não nucleótido, como seja ao extremo do siNA ou internamente (e.g., num ou mais nucleótidos do RNA). Os nucleótidos das moléculas de RNA podem igualmente compreender nucleótidos não convencionais, tais como nucleótidos não naturais ou nucleótidos ou desoxinucleótidos

obtidos por síntese química. Estes RNAs alterados podem ser referidos como análogos ou como análogos de RNA natural.

Por "sujeito" pretende-se significar um organismo, o qual é um dador ou recipiente de células explantadas ou as próprias células. "Indivíduo" também se refere a um organismo ao qual as moléculas de ácido nucleico podem ser administradas. Um indivíduo pode ser uma planta, células vegetais, um mamífero ou células de mamífero, incluindo células humanas.

O invento pode ser usado num método de produção de uma planta com níveis modificados de ácidos gordos endógenos. O método inclui modulação dos níveis de um gene heterólogo, como seja um gene da síntese de ácidos gordos ou do metabolismo de lípidos. A produção de ácidos gordos em plantas e sementes pode ser modificada. Plantas representativas que podem ser modificadas através do presente invento incluem, por exemplo, *Arabidopsis*, girassol, algodão, colza (incluindo canola), milho, trigo, castor, palma, tabaco, amendoim, sorgo, cana sacarina e soja.

mNS, individualmente, em combinação com outros compostos ou conjuntamente com outros compostos (tais como fármacos), podem ser usados para tratar doenças ou condições aqui discutidas (e.g., cancro e outras condições proliferativas, infecção viral, doença inflamatória, auto-imunidade, doença pulmonar, doença renal, doença ocular, etc.) Por exemplo, para tratar uma doença ou condição

particular, as moléculas mNS podem ser administradas a um indivíduo ou podem ser administradas a outras células adequadas evidentes para os familiarizados com a arte, individualmente ou em combinação com um ou mais fármacos em condições adequadas para o tratamento.

Numa outra realização exemplificativa, as moléculas mNS podem ser usadas em combinação com outros tratamentos conhecidos para tratar condições ou doenças atrás discutidas. Por exemplo, as moléculas descritas poderão ser usadas em combinação com um ou mais agentes terapêuticos conhecidos para tratar uma doença ou condição. Exemplos não limitantes de outros agentes terapêuticos que podem se facilmente combinados com uma molécula mNS são moléculas de ácido nucleico enzimáticas, moléculas de ácido nucleico alostéricas, moléculas de ácido nucleico antissentido, iscas ou aptâmeros, anticorpos (tais como anticorpos monoclonais), pequenas moléculas e outros compostos orgânicos e/ou inorgânicos incluindo metais, sais e iões.

Técnicas de modulação computacional para usar na previsão/avaliação de derivados incluem, mas não lhes estão limitadas: MFold version 3.1 disponível em Genetics Corporation Group, Madison, WI (ver Zucker *et al*, Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. In RNA Biochemistry and Biotechnology, 11-43, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, (1999); Zucker *et al*, Expanded Sequence Dependence of

Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure. J. Mol. Biol. 288, 911 -940 (1999); Zucker *et al.*, RNA Secondary Structure Prediction. In Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry S. Beaucage, D.E. Bergstrom, G.D. Glick, and R.A. Jones eds., John Wiley & Sons, New York, 11.2.1-11.2.10, (2000)), COVE (análise da estrutura do RNA usando modelos de covariância (métodos de gramática sem contexto estocástico)) v.2.4.2 (Eddy & Durbin, Nucl. Acids Res. 1994, 22: 2079-2088) que tem distribuição livre como código fonte e que pode ser descarregado acedendo a <http://www.genetics.wustl.edu/eddy/software/>, e FOLDALIGN, também de distribuição livre e disponível para descarregar em <http://www.bioinf.au.dk/FOLDALIGN/> (ver "Finding the most significant common sequence and structure motifs in a set of RNA sequences". J. Gorodkin, L. J. Heyer and G. D. Stormo. Nucleic Acids Research, Vol. 25, no. 18 pp 3724-3732, 1997; "Finding Common Sequence and Structure Motifs in a set of RNA Sequences". J. Gorodkin, L. J. Heyer, and G. D. Stormo. ISMB 5;120-123, 1997).

O presente invento é ainda descrito nos exemplos que se seguem, os quais são oferecidos a título ilustrativo e não se destinam de forma alguma a limitar o invento.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Construção de plasmídeos

pPHAS-Fab1-HP: RNAi em gancho de cabelo foi

empregue para reduzir os níveis de KASII (também conhecido e frequentemente referido aqui como "Fab1"). Os fragmentos com sentido, antissentido e de intrão foram montados no plasmídeo vector pGEM-T-Easy (Promega) antes da clonagem no vector binário pDsRed-PHAS como um fragmento PacI-NhoI. Um fragmento de 178 pb da 5'UTR do exão 1 de Atlg74960 (*FAB1*), que não é homólogo de quaisquer outras sequências de *Arabidopsis* codificadoras das enzimas KASI ou KASIII, foi amplificado a partir de DNA genómico de *Arabidopsis* usando os oligonucleótidos

TTAATTAACGCATCGAAGCTCTCTGCACGC (SEQ ID NO: 1) e
GCTAGCGGCTTTGAGAAGAACCCAG (SEQ ID NO:2) e subsequentemente clonado em pGEM-T-Easy (promega), de forma que o local NheI do inserto ficou adjacente ao local PstI de pGEM-T-Easy para criar pGEM-T-Easy-HTM1.

O primeiro intrão de *FAD2* foi então amplificado usando os oligonucleótidos

GCTAGCGTCAGCTCCATCTCCAGGTCC (SEQ ID NO:3) e
GCTAGCGTTTCTGCAGAAAACCAAAAGC (SEQ ID NO:4), de forma que este fragmento continha 17 pb do exão 1 e 4 pb do exão 2 para assegurar a inclusão do local de *splicing* 5' e 3'. Este fragmento foi então clonado no local PstI/NheI de pGEM-T-Easy-HTM1 para criar pGEM-T-Easy-HTM2. Para completar a repetição invertida para o gancho de cabelo Fab1, o fragmento original da 5'UTR de 178 pb foi amplificado usando as sequências iniciadoras

CTGCAGAAACCCGGGCATCGAAGCTCTCTGCACGC (SEQ ID NO:5) e
GAGCTCCTCGAGGGCTTTGAGAAGAACCCAG (SEQ ID NO:6), e clonado no

local SacI/Pst I de pGEM-T-Easy-STM2 para dar pGEM-T-Easy-STM3. A sequência em gancho de cabelo *Fab1* resultante foi excisada do pGEM-T-Easy-STM3 e inserida em pDs-red-PHAS como um fragmento PacI/XhoI para produzir pPHAS-FAB1-HP (FIG. 1).

pPHAS-Fab1-HPAS: Os 107 bp do primeiro exão do gene *Fab1* foram amplificados a partir de DNA genômico usando as sequências iniciadoras KasII-5'exão-BglII (GGGAGATCTGGCGCGCCGGCTATCTCCTCCACCGTGA (SEQ ID NO:7) e KasII-3'exão-SpeI (GGGACTAGTTCTTCCTTTTATGCCATGG (SEQ ID NO:8)). O fragmento foi substituído com uma parte do intrão *Fad2* em SpeI-BglH em pGEM-T-Easy-STM3, depois uma cassete contendo o gancho de cabelo FAB1, intrões e antissentido *Fab1* foi substituída com o gancho de cabelo-intrão de pPHAS-Fab1-HP na sua totalidade, como representado na FIG. 1.

pPHAS-Fab1-AS: Os 178 pb da 5'UTR do gene *FAB1* acima foram amplificados usando as sequências iniciadoras KasII-5UTR-NheI/XhoI (GGCTCGAGCTAGCCGCATCGAAGCTCTCTGCACGC (SEQ ID NO:9)) e KasII- 3UTR-PacI (GGTTAATTAAGGCTTTGAGAAGAACCCAG (SEQ ID NO:10)). Um fragmento foi substituído com gancho de cabelo-intrão de *Fab1* na sua totalidade em pPHAS-FabI-HP em PacI-XhoI, como representado na FIG. 1.

pPHAS-Fad2-HP: As sequências de 118 pb com sentido e antissentido da 5'UTR de *Fad2* não codificantes

foram amplificadas a partir do DNA genómico e substituídas com sentido e antissentido da 5'UTR de KasII em pPHAS-Fab-1HP, como representado na FIG. 2.

pPHAS-Fad2-HPAS: 1152 pb do gene Fad2 foram amplificados com as sequências iniciadoras FAD2-5'SphI (CGCATGCATGGGTGCAGGTGGAAGAAT (SEQ ID NO: 11)) e FAD2-3'SpeI (CCACTAGTTCATAACTTATTGTTGTACCA (SEQ ID NO: 12)), o fragmento foi substituído com a parte do intrão Fad2 em SpeI-SphI na direcção antissentido, como representado na FIG.2.

pPHAS-Fad2-AS: O gene Fad2 foi amplificado com as sequências iniciadoras FAD2-5'XhoI (CCCTCGAGATGGGTGCAGGTGGAAGAAT (SEQ ID NO: 13)) e FAD2-3'PacI (CCTTAATTAATCATAACTTATTGTTGTACCA (SEQ ID NO: 14)), depois substituído com a cassette Fad2-HP em pPHAS-Fad2-HP nos locais PacI-XhoI na direcção antissentido como representado na FIG. 3.

pPHAS-Fad3-HP: 138bp de 3'UTR, sentido e antissentido, do gene Fad3 foram amplificados a partir de DNA genómico. Os fragmentos foram substituídos a 5'UTR, com sentido e antissentido, de Fab1 em pPHAS-Fab1-HP, como representado na FIG. 3.

pPHAS-Fad3-HPAS: 301 pb do primeiro exão do gene Fad3 foram amplificados com as sequências iniciadoras Fad3-anti-5'BglII (GGAGATCTGGCGCGCCCGTGGCCGAGAACAAAGATG (SEQ ID NO: 15)) e Fad3-anti-3'SpeI (GGGACT AGTGTGTTGCTATGGACCAACGC (SEQ ID NO: 16)), depois substituídos com uma parte de

intrão Fad2 nos locais BglIII-SpeI na direcção antissentido, como representado na FIG. 3.

pPHAS-Fad3-AS: Os 301bp do primeiro exão do gene Fad3 foram amplificados a partir de DNA genómico usando as sequências iniciadoras Fad3-anti-5'PacI (GGGTTAATTAACGT-GGCCGAGAACAAAGATG (SEQ ID NO: 17)) e Fad3-anti-3'XhoI (CCCTCGAGAGTTGTTGCTATGGACCAACGC (SEQ ID NO: 18)). O fragmento foi substituído com a cassette Fad3-HP nos locais PacI-XhoI, como representado na FIG. 3.

Exemplo 2: Cultura e transformação de *Arabidopsis*

Arabidopsis foi cultivada sob ~250uE de luz com um fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro) a 20°C. Os vectores foram introduzidos através de *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101 pMP90 por electroporação e usados para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* através do método de aplicação floral (Bechtold, N., Ellis, J., e Pelletier, G. (1993) C. R. Acad. Sci. Paris 316, 1194-1198). A transformação foi realizada ~5 dias após o início da floração.

Exemplo 3: Determinação do teor de ácidos gordos nas sementes de *Arabidopsis*

Análise de ácidos gordos: As sementes foram metiladas (1 ml de HCl 1 N, metanol (Supelco), 80°C durante 1 h), extraídas com hexano e trimetilsiladas (100 µl de

BSTFA-TMCS (bis(trimetilsilil)trifluoroacetamidetrimetilsilano) (Supelco), 90°C durante 45 min). O BSTFA-TMCS foi removido por evaporação e a amostra foi ressuspensa em hexano. As amostras foram analisadas num cromatógrafo de gás Hewlett-Packard 6890 equipado com um detector selectivo de massa 5973 (GC/MS) e uma coluna de capilar SP-2340 ciano (Supelco) (60 m x 250 µm x 0,25 µm). O injector foi mantido a 225°C, a temperatura da estufa variou (100-240°C a 15°C/min seguido de 240°C durante 5 min) e o fluxo de hélio foi de 1,1 ml/min. A atribuição de identidades de picos foi realizada com base no tempo de eluição em função de padrões autênticos e validados com base nos seus espectros de massa. A quantificação foi realizada usando o programa da estação química Hewlett-Packard.

Exemplo 4: Modulação da síntese de ácidos gordos em *Arabidopsis*

Compararam-se três métodos de supressão de genes (antissentido, RNAi em gancho de cabelo e RNAi em gancho de cabelo com antissentido) do gene no intrão. Não querendo estar limitado pela teoria, mRNAs contendo RNAi em gancho de cabelo e sequências antissentido podem ser mais potentes no silenciamento de genes num modelo como o descrito na FIG. 4. No modelo da FIG. 4, quando do *splicing* do intrão para criar o siRNA, um fragmento de DNA contendo uma porção antissentido do gene poderá ser criada, proporcionando assim um potencial método adicional de redução da expressão de genes para além do substrato da dicer de RNAi que é gerado.

Foram escolhidos três genes para a comparação dos três métodos da supressão de genes (a 12-desaturase FAB2 e 15-desaturase FAD3 devido a serem facilmente quantificáveis; e o FAD2 devido a ter sido usado anteriormente para avaliação da redução na expressão de genes) assim como β -cetoacil-ACP sintetase (KAS)II. A relação entre estas enzimas e a síntese de ácidos gordos em *Arabidopsis* está descrita na FIG. 5.

Para além de ser o tecido alvo para modificação do teor de ácidos gordos de todas as culturas de sementes oleaginosas, as sementes proporcionam uma fonte fiável de material para análise reprodutível dos resultados de transformações realizadas usando as construções criadas no Exemplo 1. Assim o teor em ácidos gordos das sementes das plantas transformadas foi analisado por cromatografia gasosa e análise espectrofotométrica para confirmar qualitativamente a identificação dos picos como ácidos gordos específicos. O teste T de Student foi usado para atribuir significância a diferenças entre médias (baseado em 10 ou mais amostras por média). Os resultados para as construções criadas no Exemplo 1 estão representados nos Exemplos 5-8 abaixo.

Exemplo 5: Modulação da expressão de FAB1

FAB1 alonga ácidos gordos de 16 átomos de C (C16) a 18 átomos de C (C18) nos plastos. Para FAB1, os níveis de

ácidos gordos 16:0 mais 16:1 (os substratos para FAB1) foram comparados com os níveis do seu produto 18:0 e 18:1 mais metabolitos 18:2 e 18:3. *Arabidopsis* selvagem foi comparada com a linha mutante *fab 1 fae 1* e com a linha mutante *fab 1 fae 1* transformada com o gancho de cabelo FAB1 (Fab1-HP) ou com o FAB1 incluindo a combinação de gancho de cabelo e antissentido (*fab1-BPAS*). Os resultados estão apresentados na FIG. 6 e graficamente resumidos na FIG. 7. A linha *fab 1 fae 1* mostrou um aumento significativo nos ácidos gordos C18 devido à mutação *fab 1* que bloqueia ainda a elongação até ao nível 20C. A introdução do *fabI-HP* no fundo do mutante *fab 1 fae 1* reduziu os ácidos gordos C18 de 74,2% para 53,4%, enquanto a introdução da construção *fab1-HPAS* resultou numa redução para 41,6% de ácidos gordos 18C.

Exemplo 6: Modulação da expressão FAD2

Para FAD2, os níveis de ácidos gordos 18:1 (o substrato de FAD2) foram comparados com os níveis do seu produto 18:2 e o metabolito 18:3. Para análise, 18:2 foi somado com 18:3 para estimar a proporção total de ácidos gordos que tinha sido dessaturada por FAD2. *Arabidopsis* selvagem foi comparada com FAD2-antissentido (Fad2-AS), FAD2 RNAi em gancho de cabelo (Fad2-HP) e FAD2 foi comparado com a combinação gancho de cabelo e antissentido (Fad2-HPAS). Cada um destes foi comparado com o mutante FAD2 mais grave, FAD2-2 (Fad2-MT). Os resultados estão apresentados nas FIGs. 8 e 9 e graficamente resumidas na FIG. 10.

Os níveis selvagens (WT) de 18:2+18:3 foram de 43%, os quais baixaram para 18,9% no Fad2-AS e para 9,4% na linha Fad2-HP. Ambas as alterações eram estatisticamente significativas ao nível de $P < 0,01$. O declínio a partir de 9,4% na linha Fad2-HP para 7,2% na linha Fad2-HPAS foi estatisticamente significativa ao nível de $P < 0,05$. Os 7,2% na linha Fad2-HPAS foi significativamente diferente do de fad2-MT a 7,5%.

Exemplo 7: Modulação da expressão de FAD2 com a introdução da expressão de GUS

Para FAD2, os níveis de ácidos gordos 18:1 (o substrato de FAD2) foram comparados com os níveis do seu produto 18:2 e o metabolito 18:3. Para análise, 18:2 foi somado com 18:3 para se obter a proporção de ácidos gordos totais que foi dessaturada por FAD2. *Arabidopsis* selvagem foi comparada com RNAi em gancho de cabelo FAD2 contendo o gene GUS no intrão (Fad2-HP-GUS). Os resultados estão apresentados nas FIGs. 11 e 12.

Os níveis selvagens (WT) de 18:2+18:3 foram 49%, os quais declinaram para 12,3% em Fad2-HP-GUS. A alteração foi significativa ao nível de $P < 0,01$. Ainda, a coloração azul para GUS foi aparente nas sementes transformadas, indicando a expressão de GUS naquelas sementes.

Exemplo 8: Modulação da expressão de FAD3

Para FAD3, os níveis de ácidos gordos 18:1 mais 18:2 (18:2 sendo o substrato para FAD3) foram comparados com os níveis do seu produto 18:3. *Arabidopsis* selvagem foi comparada com antissentido FAD3 (Fad3-AS), com gancho de cabelo FAD3 (RNAi Fad3-HP) e com FAD3 com a combinação de gancho de cabelo e antissentido (Fad3-HPAS). Os resultados estão apresentados nas FIGs 13 e 14 e graficamente resumidas na FIG. 15.

Os níveis selvagens (WT) de 18:3 foram 17,0%, baixaram para 10,7% em Fad3-AS, 4,5% na linha Fad3-HP e 3,0% na linha Fad3-HPAS. Todos os tratamentos foram significativamente diferente de todos os outros tratamentos ao nível de $P < 0.01$. A linha Fad3-HP a 3,0% não foi significativamente diferente do alelo Fad3 mutante mais forte, Fad3-3, a 2,8%.

Se bem que este invento tenha sido descrito em algumas realizações exemplificativas, o presente invento pode ainda ser modificado dentro do espírito e âmbito desta divulgação. Este pedido é portanto destinado a cobrir quaisquer variações, usos ou adaptações do invento usando os seus princípios gerais. Ainda, este pedido destina-se a cobrir tais desvios da presente divulgação como é habitual na prática da arte em que este invento se insere e que cai dentro dos limites das reivindicações apenas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Dow Chemical
Shanklin, John
Nguyen, Tam

<120> COMPOSIÇÕES COMBINADAS DE GANCHO DE CABELO E ANTISSENTIDO E
MÉTODOS PARA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO

<130> 2971.01-8076

<160> 18

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência iniciadora

<400> 1
ttaaattaacg catcgaagct ctctgcacgc 30

<210> 2
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência iniciadora

<400> 2
gctagcggct ttgagaagaa cccag 25

<210> 3
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência iniciadora

<400> 3
gctagcgtca gctccatctc caggtcc 27

<210> 4
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência iniciadora

<400> 4

gctagcgttt ctgcagaaaa ccaaaagc 28

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência iniciadora

<400> 5

ctgcagaaac ccgggcatcg aagctctctg cacgc 35

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência iniciadora

<400> 6

gagctcctcg agggctttga gaagaacca g 31

<210> 7

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência iniciadora

<400> 7

gggagatctg gcgcgcggc tatctcctcc accgtga 37

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência iniciadora

<400> 8

gggactagtt cttccttttt atgcatgg 29

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência iniciadora

<400> 9
ggctcgagct agccgcatcg aagctctctg cacgc 35

<210> 10
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência iniciadora

<400> 10
ggttaattaa ggctttgaga agaaccag 29

<210> 11
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência iniciadora

<400> 11
cgcgcatg ggtgcaggtg gaagaat 27

<210> 12
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência iniciadora

<400> 12
ccactagtgc ataacttatt gttgtacca 29

<210> 13
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência iniciadora
<400> 13
ccctcgagat ggggtgcaggt ggaagaat 28

<210> 14
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência iniciadora

<400> 14
ccttaattaa tcataactta ttgttgtagc a 31

<210> 15
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência iniciadora

<400> 15
ggagatctgg cgcgcccgtg gccgagaaca aagatg 36

<210> 16
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Sequência iniciadora

<400> 16
gggactagtg ttgttgctat ggaccaacgc 30

<210> 17
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência iniciadora

<400> 17
gggttaatta acgtggccga gaacaagat g 31

<210> 18
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência iniciadora

<400> 18
ccctcgagag ttgttgctat ggaccaacgc 30

Lisboa, 10 de julho de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Um método de regulação da expressão, em que o método compreende:

fornecimento de uma construção nucleotídica a uma célula, em que a referida construção nucleotídica compreende:

uma primeira e uma segunda sequências nucleotídicas que hibridam para formar a haste de uma estrutura haste-ansa e,

uma terceira sequência nucleotídica colocada entre a primeira e a segunda sequências nucleotídicas e locais de *splicing* operacionalmente colocados e orientados de forma a permitir a clivagem da porção da ansa da estrutura haste-ansa da porção haste da estrutura haste-ansa,

em que as primeira e segunda sequências nucleotídicas, quando emparelhadas, geram um pequeno ácido nucleico de interferência que modula a expressão de um alvo,

em que a terceira sequência nucleotídica possui um comprimento suficiente para permitir que as primeiras e segunda sequências nucleotídicas emparelhem estavelmente uma com a outra e em que a terceira sequência nucleotídica compre-

ende uma sequência nucleotídica antissentido capaz de modular a expressão de um alvo através da supressão antissentido, e em que o alvo modulado pela sequência nucleotídica antissentido e o alvo modulado pela pequeno ácido nucleico de interferência podem ser os mesmos ou diferentes; e

cultura da referida célula.

2. O método de acordo com a reivindicação 1, em que o pequeno ácido nucleico de interferência que modula a expressão de um alvo modula a expressão do alvo através de uma via de RNAi.

3. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, em que um gene de interesse operacionalmente ligado a um promotor está situado na ansa.

4. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a ansa possui mais de uma sequência nucleotídica que modula a expressão de um alvo através da supressão antissentido.

5. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a haste possui mais de um par de sequências nucleotídicas que, quando emparelhadas, geram um pequeno ácido nucleico de interferência que modula a expressão de um alvo.

6. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a construção de nucleótidos compreende um PNA.

7. Um método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a construção nucleotídica está presente num vector e está operacionalmente ligada a um promotor.

8. O método de acordo com a reivindicação 7, em que o promotor é seleccionado do grupo consistindo em promotores virais, retrovirais, de mamífero, vegetal, bacteriano, constitutivo, regulável, fúngico, de levedura e de insecto.

9. O método de acordo com a reivindicação 7 ou com a reivindicação 8, em que o vector é seleccionado do grupo consistindo em plasmídeos, cosmídeos, vectores retrovirais, agrobactéria, vectores virais, vectores bacterianos, vectores de leveduras, vectores eucarióticos, vectores vegetais e vectores de mamíferos.

10. O método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a célula é seleccionada do grupo consistindo em células procarióticas, eucarióticas, bacterianas, agrobactéria, levedura, mamífero e humanas.

11. O método de acordo com a reivindicação 10, em que a planta é seleccionada do grupo consistindo em *Ara-bidopsis*, girassol, algodoeiro, colza milho, trigo, castor, palma, tabaco, amendoim, sorgo, cana sacarina e soja.

Lisboa, 10 de julho de 2015

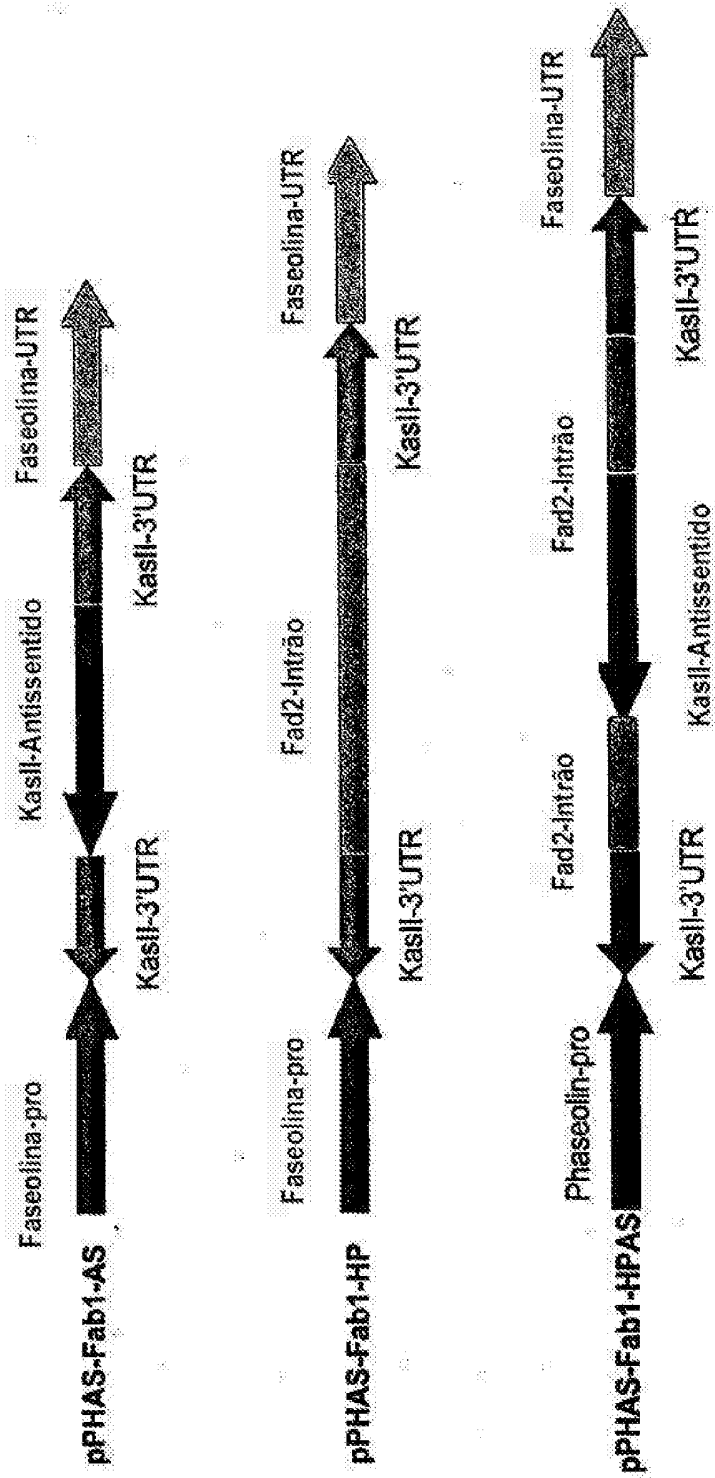


FIG. 1

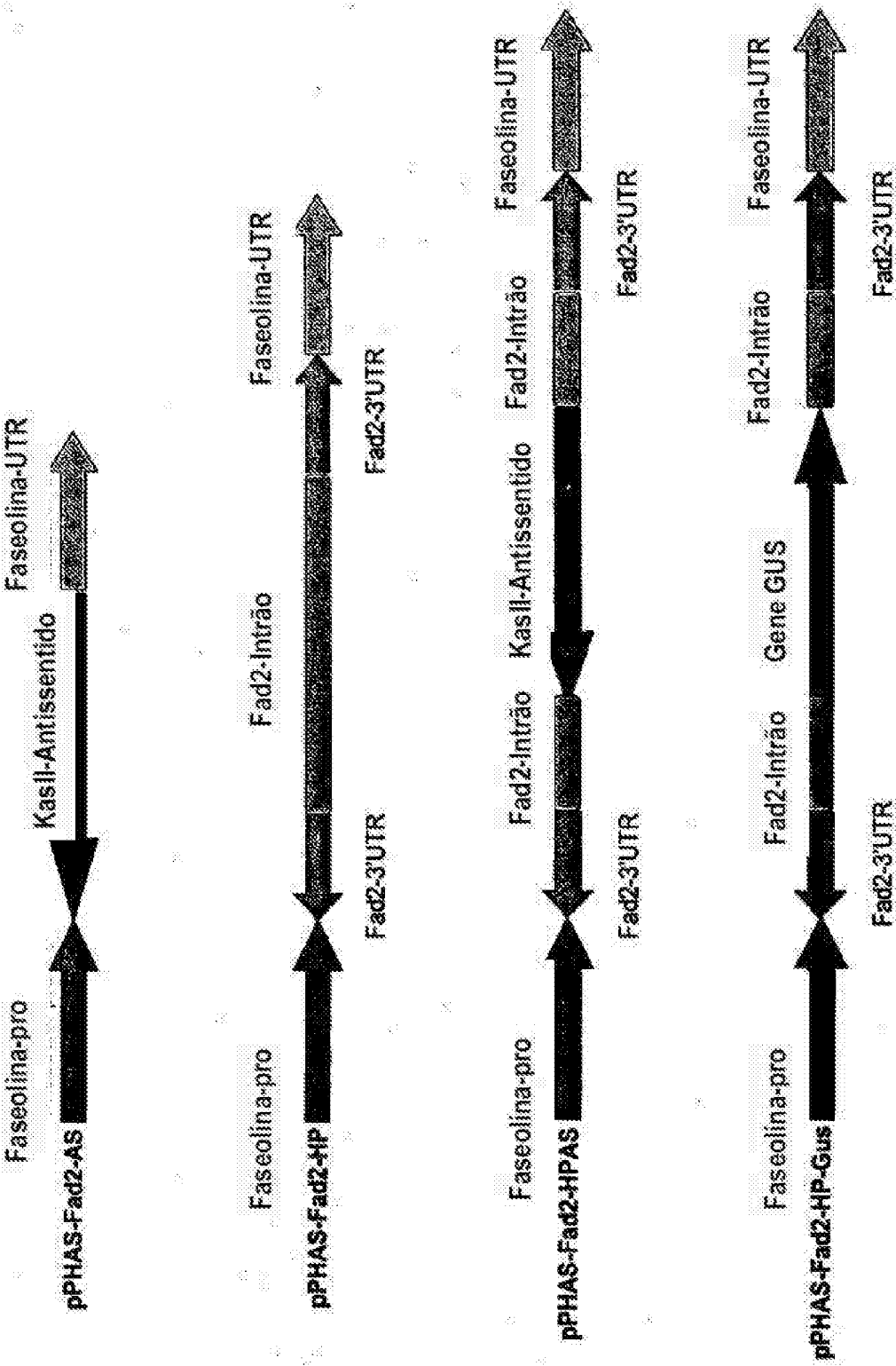


FIG. 2

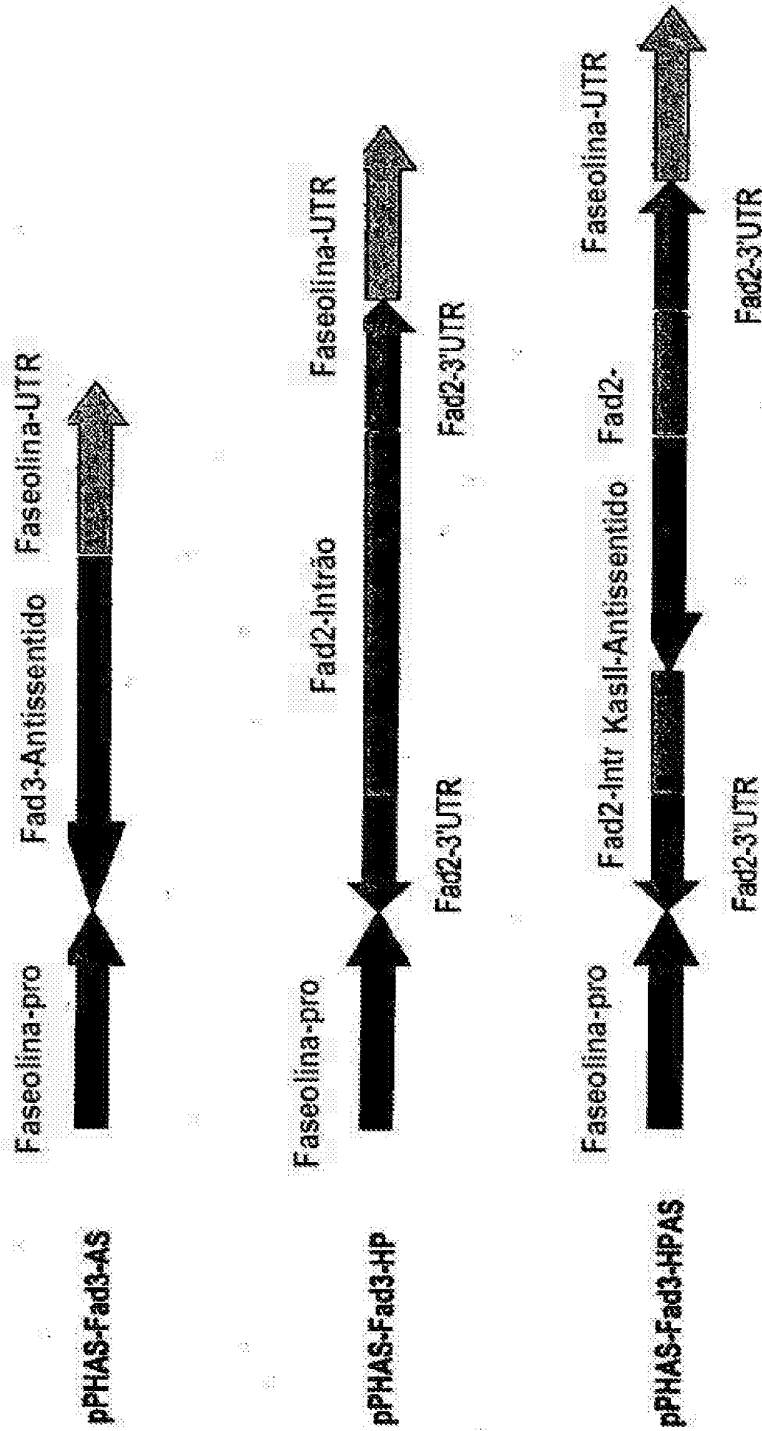


FIG. 3

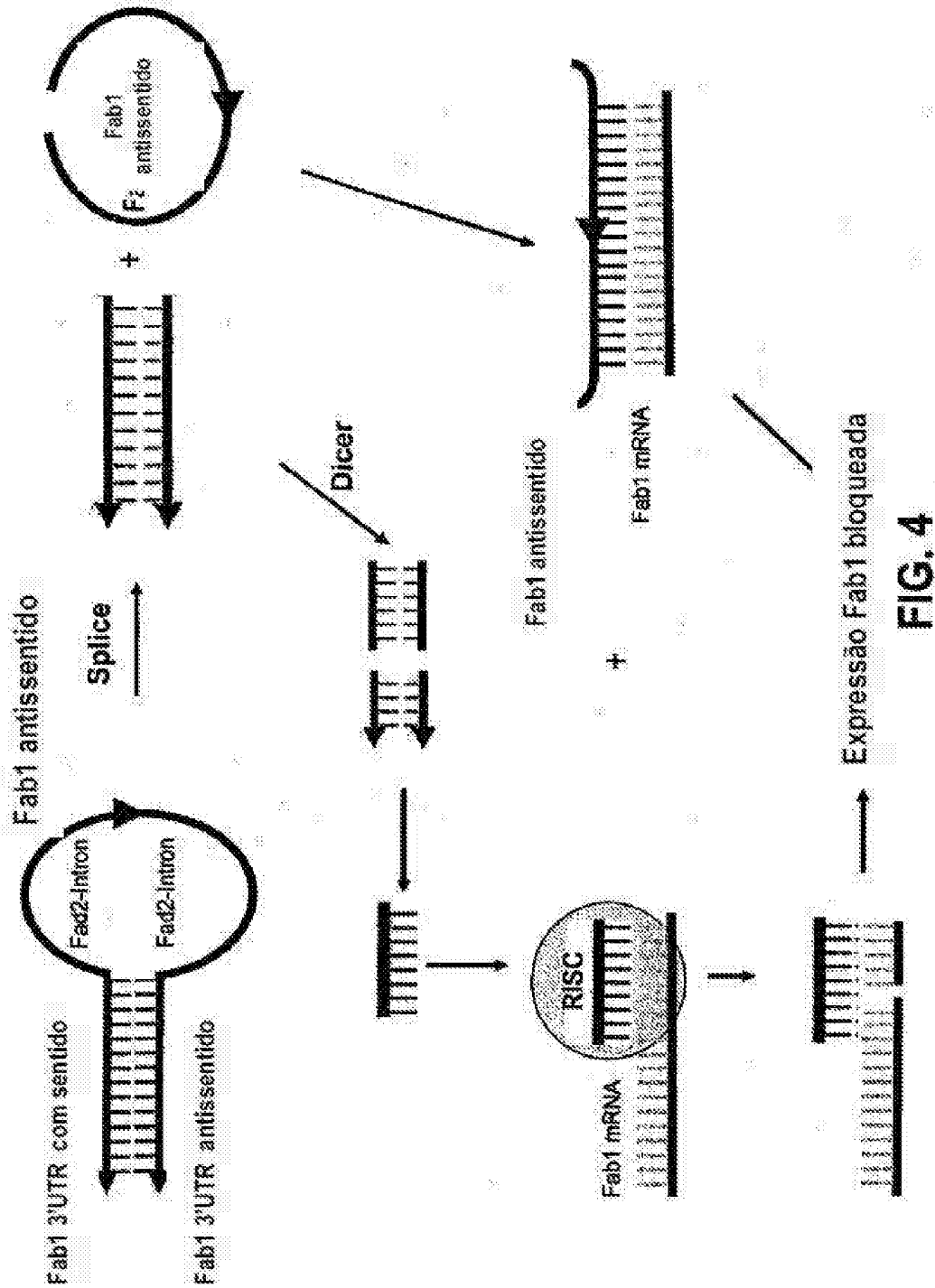


FIG. 4

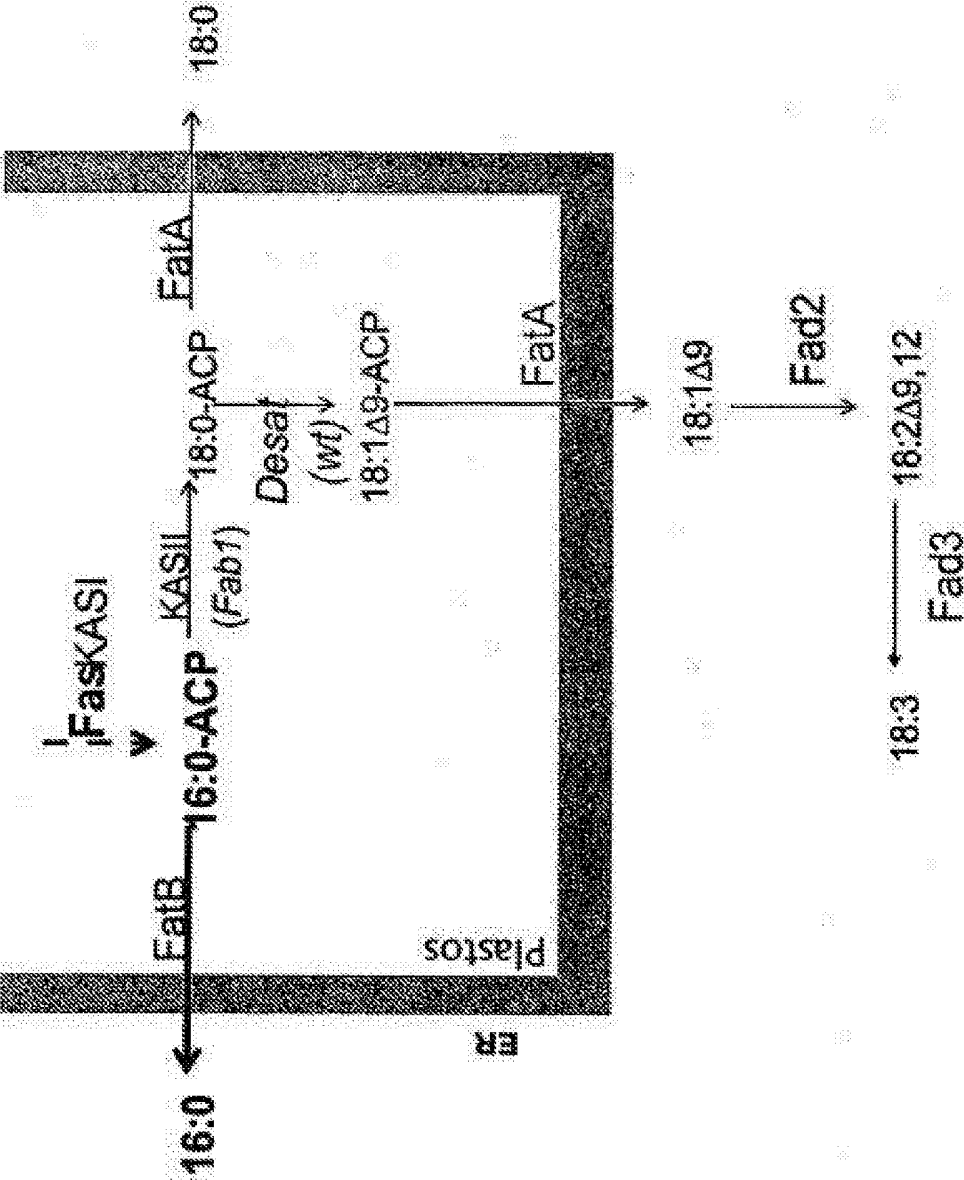


FIG. 5

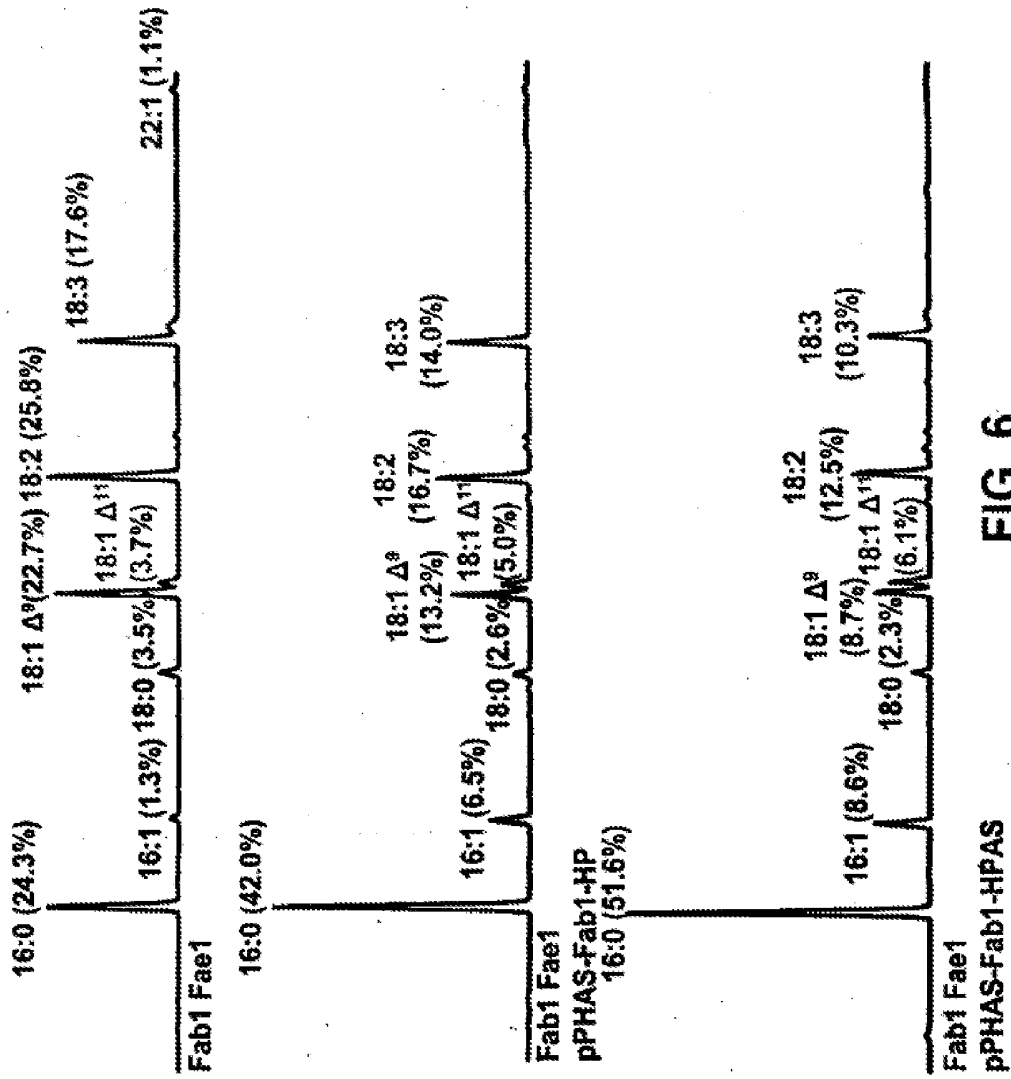


FIG. 6

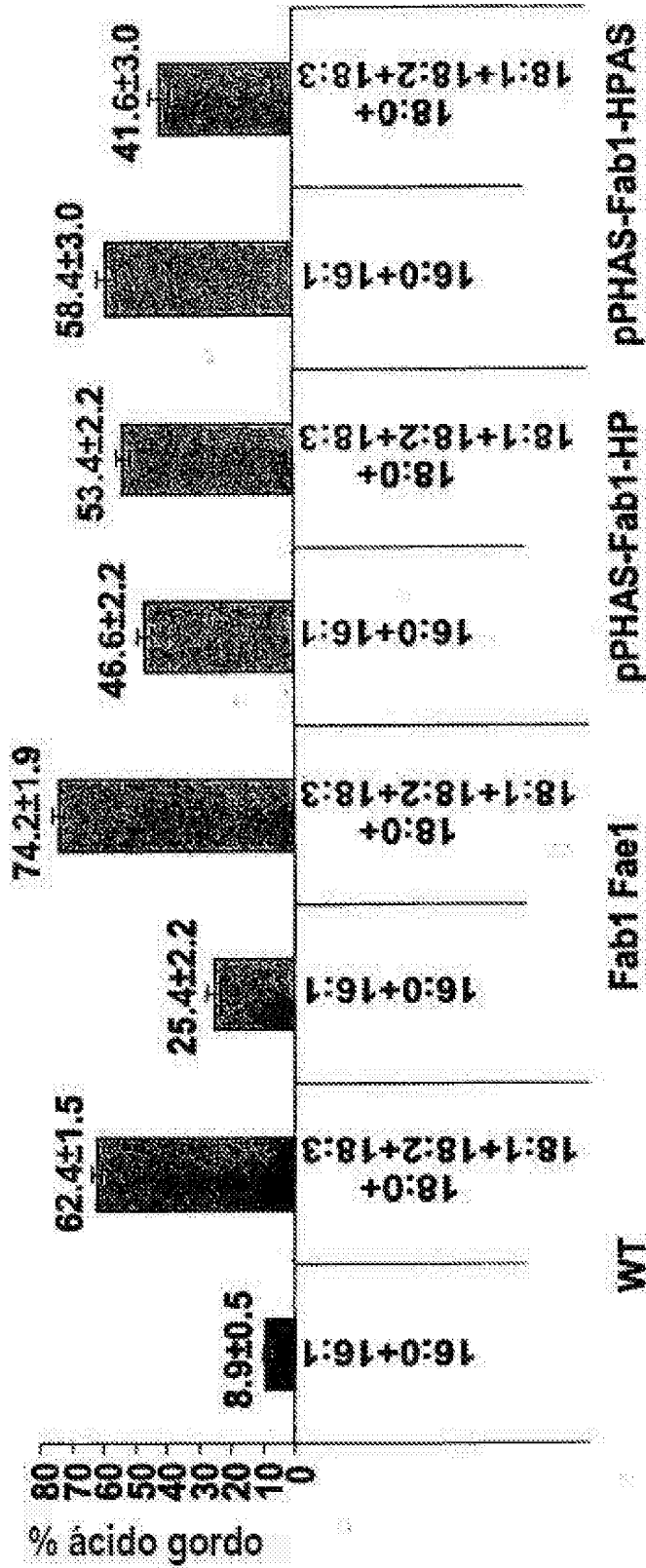


FIG. 7

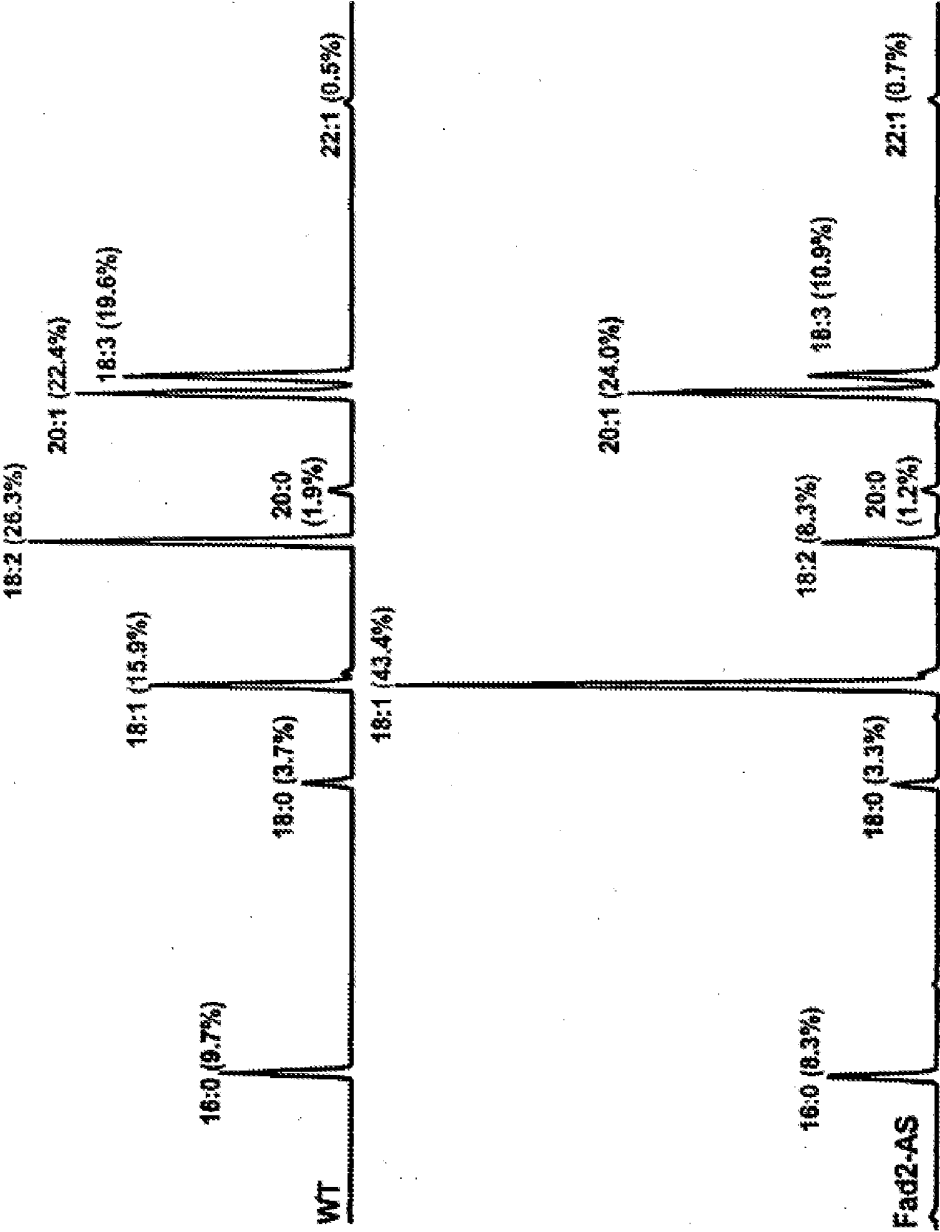


FIG. 8

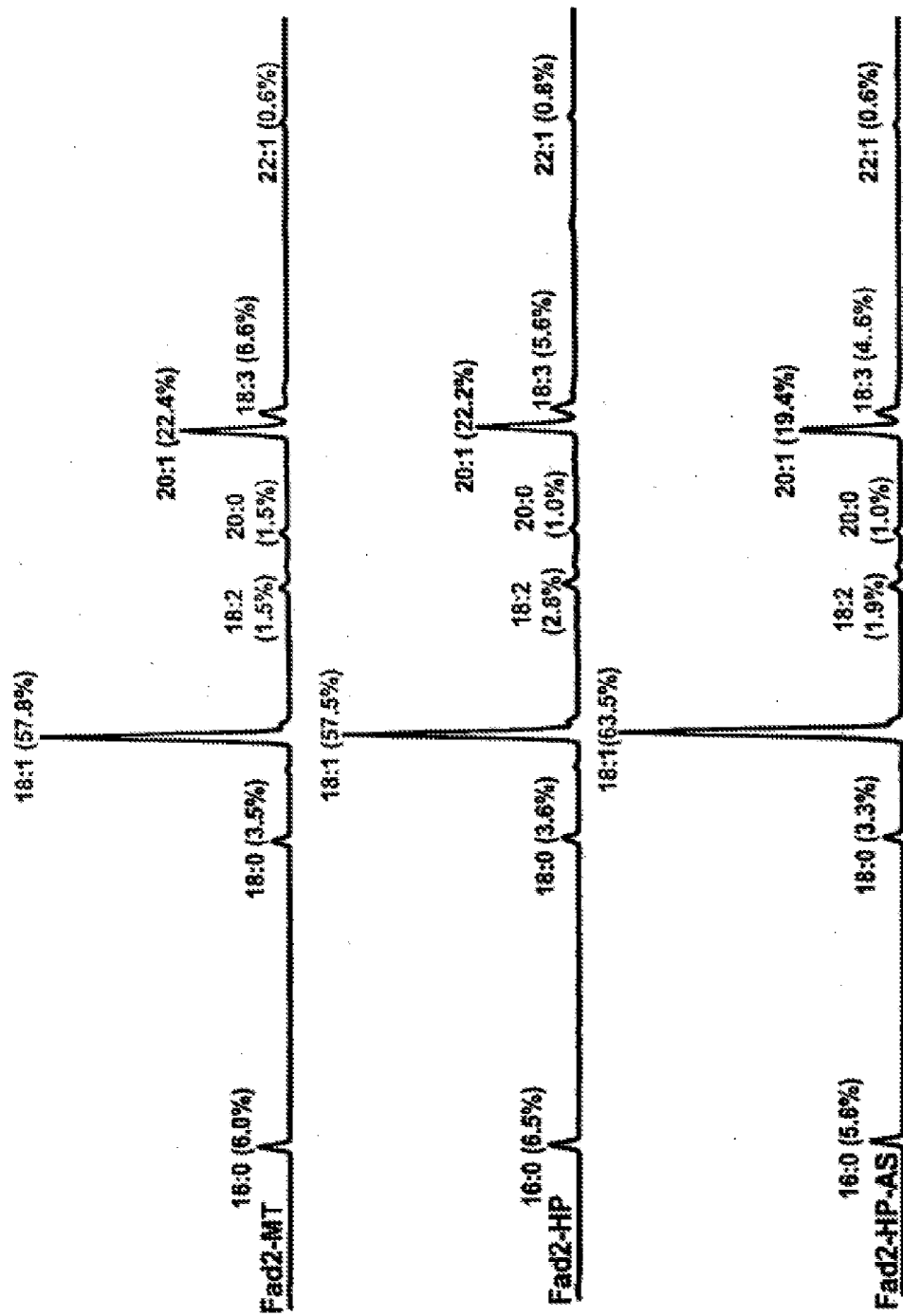


FIG. 9

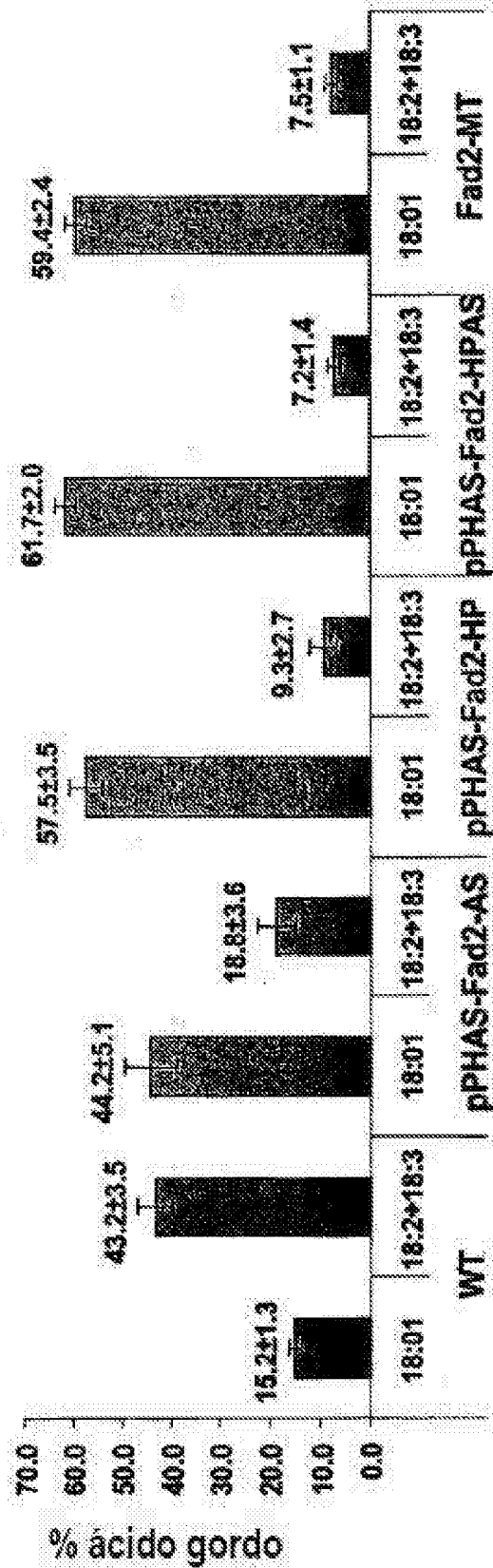


FIG. 10

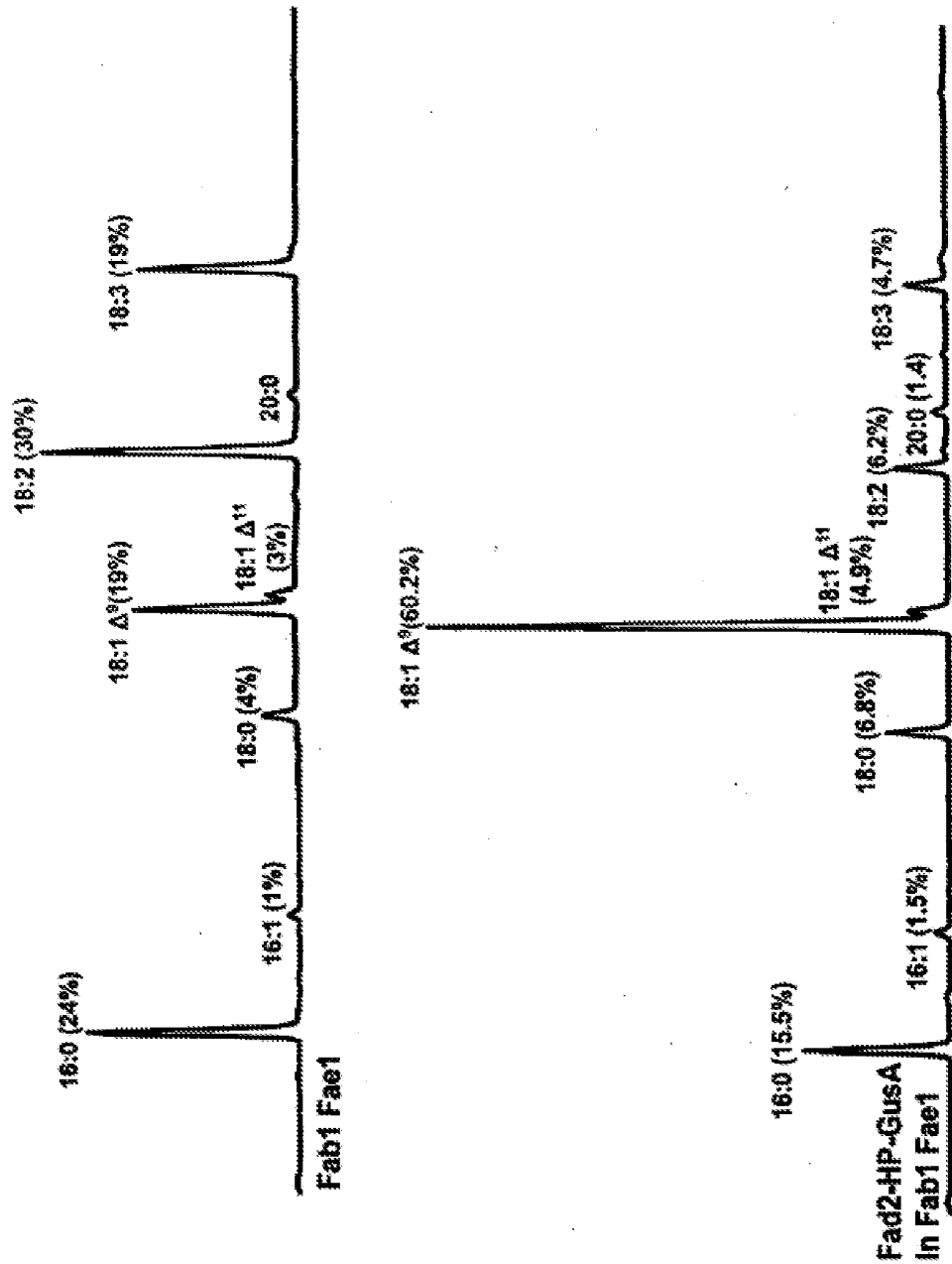


FIG. 11

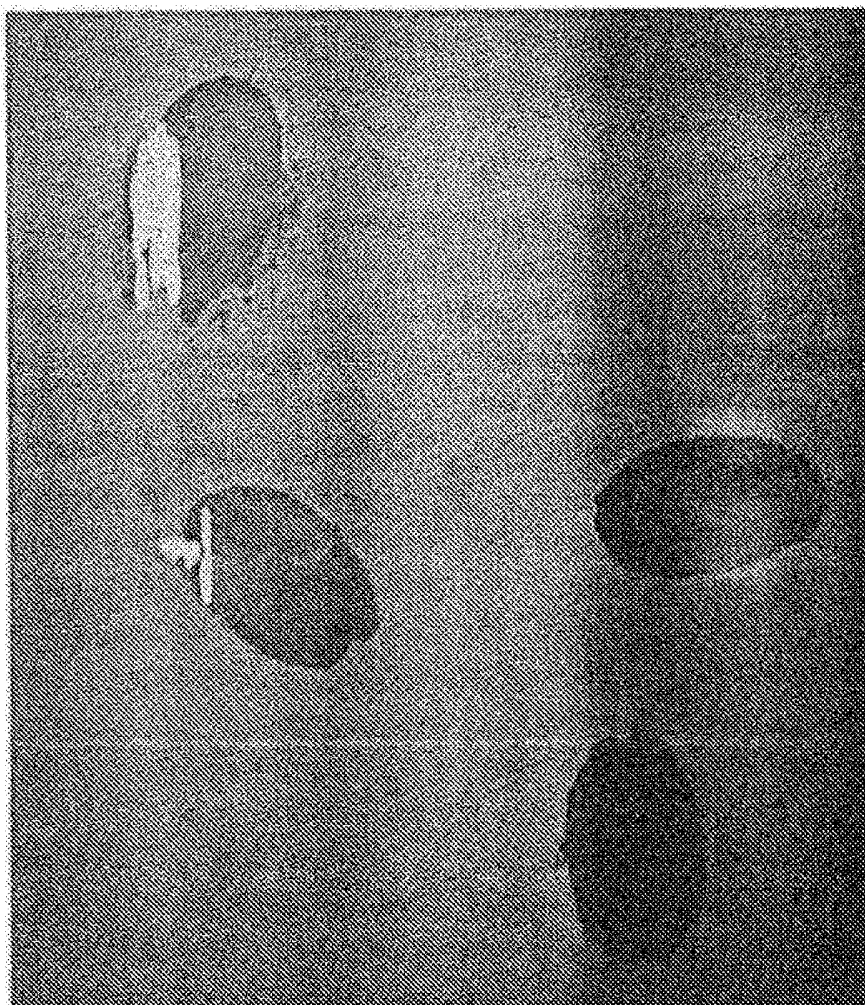


FIG. 12

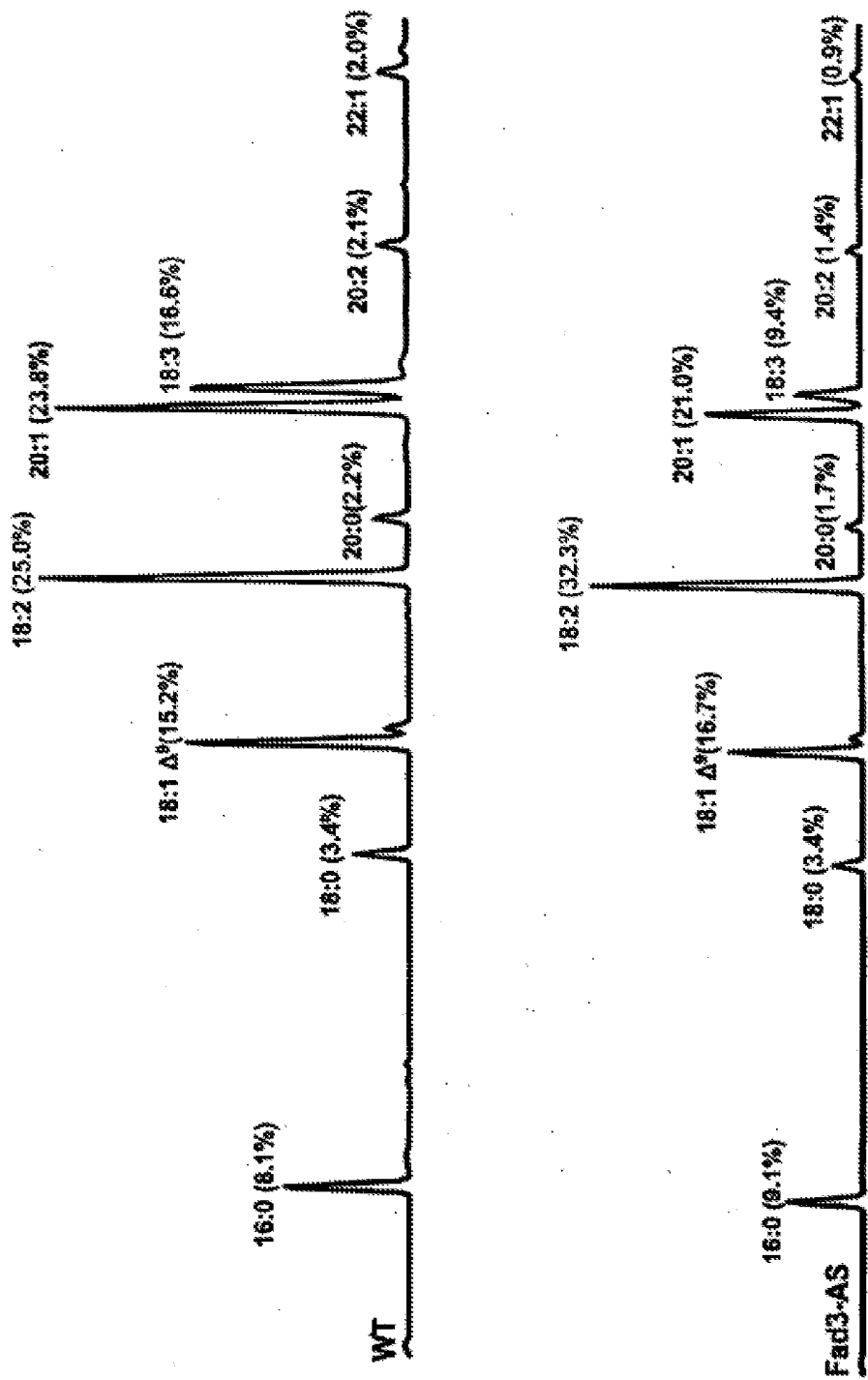


FIG. 13

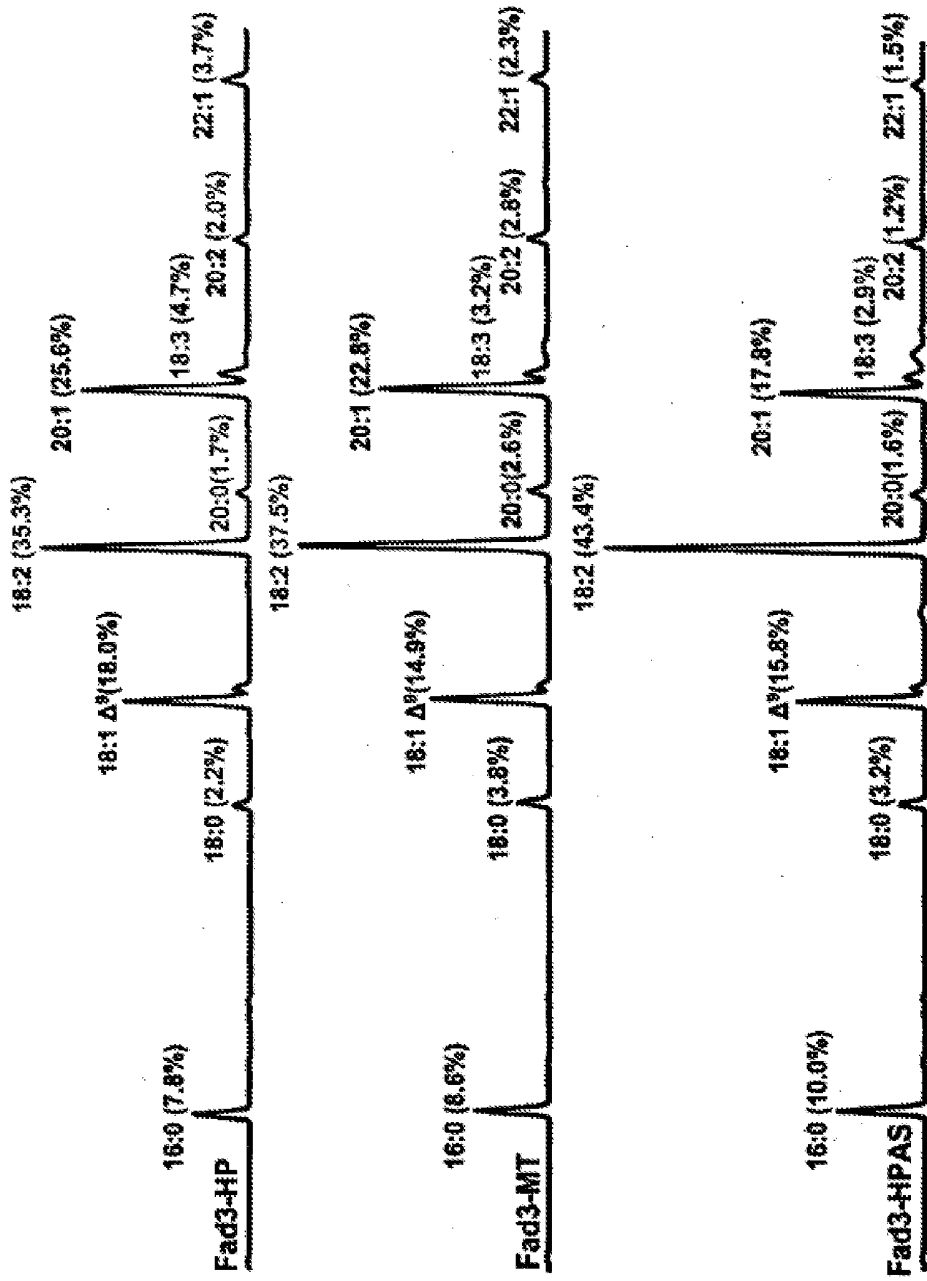


FIG. 14

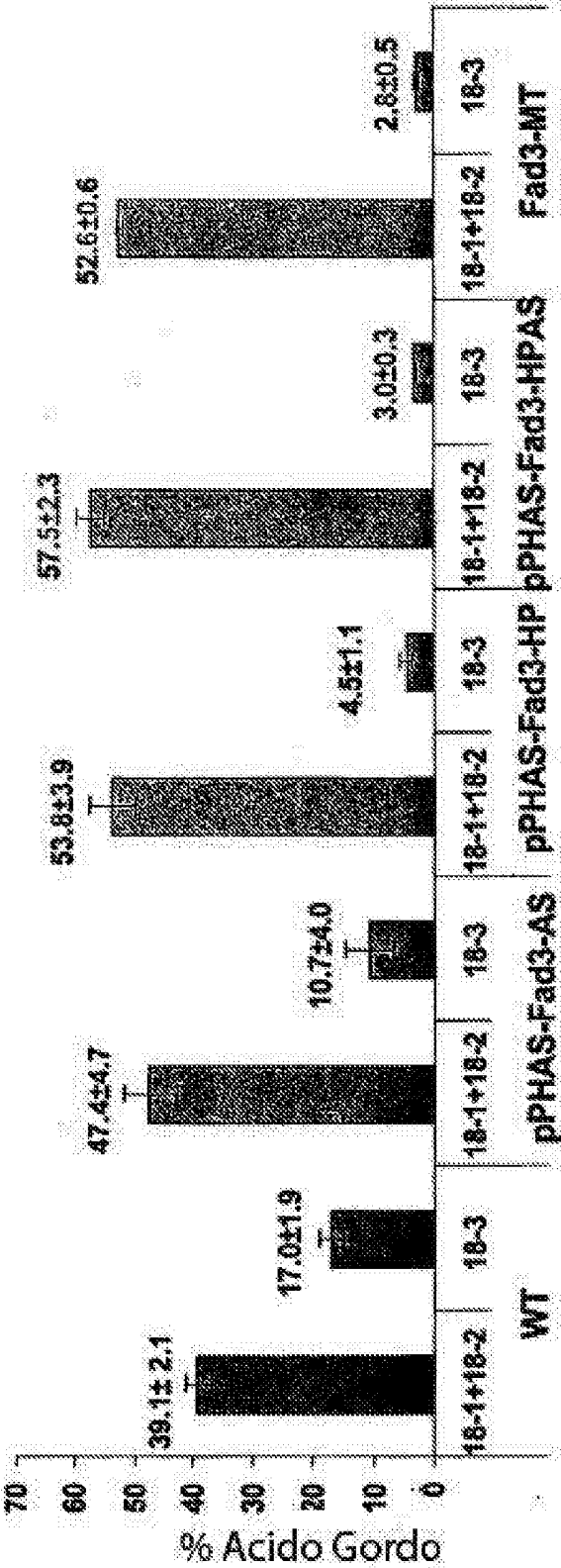


FIG. 15

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- * US 5952657 A
- * US 5759829 A
- * US 20020058815 A
- * WO 9959029 A
- * WO 9953090 A
- * WO 9961631 A
- * WO 0059035 A
- * US 20030175965 A
- * US 20030180955 A
- * WO 0138551 A, Grossniklaus
- * WO 0142443 A, Churikov
- * WO 0153475 A, Cogoni
- * WO 0168836 A, Reed
- * WO 0170944 A, Honer
- * WO 0172774 A, Desk
- * WO 0192513 A, Arndt
- * WO 0244321 A, Tuschl
- * WO 0063364 A, Pachtuk
- * WO 0104313 A, Satish Chandran
- * WO 0238905 A, Echeverri
- * WO 02055092 A, Kreutzer
- * WO 02055893 A
- * EP 1144623 B1
- * WO 9948029 A, Graham
- * WO 0170949 A
- * AU 4037501
- * US 6506559 B, Fire
- * US 10201394 B, Vargeese
- * US 6385713 B, Beigelman
- * US 60402996 B, Usman
- * WO 0044895 A, Kreutzer
- * WO 0138648 A, Zernicka-Goetz
- * WO 9932819 A, Fire
- * WO 0001846 A, Praelinck
- * WO 0129058 A, Mello and Fire
- * WO 9907405 A, Deschamps-Depalleja
- * WO 0044914 A, L.

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- * LIU et al. *Plant Physiol.*, 2002, vol. 129, 1732-1753
- * FIRE et al. *Nature*, 1998, vol. 391, 806
- * HAMILTON et al. *Science*, 1999, vol. 286, 950-951
- * FIRE et al. *Trends Genet.*, 1999, vol. 15, 358
- * BERSTEIN et al. *Nature*, 2001, vol. 409, 363
- * ELBASHIR et al. *Genes Dev.*, 2001, vol. 15, 188
- * HUTVAGNER et al. *Science*, 2001, vol. 293, 834
- * ELBASHIR et al. *Genes Dev.*, 2001, vol. 15, 188
- * BAHRAMIAN ; ZARBL. *Molecular and Cellular Biology*, 1999, vol. 19, 274-283
- * WIANNY ; GOETZ. *Nature Cell Biol.*, 1999, vol. 2, 70
- * HAMMOND et al. *Nature*, 2000, vol. 404, 293
- * ELBASHIR et al. *Nature*, 2001, vol. 411, 494
- * WATERHOUSE et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 13958-13965
- * WATERHOUSE ; HELLIWELL. *Nat. Rev. Genet.*, 2003, vol. 5, 29-38
- * CHUANG ; MEYEROWITZ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, 5985-5990
- * STOUTJESDIJK et al. *Plant Physiol.*, 2002, vol. 129, 1723-1731
- * PANDOLFINI et al. *BMC Biotechnology*, vol. 3, 7
- * PANSTRUGA et al. *Mol. Biol. Rep.*, 2003, vol. 30, 135-150
- * SMITH et al. *Nature*, 2000, vol. 507, 319-320
- * WESLEY et al. *Plant J.*, 2001, vol. 27, 581-590
- * WANG ; WATERHOUSE. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2001, vol. 5, 156-159
- * HELLIWELL ; WATERHOUSE. *Methods*, 2003, vol. 30, 289-295
- * PARRISH et al. *Molecular Cell*, 2000, vol. 6, 1077-1087
- * SAENGER. *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer-Verlag, 1984
- * LOAKES. *Nucleic Acids Research*, 2001, vol. 29, 2437-2447
- * CHEN et al. *Nature Biotechnology*, vol. 24 (4), 455-460
- * BASS. *Nature*, 2001, vol. 411, 428-429
- * ELBASHIR et al. *Nature*, 2001, vol. 411, 494-498
- * ALLSHIRE. *Science*, 2002, vol. 297, 1818-1819

- * VOLPE et al. *Science*, 2002, vol. 297, 1833-1837
- * JENUWEIN. *Science*, 2002, vol. 297, 2215-2218
- * HALL et al. *Science*, 2002, vol. 297, 2232-2237
- * HUTVAGNER ; ZAMORE. *Science*, 2002, vol. 297, 2056-60
- * MCMANUS et al. *RNA*, 2002, vol. 8, 842-850
- * REINHART et al. *Gene & Dev.*, 2002, vol. 16, 1616-1626
- * REINHART ; BARTEL. *Science*, 2002, vol. 297, 1831
- * MARTINEZ et al. *Cell*, 2002, vol. 110, 563-574
- * SCHWARZ et al. *Molecular Cell*, 2002, vol. 10, 637-666
- * TURNER et al. *CSH Symp. Quant. Biol. LII*, 1987, 123-133
- * FRIER et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 9373-9377
- * TURNER et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, vol. 109, 3753-3765
- * Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. ZUCKER et al. *RNA Biochemistry and Biotechnology*, Kluwer Academic Publishers, 1999, 11-43.
- * ZUCKER et al. Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure. *J. Mol. Biol.*, 1999, vol. 288, 911-940
- * RNA Secondary Structure Prediction. ZUCKER et al. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, John Wiley & Sons, 2000, 11.2.1-11.2.10
- * EDDY ; DURBIN. *Nucl. Acids Res.*, 1994, vol. 22, 2078-2088
- * J. GORODKIN ; L. J. HEYER ; G. D. STORMO. Finding the most significant common sequence and structure motifs in a set of RNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 1997, vol. 25 (18), 3724-3732
- * J. GORODKIN ; L. J. HEYER ; G. D. STORMO. Finding Common Sequence and Structure Motifs in a set of RNA Sequences. *JSMB*, 1997, vol. 5, 120-123
- * BECHTOLD, N. ; ELLIS, J. ; PELLETIER, G. C. R. *Acad. Sci. Paris*, 1993, vol. 316, 1194-1198