

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 969 371**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2013.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2004 E 20171780 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2023 EP 3760234**

54 Título: **Interferencia por ARN para el tratamiento de trastornos de ganancia de función**

30 Prioridad:

12.09.2003 US 502678 P

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

17.05.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ARONIN, NEIL y
ZAMORE, PHILLIP, D.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 969 371 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Interferencia por ARN para el tratamiento de trastornos de ganancia de función

5 **Antecedentes de la invención**

La interferencia por ARN (iARN) es el mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia mediante ARN bicatenarios (ARNbc) homólogos al gen que se suprime. Los ARNbc se procesan por Dicer, una ribonucleasa III celular, para generar dúplex de alrededor de 21 nt con nucleótidos protuberantes en 3' (ARN interferente pequeño, ARNip) que median en la degradación del ARNm específica de secuencia. En células de mamífero, las moléculas de ARNip son capaces de silenciar específicamente la expresión génica sin inducción de la ruta de respuesta del interferón no específica. Así, los ARNip se han convertido en una alternativa nueva y poderosa a otras herramientas genéticas, tales como oligonucleótidos no codificantes y ribozimas, para analizar la función génica. Además, se están desarrollando ARNip para fines terapéuticos con el objetivo de silenciar los genes de enfermedad en seres humanos.

Las enfermedades de repetición de trinucleótidos comprenden un grupo recientemente reconocido de trastornos heredados. La mutación genética común es un aumento en una serie de una repetición de trinucleótidos particular. Hasta la fecha, la repetición de trinucleótidos más frecuente es CAG, que codifica el aminoácido glutamina. Se conocen al menos 9 enfermedades de repetición de CAG, y existen más de 20 variedades de estas enfermedades, que incluyen enfermedad de Huntington, enfermedad de Kennedy, y muchas enfermedades espinocerebelosas. Estos trastornos comparten un componente neurodegenerativo en el cerebro y/o la médula espinal. Cada enfermedad tiene un patrón específico de neurodegeneración en el cerebro, y la mayoría tiene una herencia dominante autosómica.

La aparición de las enfermedades ocurre, en general, de los 30 a 40 años, pero en la enfermedad de Huntington las repeticiones de CAG en el gen huntingtina de >60 predicen una aparición juvenil.

La investigación reciente por los presentes inventores ha mostrado que la mutación genética (aumento en la longitud de repeticiones de CAG de normal <36 en el gen huntingtina a >36 en enfermedad) está asociada con la síntesis de una proteína huntingtina mutante, que tiene >36 poliglutaminas (Aronin et al., 1995). También se ha mostrado que la proteína forma agregados citoplásmicos e inclusiones nucleares (DiFiglia et al., 1997), y se asocia con vesículas (Aronin et al., 1999). No se conocen rutas patógenas precisas.

Se cree que la enfermedad de Huntington (y por implicación otras enfermedades de repetición de trinucleótidos) está causada, al menos en parte, por interacciones aberrantes de proteínas, que provocan la alteración de los procesos neuronales críticos, disfunción neuronal, y finalmente la muerte neuronal (neurodegeneración en áreas del cerebro denominadas el cuerpo estriado y la corteza). En la búsqueda de un tratamiento eficaz para estas enfermedades, los investigadores en este campo enfatizaron el entendimiento de la patogénesis de la enfermedad, e inicialmente buscaron mediar al nivel de las supuestas interacciones aberrantes de proteínas. Sin embargo, no existe tratamiento eficaz para la enfermedad de Huntington u otras enfermedades de repetición de trinucleótidos. Además, se ha apreciado ahora que múltiples procesos anormales podrían ser activos en estos tipos de enfermedad.

Sumario de la invención

45 La presente invención se define en y por las reivindicaciones adjuntas.

En particular, la invención proporciona agentes para la destrucción selectiva de ARNm mutantes transcritos a partir de genes mutantes de ganancia de función, previniendo así la producción de la proteína mutante codificada por tal gen. Se han propuesto otros métodos basados en iARN para la destrucción de genes mutantes en los que los ARNip se dirigen, por ejemplo, contra una mutación puntual que ocurre en un único alelo en el gen mutante (por ejemplo, la mutación puntual en el gen superóxido dismutasa (SOD) asociada a esclerosis lateral amiotrófica (ELA)). Sin embargo, existe una diferencia clave entre ELA y enfermedades de repetición de trinucleótidos, tales como la enfermedad de Huntington. La ELA tiene una mutación puntual en un alelo como el cambio genético, mientras que las enfermedades de repetición de trinucleótidos tienen una región ampliada de repeticiones de CAG en un alelo como el cambio genético. El uso de iARN contra la región ampliada de repeticiones de CAG tiene posibles complicaciones. Se sabe que existen más de 80 genes normales con regiones de repeticiones de CAG en células. Así, no se pueden usar los ARNip dirigidos contra estas repeticiones de CAG sin arriesgar la destrucción generalizada de ARNm que contienen repeticiones de CAG normales. Asimismo, el silenciamiento de sitios no específicos de alelo daría como resultado la pérdida tanto de huntingtina normal como mutante que provoca la disfunción neuronal.

Los agentes de la invención utilizan tecnología de interferencia por ARN (iARN) contra regiones polimórficas seleccionadas (es decir, regiones que contienen polimorfismos específicos de alelo o alélicos) que son distintos del sitio de mutación en el gen que codifica proteína mutante. Los agentes de la actual invención son tratamientos eficaces para una enfermedad de ganancia de función.

65 Los agentes de la actual invención proporcionan un tratamiento eficaz para la enfermedad de Huntington (EH).

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona un agente para uso para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad caracterizada o provocada por una proteína mutante de ganancia de función, administrando al sujeto una cantidad eficaz del agente de iARN dirigido contra un polimorfismo alélico dentro de un gen que codifica una proteína mutante, es decir, proteína huntingtina, de forma que se produce la interferencia específica de secuencia de un gen, dando como resultado un tratamiento eficaz para la enfermedad.

La proteína mutante contiene una región ampliada de poliglutamina. El gen que codifica la proteína mutante contiene una región ampliada de repeticiones de trinucleótidos.

La invención usa agentes de iARN homólogos a un polimorfismo alélico dentro del gen que codifica, por ejemplo, una proteína huntingtina mutante para el tratamiento de enfermedad de Huntington. En una realización preferida, el agente de iARN se dirige contra un polimorfismo alélico seleccionado del grupo que consiste en P1-P5. En una realización preferida adicional, el agente de iARN se dirige un polimorfismo alélico seleccionado del grupo que consiste en P6-P43.

En una realización adicional, la invención proporciona agentes de iARN que comprenden una primera y una segunda hebra que contienen cada una 16-25 nucleótidos. La primera hebra puede ser homóloga a una región de un gen que codifica una proteína mutante de ganancia de función, en el que la secuencia de nucleótidos de la proteína mutante de ganancia de función comprende un polimorfismo alélico. La segunda hebra incluye 16-25 nucleótidos complementarios a la primera hebra. El agente de iARN también puede tener una porción de bucle que comprende 4-11, por ejemplo 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, nucleótidos que conectan las dos secuencias nucleotídicas. En aún otras realizaciones, la región diana de la secuencia de ARNm se localiza en una región no traducida (UTR) 5' o una UTR 3' del ARNm de una proteína mutante.

En otra realización, la invención proporciona un constructo de expresión que comprende un ácido nucleico aislado que codifica una molécula de ácido nucleico con una primera secuencia de 16-25 nucleótidos homóloga a un polimorfismo alélico dentro de, por ejemplo, el gen que codifica una proteína huntingtina mutante. El constructo de expresión puede ser, por ejemplo, un vector viral, vector retroviral, casete de expresión, o plásmido. El constructo de expresión también puede tener una secuencia promotora de ARN polimerasa II o secuencia promotora de ARN polimerasa II, tal como el promotor de ARNnp U6 o promotor H1.

La presente invención proporciona células hospedantes (por ejemplo células de mamífero) que comprenden moléculas de ácidos nucleicos y constructos de expresión de la presente invención.

La presente invención proporciona composiciones terapéuticas que comprenden las moléculas de ácidos nucleicos de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

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

Breve descripción de los dibujos

Figura 1a-k: Gen de huntingtina humano, secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 1)

Figura 2a-b: Proteína huntingtina humana, secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2)

Figura 3: Codificante (SEQ ID NO: 3) y no codificante (SEQ ID NO: 4) de la secuencia de ARN diana de huntingtina (htt)

Figura 4: Análisis termodinámico de los extremos 5' de la hebra de ARNip para el dúplex de ARNip

Figura 5a-c: Reacciones *in vitro* de iARN programadas con ARNip dirigido contra un polimorfismo dentro del ARNm de huntingtina (htt). (a) ARNip estándar. (b) ARNip mejorado por la reducción de la fortaleza del apareamiento de bases del extremo 5' de la hebra no codificante del dúplex de ARNip. (c) ARNip mejorado por la reducción del desapareamiento del extremo 5' de la cadena no codificante del dúplex de ARNip.

Figura 6a-b. iARN de la proteína Htt endógena en células HeLa, (a) Inmunotransferencia de la proteína Htt humana. (b) Cuantificación de la misma.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a agentes para tratar la enfermedad de Huntington.

La presente invención utiliza tecnología de interferencia por ARN (iARN) contra polimorfismos alélicos localizados dentro de un gen que codifica una proteína mutante de ganancia de función. La iARN destruye el ARNm mutante

correspondiente con especificidad y selectividad por nucleótidos. Los agentes de ARN de la presente invención se dirigen contra regiones polimórficas de un gen mutante, dando como resultado la escisión de ARNm mutante. Estos agentes de ARN, mediante una serie de interacciones proteína-nucleótido, funcionan escindiendo los ARNm mutantes. Las células destruyen el ARNm escindido, previniendo así la síntesis de proteína mutante correspondiente, por ejemplo la proteína huntingtina.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona un agente para uso para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad caracterizada o provocada por una proteína mutante de ganancia de función, administrando al sujeto una cantidad eficaz del agente de iARN dirigido contra un polimorfismo alélico dentro de un gen que codifica proteína huntingtina, de forma que se produce la interferencia específica de secuencia de un gen, dando como resultado un tratamiento eficaz para la enfermedad. En una realización, la proteína mutante contiene una región ampliada de poliglutamina. En otra realización, el gen que codifica la proteína mutante contiene una región ampliada de repeticiones de trinucleótidos.

La invención usa agentes de iARN homólogos a un polimorfismo alélico dentro del gen que codifica una proteína huntingtina mutante para el tratamiento de la enfermedad de Huntington. En una realización preferida, el agente de iARN se dirige contra un polimorfismo alélico seleccionado del grupo que consiste en P1-P5. En una realización preferida adicional, el agente de iARN se dirige un polimorfismo alélico seleccionado del grupo que consiste en P6-P43.

En una realización adicional, la invención proporciona agentes de iARN que comprenden una primera y una segunda hebra que contienen cada una 16-25 nucleótidos. La primera hebra puede ser homóloga a una región de un gen que codifica una proteína mutante de ganancia de función, en el que la secuencia de nucleótidos de la proteína mutante de ganancia de función comprende un polimorfismo alélico. La segunda hebra puede incluir 16-25 nucleótidos complementarios a la primera hebra. El agente de iARN también puede tener una porción de bucle que comprende 4-11, por ejemplo 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, nucleótidos que conectan las dos secuencias nucleotídicas. En aún otras realizaciones, la región diana de la secuencia de ARNm se localiza en una región no traducida (UTR) 5' o una UTR 3' del ARNm de una proteína mutante.

En otra realización, la invención proporciona un constructo de expresión que comprende un ácido nucleico aislado que codifica una molécula de ácido nucleico con una primera secuencia de 16-25 nucleótidos homóloga a un polimorfismo alélico dentro de, por ejemplo, el gen que codifica una proteína huntingtina mutante. El constructo de expresión puede ser, por ejemplo, un vector viral, vector retroviral, casete de expresión, o plásmido. El constructo de expresión también puede tener una secuencia promotora de ARN polimerasa II o secuencia promotora de ARN polimerasa II, tal como el promotor de ARNnp U6 o promotor H1.

En aún otras realizaciones, la presente invención proporciona células hospedantes (por ejemplo, células de mamífero) que comprenden moléculas de ácidos nucleicos y constructos de expresión de la presente invención.

De manera que la invención pueda ser más fácilmente entendida, se definen primero ciertos términos.

El término "nucleósido" se refiere a una molécula que tiene una base de purina o pirimidina enlazada covalentemente a un azúcar de ribosa o desoxirribosa. Los nucleósidos ejemplares incluyen adenosina, guanosina, citidina, uridina y timidina. Los nucleósidos ejemplares adicionales incluyen inosina, 1-metilinosina, pseudouridina, 5,6-dihidrouridina, ribotimidina, ²N-metilguanosina y ^{2,2}N,N-dimetilguanosina (también denominados nucleósidos "raros"). El término "nucleótido" se refiere a un nucleósido que tiene uno o más grupos fosfato unidos con enlaces de éster al resto de azúcar. Los nucleótidos ejemplares incluyen monofosfatos, difosfatos y trifosfatos de nucleósidos. Los términos "polinucleótido" y "molécula de ácido nucleico" se usan indistintamente aquí, y se refieren a un polímero de nucleótidos unidos juntos por un enlace de fosfodiéster entre los átomos de carbono 5' y 3'.

El término "ARN" o "molécula de ARN" o "molécula de ácido ribonucleico" se refiere a un polímero de ribonucleótidos. El término "ADN" o "molécula de ADN" o "molécula de ácido desoxirribonucleico" se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos. Los ADN y ARN se pueden sintetizar naturalmente (por ejemplo, por replicación de ADN o transcripción de ADN, respectivamente). El ARN se puede modificar postranscripcionalmente. El ADN y el ARN también se pueden sintetizar químicamente. El ADN y el ARN pueden ser monocatenarios (es decir, ARNmc y ADNmc, respectivamente) o de múltiples hebras (por ejemplo, bicatenario, es decir, ARNbc y ADNbc, respectivamente). "ARNm" o "ARN mensajero" es ARN monocatenario que especifica la secuencia de aminoácidos de una o más cadenas polipeptídicas. Esta información se traduce durante la síntesis de proteínas cuando los ribosomas se unen al ARNm.

Como se usa aquí, la expresión "ARN interferente pequeño" ("ARNip") (también denominado en la técnica, "ARN interferentes cortos") se refiere a un ARN (o análogo de ARN) que comprende entre alrededor de 10-50 nucleótidos (o análogos nucleotídicos) que es capaz de dirigir o mediar en la interferencia por ARN. Preferiblemente, un ARNip comprende entre alrededor de 15-30 nucleótidos o análogos nucleotídicos, más preferiblemente entre alrededor de 16-25 nucleótidos (o análogos nucleotídicos), incluso más preferiblemente entre alrededor de 18-23 nucleótidos (o análogos nucleotídicos), e incluso más preferiblemente entre alrededor de 19-22 nucleótidos (o análogos

nucleotídicos) (por ejemplo, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos o análogos nucleotídicos). La expresión ARNip "corto" se refiere a un ARNip que comprende ~21 nucleótidos (o análogos nucleotídicos), por ejemplo, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos. La expresión ARNip "largo" se refiere a un ARNip que comprende ~24-25 nucleótidos, por ejemplo, 23, 24, 25 o 26 nucleótidos. Los ARNip cortos pueden incluir, en algunos casos, menos de 19 nucleótidos, por ejemplo 16, 17 o 18 nucleótidos, a condición de que el ARNip más corto retenga la capacidad para mediar en iARN. Asimismo, los ARNip largos pueden incluir, en algunos casos, más de 26 nucleótidos, a condición de que el ARNip más largo retenga la capacidad para mediar en el procesamiento adicional ausente de iARN, por ejemplo procesamiento enzimático, a un ARNip corto.

La expresión "análogo nucleotídicos" o "nucleótido alterado" o "nucleótido modificado" se refiere a un nucleótido no estándar, que incluye ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos que no existen de forma natural. Los análogos nucleotídicos preferidos se modifican en cualquier posición para alterar ciertas propiedades químicas del nucleótido, aunque retienen la capacidad del análogo nucleotídicos para realizar su función prevista. Los ejemplos de posiciones del nucleótido que pueden ser derivatizadas incluyen la posición 5, por ejemplo, 5-(2-amino)propiluridina, 5-bromouridina, 5-propinouridina, 5-propeniluridina, etc.; la posición 6, por ejemplo, 6-(2-amino)propiluridina; la posición 8 para adenosina y/o guanosinas, por ejemplo, 8-bromoguanosina, 8-cloroguanosina, 8-fluoroguanosina, etc. Los análogos nucleotídicos también incluyen deaza nucleótidos, por ejemplo 7-deaza-adenosina; nucleótidos modificados en O y N (por ejemplo, alquilados, por ejemplo N6-metiladenosina, o como se conoce de otro modo en la técnica); y otros análogos nucleotídicos heterocíclicamente modificados, tales como los descritos en Herdewijn, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, agosto 2000, 10(4):297-310.

Los análogos nucleotídicos también pueden comprender modificaciones en la porción de azúcar de los nucleótidos. Por ejemplo, el grupo 2' OH se puede sustituir por un grupo seleccionado de H, OR, R, F, Cl, Br, I, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, COOR, u OR, en el que R es alquilo de C₁-C₆ sustituido o sin sustituir, alqueno, alquino, arilo, etc. Otras posibles modificaciones incluyen las descritas en las patentes de EE. UU. núms. 5.858.988, y 6.291.438.

El grupo fosfato del nucleótido también se puede modificar, por ejemplo sustituyendo uno o más de los oxígenos del grupo fosfato por azufre (por ejemplo, fosforotioatos), o haciendo otras sustituciones que permitan al nucleótido realizar su función prevista, como se describe en, por ejemplo, Eckstein, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2000 Abr. 10(2):117-21, Rusckowski et al. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2000 Oct. 10(5):333-45, Stein, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2001 Oct. 11(5): 317-25, Vorobjev et al. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2001 Abr. 11(2):77-85, y la patente de EE. UU. núm. 5.684.143. Algunas de las modificaciones anteriormente referenciadas (por ejemplo, modificaciones de grupo fosfato) disminuyen preferiblemente la tasa de hidrólisis de, por ejemplo, polinucleótidos que comprenden dichos análogos in vivo o in vitro.

El término "oligonucleótido" se refiere a un polímero corto de nucleótidos y/o análogos nucleotídicos. La expresión "análogo de ARN" se refiere a un polinucleótido (por ejemplo, un polinucleótido químicamente sintetizado) que tiene al menos un nucleótido alterado o modificado en comparación con un ARN correspondiente sin alterar o sin modificar, pero que retiene la misma o similar naturaleza o función que el ARN sin alterar o sin modificar correspondiente. Como se explica anteriormente, los oligonucleótidos se pueden unir con enlaces que dan como resultado una tasa de hidrólisis más baja del análogo de ARN en comparación con una molécula de ARN con enlaces de fosfodiéster. Por ejemplo, los nucleótidos del análogo pueden comprender enlaces metilenodiol, etilenodiol, oximetiltio, oxietiltio, oxicarboniloxi, fosforodiamidato, fosforoamidato, y/o fosforotioato. Los análogos de ARN preferidos incluyen ribonucleótidos y/o desoxirribonucleótidos modificados en el azúcar y/o en la cadena principal. Dichas alteraciones o modificaciones pueden incluir además la adición de material no nucleotídico, tal como al o a los extremos del ARN o internamente (en uno o más nucleótidos del ARN). Un análogo de ARN solo necesita ser suficientemente similar al ARN natural que tiene la capacidad para mediar (media) en la interferencia por ARN.

Como se usa aquí, la expresión "interferencia por ARN" ("iARN") se refiere a una degradación intracelular selectiva de ARN. La iARN ocurre en las células naturalmente para retirar ARN extraños (por ejemplo, ARN virales). La iARN natural transcurre a través de fragmentos escindidos del ARNbc libre que dirigen el mecanismo degradativo a otras secuencias de ARN similares. Alternativamente, la iARN se puede iniciar por la mano del hombre, por ejemplo para silenciar la expresión de genes diana.

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

Como se usa aquí, el término "ARN aislado" (por ejemplo, "ARNip aislado" o "precursor de ARNip aislado") se refiere a moléculas de ARN que están sustancialmente libres de otro material celular, o medio de cultivo cuando se producen por técnicas recombinantes, o sustancialmente libres de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente.

La expresión "in vitro" tiene su significado reconocido en la técnica, por ejemplo, que implica reactivos o extractos purificados, por ejemplo extractos celulares. La expresión "in vivo" también tiene su significado reconocido en la

técnica, por ejemplo, que implica células vivas, por ejemplo, células inmortalizadas, células primarias, líneas celulares, y/o células en un organismo.

5 Como se usa aquí, el término "transgén" se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico que se inserta por artificio en una célula, y llega a ser parte del genoma del organismo que se desarrolla de la célula. Dicho transgén puede incluir un gen que es parcial o completamente heterólogo (es decir, extraño) al organismo transgénico, o puede representar un gen homólogo a un gen endógeno del organismo. El término "transgén" también significa una molécula de ácido nucleico que incluye una o más secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas, por ejemplo ADN, que codifica uno o más precursores de ARN manipulados por ingeniería, a expresar en un organismo transgénico, por ejemplo, animal, que es parcialmente o completamente heteróloga, es decir, extraña, al animal transgénico, u homóloga a un gen endógeno del animal transgénico, pero que se diseña para insertarla en el genoma del animal en una localización que se diferencia de la del gen natural. Un transgén incluye uno o más promotores y cualquier otro ADN, tales como intrones, necesarios para la expresión de la secuencia de ácido nucleico seleccionada, todos operativamente unidos a la secuencia seleccionada, y puede incluir una secuencia potenciadora.

15 Un gen "implicado" en una enfermedad o trastorno incluye un gen, cuya expresión o función normal o aberrante afecta o provoca la enfermedad o trastorno, o al menos un síntoma de dicha enfermedad o trastorno

20 La expresión "mutación de ganancia de función", como se usa aquí, se refiere a cualquier mutación en un gen en la que la proteína codificada por dicho gen (es decir, la proteína mutante) adquiere una función no asociada normalmente a la proteína (es decir, la proteína natural) que provoca o contribuye a una enfermedad o trastorno. La mutación de ganancia de función puede ser una delección, adición o sustitución de un nucleótido o nucleótidos en el gen, que da lugar al cambio en la función de la proteína codificada. En una realización, la mutación de ganancia de función cambia la función de la proteína mutante o provoca interacciones con otras proteínas. En otra realización, la mutación de ganancia de función provoca una disminución o eliminación de la proteína de tipo salvaje normal, por ejemplo por interacción de la proteína mutante alterada con dicha proteína de tipo salvaje normal.

30 El término "polimorfismo", como se usa aquí, se refiere a una variación (por ejemplo, una delección, inserción o sustitución) en una secuencia génica que se identifica o detecta cuando se compara la misma secuencia génica de sujetos de fuentes diferentes (pero del mismo organismo). Por ejemplo, se puede identificar un polimorfismo cuando se compara la misma secuencia génica de diferentes sujetos (pero del mismo organismo). La identificación de dichos polimorfismos es rutinaria en la técnica, siendo las metodologías similares a las usadas para detectar, por ejemplo, mutaciones puntuales de cáncer de mama. La identificación se puede hacer, por ejemplo, de ADN extraído de linfocitos del sujeto, seguido de amplificación de regiones polimórficas usando cebadores específicos para dicha región polimórfica. Alternativamente, el polimorfismo se puede identificar cuando se comparan dos alelos del mismo gen. Una variación en secuencia entre dos alelos del mismo gen dentro de un organismo se denomina aquí un "polimorfismo alélico". El polimorfismo puede ser un nucleótido dentro de una región codificante, pero, debido a la degeneración del código genético, no codifica cambio en la secuencia de aminoácidos. Alternativamente, las secuencias polimórficas pueden codificar un aminoácido diferente en una posición particular, pero el cambio en el aminoácido no afecta la función de la proteína. También se pueden encontrar regiones polimórficas en regiones no codificantes del gen.

40 La expresión "dominio de poliglutamina", como se usa aquí, se refiere a un segmento o dominio de una proteína que consiste en restos consecutivos de glutamina unidos por enlaces peptídicos. En una realización, la región consecutiva incluye al menos 5 restos de glutamina.

45 La expresión "dominio ampliado de poliglutamina" o "segmento ampliado de poliglutamina", como se usa aquí, se refiere a un segmento o dominio de una proteína que incluye al menos 35 restos consecutivos de glutamina unidos por enlaces peptídicos. Dichos segmentos ampliados se encuentran en sujetos afectados por un trastorno por poliglutamina, como se describe aquí, tanto si se ha mostrado como si no que el sujeto manifiesta síntomas.

50 La expresión "repetición de trinucleótidos" o "región de repetición de trinucleótidos", como se usa aquí, se refiere a un segmento de una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, que consiste en repeticiones consecutivas de una secuencia trinucleotídica particular. En una realización, la repetición de trinucleótidos incluye al menos 5 secuencias de trinucleótidos consecutivas. Las secuencias de trinucleótidos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, CAG, CGG, GCC, GAA, CTG, y/o CGG.

55 La expresión "enfermedades de repetición de trinucleótidos", como se usa aquí, se refiere a cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por una región ampliada de repeticiones de trinucleótidos localizada dentro de un gen, siendo la región ampliada de repeticiones de trinucleótidos la causante de la enfermedad o trastorno. Los ejemplos de enfermedades de repetición de trinucleótidos incluyen, pero no se limitan a, ataxia espinocerebelosa de tipo 12, ataxia espinocerebelosa de tipo 8, síndrome del cromosoma X frágil, retraso mental del cromosoma XE frágil, ataxia de Friedreich, y distrofia miotónica. Las enfermedades de repetición de trinucleótidos preferidas para el tratamiento que no son parte de la invención son las caracterizadas o provocadas por una región ampliada de repeticiones de trinucleótidos en el extremo 5' de la región codificante de un gen, el gen que codifica una proteína mutante que provoca o es causante de la enfermedad o trastorno. Ciertas enfermedades de trinucleótidos, por ejemplo síndrome del cromosoma X frágil, en las que la mutación no está asociada a una región codificante, pueden no ser adecuadas para

el tratamiento según las metodologías de la presente invención, ya que no hay ARNm adecuado para ser silenciado por iARN. Por el contrario, la enfermedad tal como ataxia de Friedreich puede ser adecuada para el tratamiento según las metodologías de la invención debido a que, aunque la mutación causante no está dentro de una región codificante (es decir, se encuentra dentro de un intrón), la mutación puede estar dentro de, por ejemplo, un precursor de ARNm (por ejemplo, un precursor de ARNm previamente ajustado).

La expresión "trastorno por poliglutamina", como se usa aquí, se refiere a cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por una expansión de repeticiones de (CAG)_n en el extremo 5' de la región codificante (codificando así una región ampliada de poliglutamina en la proteína codificada). En una realización, los trastornos por poliglutamina se caracterizan por una degeneración progresiva de las células nerviosas. Ejemplos de trastornos por poliglutamina incluyen, pero no se limitan a: enfermedad de Huntington, ataxia espinocerebelosa de tipo 1, ataxia espinocerebelosa de tipo 2, ataxia espinocerebelosa de tipo 3 (también conocida como enfermedad de Machado-Joseph), y ataxia espinocerebelosa de tipo 6, ataxia espinocerebelosa de tipo 7, y atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana.

La expresión "examinar la función de un gen en una célula u organismo" se refiere a examinar o estudiar la expresión, actividad, función o fenotipo que surge del mismo.

Diversas metodologías incluyen la etapa que implica comparar un valor, nivel, rasgo, característica, propiedad, etc., con un "control adecuado", denominado indistintamente aquí como "control apropiado". Un "control adecuado" o "control apropiado" es cualquier control o patrón conocido por un experto habitual en la técnica, útil para fines de comparación. Un "control adecuado" o "control apropiado" es un valor, nivel, rasgo, característica, propiedad, etc., determinado antes de la realización de una metodología de iARN, como se describe aquí. Por ejemplo, se pueden determinar una tasa de transcripción, nivel de ARNm, tasa de traducción, nivel de proteína, actividad biológica, característica o propiedad celular, genotipo, fenotipo, etc., antes de introducir un agente de iARN de la invención en una célula u organismo.

Un "control adecuado" o "control apropiado" es un valor, nivel, rasgo, característica, propiedad, etc., determinado en una célula u organismo, por ejemplo un control o célula normal u organismo, que presenta, por ejemplo, rasgos normales.

Un "control adecuado" o "control apropiado" es un valor, nivel, rasgo, característica, propiedad, etc. predefinidos.

Diversos aspectos de la invención se describen con más detalle en las siguientes subsecciones.

I. Trastornos por poliglutamina

Los trastornos por poliglutamina son una clase de enfermedad o trastornos caracterizados por una mutación genética común. En particular, la enfermedad o los trastornos se caracterizan por una repetición ampliada del trinucleótido CAG que da lugar, en la proteína codificada, a un tramo ampliado de restos de glutamina. Los trastornos por poliglutamina son similares por cuanto las enfermedades se caracterizan por una degeneración progresiva de células nerviosas. A pesar de sus similitudes, los trastornos por poliglutamina ocurren en diferentes cromosomas, y de este modo ocurren en segmentos de ADN completamente diferentes. Los ejemplos de trastornos por poliglutamina incluyen enfermedad de Huntington, atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana, atrofia muscular espinobulbar, ataxia espinocerebelosa de tipo 1, ataxia espinocerebelosa de tipo 2, ataxia espinocerebelosa de tipo 3, ataxia espinocerebelosa de tipo 6, y ataxia espinocerebelosa de tipo 7 (Tabla 3).

Tabla 1. Trastornos por poliglutamina

Enfermedad	Gen	Locus	Proteína	Tamaño de la repetición de CAG	
				Normal	Enfermedad
Atrofia muscular espinobulbar (enfermedad de Kennedy)	<i>AR</i>	Xq13-21	Receptor de andrógenos (AR)	9-36	38-62
Enfermedad de Huntington	<i>HD</i>	4p16.3	Huntingtina	6-35	36-121
Atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana (síndrome de Haw-River)	<i>DRPLA</i>	12p13.31	Atrofina-1	6-35	49-88
Ataxia espinocerebelosa de tipo 1	<i>SCA1</i>	6p23	Ataxina-1	6-44 ^a	39-82
Ataxia espinocerebelosa de tipo 2	<i>SCA2</i>	12q24.1	Ataxina-2	15-31	36-63
Ataxia espinocerebelosa de tipo 3 (enfermedad de Machado-Joseph)	<i>SCA3</i> (<i>MJD1</i>)	14q32.1	Ataxina-3	12-40	55-84

Enfermedad	Gen	Locus	Proteína	Tamaño de la repetición de CAG	
				Normal	Enfermedad
Ataxia espinocerebelosa de tipo 6	SCA6	19p13	Subunidad α_{1A} de los canales de calcio dependientes del voltaje	4-18	21-33
Ataxia espinocerebelosa de tipo 7	SCA7	13p12-13	Ataxina-7	4-35	37-306

^aAlelos con 21 o más repeticiones se interrumpen por 1-3 unidades de CAT; los alelos de enfermedad contienen tramos de CAG puros.

Los trastornos por poliglutamina se pueden caracterizar, por ejemplo, por dominios que tienen entre alrededor de 30 a 35 restos de glutamina, entre alrededor de 35 a 40 restos de glutamina, entre alrededor de 40 a 45 restos de glutamina, y que tienen alrededor de 45 o más restos de glutamina. El dominio de poliglutamina contiene normalmente restos de glutamina consecutivos (Q n>36).

II. Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington, heredada como una enfermedad dominante autosómica, provoca enfermedad con alteración de la cognición y motora. Los pacientes pueden vivir más de una década con intenso debilitamiento, antes de la muerte prematura por inanición o infección. La enfermedad empieza en la cuarta o quinta década en la mayoría de los casos, pero un subconjunto de pacientes manifiesta la enfermedad en la adolescencia. La mutación genética para la enfermedad de Huntington es una repetición de CAG ampliada en el gen huntingtina. La repetición de CAG varía en número desde 8 hasta 35 en individuos normales (Kremer et al., 1994). La mutación genética, por ejemplo un aumento en la longitud de las repeticiones de CAG desde normal inferior a 36 en el gen huntingtina hasta más de 36 en la enfermedad, está asociada con la síntesis de una proteína huntingtina mutante, que tiene más de 36 poliglutamatos (Aronin et al., 1995). En general, los individuos con 36 o más repeticiones de CAG tendrán enfermedad de Huntington. Prototípica de nada menos que otras veinte enfermedades con una CAG ampliada como mutación subyacente, la enfermedad de Huntington todavía no tiene terapia eficaz. Se han mostrado prometedoras una variedad de intervenciones – tales como interrupción de las rutas apoptóticas, adición de reactivos para reforzar la eficiencia de las mitocondrias, y bloqueo de receptores de NMDA – en cultivos celulares y modelo de ratón de enfermedad de Huntington. Sin embargo, en el mejor de los casos, estos enfoques revelan una prolongación corta de la supervivencia celular o animal.

La enfermedad de Huntington obedece el dogma principal de la genética: un gen mutante sirve de molde para la producción de un ARNm mutante; el ARNm mutante dirige entonces la síntesis de una proteína mutante (Aronin et al., 1995; DiFiglia et al., 1997). La huntingtina mutante (proteína) se acumula probablemente en neuronas selectivas en el cuerpo estriado y la corteza, altera actividades celulares determinadas hasta ahora, y provoca disfunción neuronal y muerte (Aronin et al., 1999; Laforet et al., 2001). Debido a que una única copia de un gen mutante es suficiente para provocar la enfermedad de Huntington, el tratamiento más parco sería volver ineficaz el gen mutante. Los enfoques teóricos podrían incluir detener la transcripción génica de la huntingtina mutante, destruir el ARNm mutante, y bloquear la traducción. Cada uno tiene el mismo resultado -- pérdida de huntingtina mutante.

III. Gen huntingtina

El gen de enfermedad ligado a la enfermedad de Huntington se llama Huntington o (htt). El locus de huntingtina es grande, abarcando 180 kb, y consistiendo en 67 exones. El gen huntingtina se expresa ampliamente, y es necesario para el desarrollo normal. Se expresa como 2 formas alternativamente poliadeniladas que presentan diferente abundancia relativa en diversos tejidos fetales y adultos. El transcrito más grande tiene aproximadamente 13,7 kb, y se expresa predominantemente en el cerebro adulto y fetal, mientras que el transcrito más pequeño de aproximadamente 10,3 kb se expresa más ampliamente. Los dos transcritos se diferencian con respecto a sus regiones no traducidas 3' (Lin et al., 1993). Se predice que ambos mensajeros codifican una proteína de 348 kilodálton que contiene 3144 aminoácidos. Se cree que el defecto genético que conduce a la enfermedad de Huntington confiere una nueva propiedad al ARNm, o altera la función de la proteína. En la Figura 2 (SEQ ID NO: 2) se expone una secuencia de aminoácidos del gen huntingtina humano.

En la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) se expone una secuencia nucleotídica consenso del gen huntingtina humano (ADNc). La región codificante consiste en los nucleótidos 316 a 9750 de SEQ ID NO: 1. Las dos señales de poliadenilación alternativas se encuentran en los nucleótidos 10326 a 10331 y los nucleótidos 13644 a 13649, respectivamente. Los dos sitios de poliadenilación correspondientes se encuentran en los nucleótidos 10348 y 13672, respectivamente. La primera señal/sitio de poliadenilación es la del transcrito de 10,3 kb. La segunda señal/sitio de poliadenilación es la del transcrito de 13,7 kb, el transcrito predominante en el cerebro.

Se identificaron cinco (5) polimorfismos en el gen htt humano como se describe en el Ejemplo I. Se han identificado 38 polimorfismos adicionales en la secuencia del gen huntingtina mediante análisis de SNP (polimorfismo de un solo

nucleótido) (véase la Tabla 3). Los polimorfismos expuestos en las Tablas 2 y 3 representan sitios preferidos para silenciar mediante iARN específica de un solo nucleótido, como se describe aquí.

Tabla 2. Sitios polimórficos (P) en el gen htt de líneas celulares humanas.

Línea celular	P1 (2886)	P2 (4034)	P3 (6912)	P4 (7222)	P5 (7246)
GFP-Htt (constructo de 9 kb)	C	G	A	T	C
HeLa	t	a	A	g	C
HEK 293T	t	a	G	g	t
HepG2	t	a	G	g	t
FP-4	t	a	g, A	g	t, C

Tabla 3. Sitios polimórficos (P) en el gen htt humano identificado mediante análisis de SNP.

		consenso	polimorfismo		db xref
complemento	103	G	A	P6	dbSNP: 396875
complemento	432	T	C	P7	dbSNP:473915
complemento	474	C	A	P8	dbSNP:603765
	1509	T	C	P9	dbSNP: 1065745
complemento	1857	T	C	P10	dbSNP:2301367
	3565	G	C, A	P11, P12	dbSNP:1065746
	3594	T	G	P13	dbSNP: 1143646
	3665	G	C	P14	dbSNP:1065747
complemento	4122	G	A	P15	dbSNP:363099
complemento	4985	G	A	P16	dbSNP:363129
complemento	5480	T	G	P17	dbSNP:363125
	6658	T	G	P18	dbSNP: 1143648
complemento	6912	T	C	P19	dbSNP:362336
complemento	7753	G	A	P20	dbSNP:3025816
complemento	7849	G	C	P21	dbSNP:3025814
complemento	8478	T	C	P22	dbSNP:2276881
	8574	T	C	P23	dbSNP:2229985
complemento	9154	C	A	P24	dbSNP:3025807
	9498	T	C	P25	dbSNP: 2229987
complemento	9699	G	A	P26	dbSNP:362308
complemento	9809	G	A	P27	dbSNP:362307
complemento	10064	T	C	P28	dbSNP:362306
complemento	10112	G	C	P29	dbSNP:362268
complemento	10124	G	C	P30	dbSNP:362305
complemento	10236	T	G	P31	dbSNP: 362304
complemento	10271	G	A	P32	dbSNP:362303
complemento	10879	G	A	P33	dbSNP:1557210
complemento	10883	G	A	P34	dbSNP:362302
complemento	10971	C	A	P35	dbSNP:3025805
complemento	11181	G	A	P36	dbSNP:362267
complemento	11400	C	A	P37	dbSNP:362301
11756..	11757	G	-	P38	dbSNP:5855774
	12658	G	A	P39	dbSNP:2237008

		consenso	polimorfismo		db xref
complemento	12911	T	C	P40	dbSNP:362300
complemento	13040	G	A	P41	dbSNP:2530595
	13482	G	A	P42	dbSNP: 1803770
	13563	G	A	P43	dbSNP: 1803771

La presente invención se dirige contra huntingtina mutante usando interferencia por ARN (Hutvagner et al., 2002). Una hebra de ARN bicatenario (ARNip) complementa una región polimórfica dentro del ARNm de huntingtina mutante. Después de la introducción de ARNip en neuronas, el ARNip se desenrolla parcialmente, se une a una región polimórfica dentro del ARNm de huntingtina de una manera específica del sitio, y activa una ARNm nucleasa. Esta nucleasa escinde el ARNm de huntingtina, deteniendo así la traducción de la huntingtina mutante. Las células se libran ellas mismas del ARNm parcialmente digerido, impidiendo así la traducción, o las células digieren proteínas parcialmente traducidas. Las neuronas sobreviven sobre la huntingtina no mutante (del alelo normal); este enfoque previene los estragos de huntingtina mutante eliminando su producción.

IV. Diseño de ARNip

Se diseñan ARNip del siguiente modo. Primero, se selecciona una porción del gen diana (por ejemplo, el gen htt) que incluye el polimorfismo. Los polimorfismos ejemplares se seleccionan de la región no traducida 5' de un gen diana. La escisión de ARNm en estos sitios debe eliminar la traducción de proteína mutante correspondiente. Los polimorfismos de otras regiones del gen mutante también son adecuados para su selección como dianas. Se diseña una hebra codificante basándose en la secuencia de la porción seleccionada. Preferiblemente, la porción (y la hebra codificante correspondiente) incluye alrededor de 19 a 25 nucleótidos, por ejemplo 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos. Más preferiblemente, la porción (y hebra codificante correspondiente) incluye 21, 22 o 23 nucleótidos. El experto apreciará, sin embargo, que los ARNip que tienen una longitud menor que 19 nucleótidos o mayor que 25 nucleótidos también pueden funcionar para mediar en la iARN.

Se ha demostrado que los agentes de iARN más largos provocan una respuesta de interferón o de PKR en ciertas células de mamíferos, que puede ser indeseable. Preferiblemente, los agentes de iARN de la invención no provocan una respuesta de PKR (es decir, son de una longitud suficientemente corta). Sin embargo, agentes de iARN más largos pueden ser útiles, por ejemplo, en tipos celulares incapaces de generar una respuesta de PKR o en situaciones en las que la respuesta de PKR se ha reducido o apagado por medios alternativos.

La secuencia de la hebra codificante se diseña de forma que el polimorfismo esté esencialmente en el centro de la hebra. Por ejemplo, si se escoge un ARNip de 21 nucleótidos, el polimorfismo está, por ejemplo, en el nucleótido 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 (es decir, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleótidos desde el extremo 5' de la hebra codificante). Para un ARNip de 22 nucleótidos, el polimorfismo está, por ejemplo, en el nucleótido 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16. Para un ARNip de 23 nucleótidos, el polimorfismo está, por ejemplo, en 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16. Para un ARNip de 24 nucleótidos, el polimorfismo está, por ejemplo, en 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 16. Para un ARNip de 25 nucleótidos, el polimorfismo está, por ejemplo, en 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17. El mover el polimorfismo hacia una posición descentrada puede reducir, en algunos casos, la eficiencia de escisión por el ARNip. Tales composiciones, es decir, composiciones menos eficientes, pueden ser deseables para su uso si se detecta el silenciamiento del ARNm de tipo salvaje.

La hebra no codificante es rutinariamente de la misma longitud que la hebra codificante, e incluye nucleótidos complementarios. En una realización, las hebras son completamente complementarias, es decir, las hebras son de extremos romos cuando se alinean o hibridan. En otra realización, las hebras comprenden alinear o hibridar de manera que se generen nucleótidos protuberantes de 1, 2 o 3 nucleótidos, es decir, el extremo 3' de la hebra codificante se extiende 1, 2 o 3 nucleótidos más que el extremo 5' de la hebra no codificante, y/o el extremo 3' de la hebra no codificante se extiende 1, 2 o 3 nucleótidos más que el extremo 5' de la hebra codificante. Las protuberancias pueden comprender (o consistir en) nucleótidos correspondientes a la secuencia del gen diana (o complemento de la misma). Alternativamente, las protuberancias pueden comprender (o consistir en) desoxirribonucleótidos, por ejemplo dTs, o análogos nucleotídicos, u otro material no nucleotídico adecuado.

Para facilitar la entrada de la hebra no codificante en RISC (y así aumentar o mejorar la eficiencia de la escisión y el silenciamiento dianas), se puede alterar la fortaleza del par de bases entre el extremo 5' de la hebra codificante y el extremo 3' de la hebra no codificante, por ejemplo se puede disminuir o reducir, como se describe en detalle en las solicitudes de patente provisionales de EE. UU. núms. 60/475.386, titulada "Methods and Compositions for Controlling Efficacy of RNA Silencing" (presentada el 2 de junio de 2003), y 60/475.331, titulada "Methods and Compositions for Enhancing the Efficacy and Specificity of RNAi" (presentada el 2 de junio de 2003).

En una realización de estos aspectos de la invención, la fortaleza del par de bases es menor debido a un menor número de pares de bases G:C entre el extremo 5' de la primera hebra o no codificante y el extremo 3' de la segunda

hebra o codificante que entre el extremo 3' de la primera hebra o no codificante y el extremo 5' de la segunda hebra o codificante. En otra realización, la fortaleza del par de bases es menor debido a al menos un par de bases mal apareado entre el extremo 5' de la primera hebra o no codificante y el extremo 3' de la segunda hebra o codificante. Preferiblemente, el par de bases mal apareado se selecciona del grupo que consiste en G:A, C:A, C:U, G:G, A:A, C:C y U:U. En otra realización, la fortaleza del par de bases es menor debido a al menos un par de bases de titubeo, por ejemplo, G:U, entre el extremo 5' de la primera hebra o no codificante y el extremo 3' de la segunda hebra o codificante. En otra realización, la fortaleza del par de bases es menor debido a al menos un par de bases que comprende un nucleótido raro, por ejemplo inosina (I). Preferiblemente, el par de bases se selecciona del grupo que consiste en I:A, I:U y I:C. En otra realización más, la fortaleza del par de bases es menor debido a al menos un par de bases que comprende un nucleótido modificado. En realizaciones preferidas, el nucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste en 2-amino-G, 2-amino-A, 2,6-diamino-G, y 2,6-diamino-A.

A continuación se describe con detalle el diseño de los ARNip adecuados para dirigirlos contra los polimorfismos de htt expuestos en la Tabla 2

ADN de P1	TGTGCTGACTCTGAGGAACAG	(SEQ ID NO:5)	
codificante	UGUGCUGACUCUGAGGAACAG	(SEQ ID NO:6)	
no	ACACGACUGAGACUCCUUGUC	(extremos romos, 21-	(SEQ ID NO:7)
codificante		mero)	
(2 nucleótidos protuberantes) véase la Figura 5			
ADN de P2	CATACCTCAAACCTGCATGATG	(SEQ ID NO:8)	
codificante	CAUACCUCAAACUGCAUGAUG	(SEQ ID NO:9)	
no	GUAUGGAGUUUGACGUACUAC	(extremos romos, 21-	(SEQ ID NO:10)
codificante		mero)	
ADN de P3	GCCTGCAGAGCCGGCGGCCTA	(SEQ ID NO:11)	
codificante	GCCUGCAGAGCCGGCGGCCUA	(SEQ ID NO:12)	
no	CGGACGUCUCGGCCGCCGGAU	(extremos romos, 21-	(SEQ ID NO:13)
codificante		mero)	
ADN de P4	ACAGAGTTTGTGACCCACGCC	(SEQ ID NO:14)	
codificante	ACAGAGUUUGUGACCCACGCC	(SEQ ID NO:15)	
no	UGUCUCAAACACUGGGUGCGG	(extremos romos, 21-	(SEQ ID NO:16)
codificante		mero)	
ADN de P5	TCCCTCATCTACTGTGTGCAC	(SEQ ID NO:17)	
codificante	UCCCUCAUCUACUGUGUGCAC	(SEQ ID NO:18)	
no	AGGGAGUAGAUGACACACGUG	(extremos romos, 21-	(SEQ ID NO:19)
codificante		mero)	

Se pueden diseñar ARNip según las enseñanzas ejemplares anteriores para cualesquiera otros polimorfismos encontrados en el gen htt. Además, la tecnología es aplicable para silenciar cualquier otro gen de enfermedad que tenga asociados polimorfismos, es decir, polimorfismos que no causan enfermedad.

Para validar la eficacia por la que los ARNip destruyen ARNm mutantes (por ejemplo, ARNm de huntingtina mutante), el ARNip se incuba con ADNc mutante (por ejemplo, ADNc de huntingtina mutante) en un sistema de expresión de ARNm *in vitro* basado en *Drosophila*. Radiomarcados con ³²P, los ARNm mutantes recién sintetizados (por ejemplo, ARNm de huntingtina mutante) se detectan autorradiográficamente sobre un gel de agarosa. La presencia de ARNm mutante escindido indica actividad de ARNm nucleasa. Los controles adecuados incluyen la omisión de ARNip y el uso de ADNc de huntingtina no mutante. Alternativamente, se seleccionan ARNip de control que tienen la misma composición de nucleótidos que el ARNip seleccionado, pero sin complementariedad de secuencias significativa con el gen diana apropiado. Tales controles negativos se pueden diseñar reordenando aleatoriamente la secuencia nucleotídica del ARNip seleccionado; se puede realizar una búsqueda de homología para garantizar que el control negativo carezca de homología con cualquier otro gen en el genoma apropiado. Además, se pueden diseñar ARNip de control negativo introduciendo uno o más mal apareamientos de bases en la secuencia.

Se seleccionan sitios de complementación ARNip-ARNm que dan como resultado la especificidad óptima de ARNm y la máxima escisión de ARNm.

Mientras que la presente invención caracteriza el silenciamiento de regiones polimórficas en el gen htt mutante diana distintas de la mutación de la región ampliada de CAG, el experto apreciará que silenciar la región mutante puede tener aplicabilidad como estrategia terapéutica en ciertas situaciones. El silenciamiento de la región mutante se puede llevar a cabo usando ARNip, que complementa CAG en serie. El ARNip^{ca9} se uniría a ARNm con complementación de

CAG, pero cabría esperar que tuviese mayor oportunidad de unirse a una serie ampliada de CAG. Múltiples ARNip^{cag} se unirían al ARNm de huntingtina mutante (a diferencia de menos para el ARNm de huntingtina no mutante); así, es más probable que se escinda el ARNm de huntingtina mutante. La inactivación con éxito de ARNm usando este enfoque también eliminaría ARNm de huntingtina normal o de tipo salvaje. También inactivados, al menos de algún modo, podrían estar otros genes normales (aproximadamente 70) que también tienen repeticiones de CAG, en los que sus ARNm podrían interactuar con el ARNip. Este enfoque se basaría así en una de estrategia de desgaste -- se destruiría más del ARNm de huntingtina mutante que del ARNm de huntingtina de tipo salvaje o los otros aproximadamente 69 ARNm que codifican poliglutaminas.

5 V. Agentes de iARN

La presente invención incluye moléculas de ARNip diseñadas, por ejemplo, como se describe anteriormente. Las moléculas de ARNip se pueden sintetizar químicamente, o se pueden transcribir *in vitro* a partir de un molde de ADN, o *in vivo* de, por ejemplo, ARNhp, o, usando la enzima DICER humana recombinante, para escindir *in vitro* moldes de ARNbc transcritos en conjuntos de ARN dúplex de 20, 21 o 23 pb que median en la iARN. Las moléculas de ARNip se pueden diseñar usando cualquier método conocido en la técnica.

En un aspecto, en lugar de que el agente de iARN sea un ácido ribonucleico interferente, por ejemplo un ARNip o ARNhp como se describe anteriormente, el agente de iARN puede codificar un ácido ribonucleico interferente, por ejemplo un ARNhp, como se describe anteriormente. En otras palabras, el agente de iARN puede ser un molde transcripcional del ácido ribonucleico interferente. Así, los agentes de iARN de la presente invención también pueden incluir ARN de horquilla pequeña (ARNhp), y constructos de expresión manipulados para expresar los ARNhp. La transcripción de los ARNhp se inicia en un promotor de la polimerasa III (pol III), y se cree que termina en la posición 2 de un sitio de terminación de la transcripción de 4-5-timina. Tras la expresión, se cree que los ARNhp se pliegan en una estructura de tallo-bucle con protuberancias UU de 3'; posteriormente, los extremos de estos ARNhp se procesan, convirtiendo los ARNhp en moléculas de tipo ARNip de alrededor de 21-23 nucleótidos (Brummelkamp et al., 2002; Lee et al., 2002, *más arriba*; Miyagishi et al., 2002; Paddison et al., 2002, *más arriba*; Paul et al., 2002, *más arriba*; Sui et al., 2002 *más arriba*; Yu et al., 2002, *más arriba*). Se puede encontrar en internet más información sobre el diseño y uso de ARNhp en las siguientes direcciones: katahdin.cshl.org:9331/RNAi/docs/BseRI-BamHI_Strategy.pdf and katahdin.cshl.org:9331/RNAi/docs/Web_version_of_PCR_strategy1.pdf.

Las constructos de expresión de la presente invención incluyen cualquier constructo adecuado para uso en el sistema de expresión apropiado, e incluyen, pero no se limitan a, vectores retrovirales, casetes de expresión lineales, plásmidos, y vectores virales o derivados de virus, como se conoce en la técnica. Tales constructos de expresión pueden incluir uno o más promotores inducibles, sistemas de promotores de ARN Pol III tales como los promotores de ARNnp U6 o promotores de la ARN polimerasa III H1, u otros promotores conocidos en la técnica. Los constructos pueden incluir una o ambas hebras del ARNip. Los constructos de expresión que expresan ambas hebras también pueden incluir estructuras de bucle que unen ambas hebras, o cada hebra se puede transcribir por separado de promotores separados dentro del mismo constructo. Cada hebra también se puede transcribir a partir de un constructo de expresión distinto. (Tuschl, T., 2002, *más arriba*).

Se pueden administrar ARNip sintéticos en células por métodos conocidos en la técnica, que incluyen transfección con liposomas catiónicos y electroporación. Sin embargo, estos ARNip exógenos muestran, en general, persistencia a corto plazo del efecto de silenciamiento (4~5 días en células cultivadas), lo que puede ser beneficioso en sólo ciertas realizaciones. Para obtener la supresión a largo plazo de los genes diana (es decir, genes mutantes) y para facilitar la administración en ciertas circunstancias, se pueden expresar uno o más ARNip dentro de células a partir de constructos de ADN recombinante. Se conocen en la técnica tales métodos para expresar dúplex de ARNip dentro de células a partir de constructos de ADN recombinante para permitir la supresión de genes diana a largo plazo en células, que incluyen sistemas de promotores Pol III de mamífero (por ejemplo, sistemas de promotores H1 o U6/ARNnp (Tuschl, T., 2002, *más arriba*) capaces de expresar ARNip bicatenarios funcionales; (Bagella et al., 1998; Lee et al., 2002, *más arriba*; Miyagishi et al., 2002, *más arriba*; Paul et al., 2002, *más arriba*; Yu et al., 2002, *más arriba*; Sui et al., 2002, *más arriba*). La terminación transcripcional por ARN Pol III ocurre en series de cuatro restos T consecutivos en el molde de ADN, que proporciona un mecanismo para terminar el transcrito de ARNip en una secuencia específica. El ARNip es complementario a la secuencia del gen diana en las orientaciones 5'-3' y 3'-5', y las dos hebras del ARNip se pueden expresar en el mismo constructo o en constructos distintos. Los ARNip de horquilla, conducidos por el promotor H1 o ARNnp U6 y expresados en células, pueden inhibir la expresión de genes diana (Bagella et al., 1998; Lee et al., 2002, *más arriba*; Miyagishi et al., 2002, *más arriba*; Paul et al., 2002, *más arriba*; Yu et al., 2002, *más arriba*; Sui et al., 2002, *más arriba*). Los constructos que contienen secuencia de ARNip bajo el control del promotor T7 también hacen funcional los ARNip cuando se cotransfectan en las células con un vector que expresa ARN polimerasa T7 (Jacque et al., 2002, *más arriba*). Un único constructo puede contener múltiples secuencias que codifican los ARNip, tales como múltiples regiones del gen que codifica htt mutante, que silencia el mismo gen o múltiples genes, y se puede accionar, por ejemplo, por sitios de promotor Pol III distintos.

Las células de animales expresan una variedad de ARN no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos denominados microARN (miARN), que pueden regular la expresión génica al nivel postranscripcional o traduccional durante el desarrollo animal. Una característica común de los miARN es que todos se escinden de un tallo-bucle de

ARN precursor de aproximadamente 70 nucleótidos, probablemente por Dicer, una enzima de tipo RNasa III, o un homólogo de la misma. Sustituyendo las secuencias de tallo del precursor de miARN por una secuencia complementaria al ARNm diana, se puede usar un constructo vector que expresa el precursor manipulado por ingeniería para producir los ARNip para iniciar la iARN contra dianas de ARNm específicas en células de mamífero (Zeng et al., 2002, *más arriba*). Cuando se expresa por vectores de ADN que contienen promotores de polimerasa III, las horquillas diseñadas como micro-ARN pueden silenciar la expresión génica (McManus et al., 2002, *más arriba*). Los micro-ARN dirigidos contra polimorfismos también pueden ser útiles para bloquear la traducción de proteínas mutantes, en ausencia de silenciamiento génico mediado por ARNip. Tales aplicaciones pueden ser útiles en situaciones, por ejemplo, en las que un ARNip diseñado causó el silenciamiento fuera de la diana de la proteína de tipo salvaje.

También se pueden usar mecanismos de administración mediados por virus para inducir el silenciamiento específico de genes diana mediante la expresión de ARNip, por ejemplo generando adenovirus recombinantes que alojan ARNip bajo el control de la transcripción del promotor de ARN Pol II (Xia et al., 2002, *más arriba*). La infección de células HeLa por estos adenovirus recombinantes permite la expresión disminuida de genes diana endógenos. La inyección de los vectores de adenovirus recombinante en ratones transgénicos que expresan los genes diana del ARNip da como resultado la reducción *in vivo* de la expresión del gen diana. *Ídem*. En un modelo animal, la electroporación de embrión completo puede suministrar eficientemente ARNip sintético en embriones de ratón después de la implantación (Calegari et al., 2002). En ratones adultos, la administración eficiente de ARNip se puede llevar a cabo por la técnica de administración de "alta presión", una inyección rápida (en 5 segundos) de un gran volumen de ARNip que contiene disolución en el animal a través de la vena de la cola (Liu et al., 1999, *más arriba*; McCaffrey et al., 2002, *más arriba*; Lewis et al., 2002). También se pueden usar nanopartículas y liposomas para administrar ARNip en animales.

Las composiciones de ácido nucleico de la invención incluyen tanto ARNip sin modificar como ARNip modificados, como se conoce en la técnica, tales como derivados de ARNip reticulados o derivados que tienen restos no nucleotídicos unidos, por ejemplo, a sus extremos 3' o 5'. La modificación de derivados de ARNip de esta forma puede mejorar la captación celular o potenciar las actividades de silenciamiento celular del derivado de ARNip resultante en comparación con el ARNip correspondiente, son útiles para rastrear el derivado de ARNip en la célula, o mejorar la estabilidad del derivado de ARNip en comparación con el ARNip correspondiente.

Los precursores de ARN manipulados por ingeniería, introducidos en células u organismos completos como se describe aquí, conducirán a la producción de una molécula de ARNip deseada. Dicha molécula de ARNip se asociará entonces con componentes proteicos endógenos de la ruta de iARN para unirse a y silenciar una secuencia de ARNm específica para la escisión y destrucción. De esta manera, el ARNm a ser silenciado por el ARNip generado a partir del precursor de ARN manipulado por ingeniería se agotará de la célula u organismo, conduciendo a una disminución en la concentración de la proteína codificada por ese ARNm en la célula u organismo. Los precursores de ARN normalmente son moléculas de ácido nucleico que codifican individualmente una hebra de un ARNbc o codifican toda la secuencia nucleotídica de una estructura de bucle de horquilla de ARN.

Los precursores de ARN manipulados por ingeniería de la invención pueden estar sin conjugar, o se pueden conjugar con otro resto, tal como una nanopartícula, para potenciar una propiedad de las composiciones, por ejemplo un parámetro farmacocinético tal como absorción, eficacia, biodisponibilidad, y/o vida media. La conjugación se puede lograr por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo usando los métodos de Lambert et al., *Drug Deliv. Rev.*:47(1), 99-112 (2001) (describen ácidos nucleicos cargados a nanopartículas de policianoacrilato de alquilo (PACA)); Fattal et al., *J. Control Release* 53(1-3):137-43 (1998) (describen ácidos nucleicos unidos a nanopartículas); Schwab et al., *Ann. Oncol.* 5 Supl. 4:55-8 (1994) (describen ácidos nucleicos unidos a agentes intercalantes, grupos hidrófobos, policationes o nanopartículas de PACA); y Godard et al., *Eur. J. Biochem.* 232(2):404-10 (1995) (describen ácidos nucleicos unidos a nanopartículas).

Los precursores de ARN manipulados por ingeniería de la presente invención también se pueden marcar usando cualquier método conocido en la técnica; por ejemplo, las composiciones de ácido nucleico se pueden marcar con un fluoróforo, por ejemplo Cy3, fluoresceína, o rodamina. El marcaje se puede llevar a cabo usando un kit, por ejemplo el kit de marcaje de ARNip SILENCER™ (Ambion). Además, el ARNip se puede radiomarcarse, por ejemplo usando ³H, ³²P, u otro isótopo apropiado.

Además, debido a que se cree que la iARN progresa a través de al menos un producto intermedio de ARN monocatenario, el experto apreciará que también se pueden diseñar ARNip-mc (por ejemplo, la hebra no codificante de un ARNip-bc) (por ejemplo, para síntesis química) generados (por ejemplo, generados enzimáticamente) o expresados (por ejemplo, a partir de un vector o plásmido) como se describe aquí y utilizados según las metodologías reivindicadas. Además, en invertebrados, la iARN puede ser eficazmente desencadenada por ARNbc largos (por ejemplo, ARNbc de alrededor de 100 - 1000 nucleótidos de longitud, preferiblemente alrededor de 200 - 500, por ejemplo alrededor de 250, 300, 350, 400 o 450 nucleótidos en longitud) que actúan como efectores de iARN. (Brondani et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 Dic 4;98(25):14428-33. Epub 2001 Nov 27).

VI. Métodos para introducir ARN, vectores, y células hospedantes

Los métodos físicos para introducir ácidos nucleicos incluyen la inyección de una disolución que contiene el ARN, bombardeo por partículas cubiertas por el ARN, impregnación de la célula u organismo en una disolución del ARN, o electroporación de membranas celulares en presencia del ARN. Un constructo viral empaquetado en una partícula viral lograría tanto la introducción eficiente de un constructo de expresión en la célula como la transcripción de ARN codificado por el constructo de expresión. Se pueden usar otros métodos conocidos en la técnica para introducir ácidos nucleicos en células, tales como el transporte de vehículos mediado por lípidos, transporte mediado por sustancias químicas, tal como fosfato de calcio, y similares. Así, el ARN se puede introducir junto con componentes que realizan una o más de las siguientes actividades: potenciar la captación de ARN por la célula, inhibir la hibridación de hebras individuales, estabilizar las hebras individuales, o aumentar de otro modo la inhibición del gen diana.

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

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

Dependiendo del gen diana particular y la dosis de material de ARN bicatenario suministrada, este proceso puede proporcionar pérdida de función parcial o completa para el gen diana. Una reducción o pérdida de la expresión génica en al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % o más de células silenciadas es ejemplar. La inhibición de la expresión génica se refiere a la ausencia (o disminución observable) al nivel de proteína y/o producto de ARNm de un gen diana. La especificidad se refiere a la capacidad para inhibir el gen diana sin manifestar efectos sobre otros genes de la célula. Las consecuencias de la inhibición se pueden confirmar por examen de las propiedades exteriores de la célula u organismo (como se presenta más adelante en los ejemplos) o por técnicas bioquímicas tales como hibridación en disolución de ARN, protección con nucleasas, hibridación Northern, transcripción inversa, monitorización de la expresión génica con una micromatriz, unión de anticuerpos, enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), transferencia Western, radioinmunoensayo (RIA), otros inmunoensayos, y análisis por citometría de flujo (FACS).

Para la inhibición mediada por ARN en una línea celular u organismo completo, la expresión génica se evalúa convenientemente usando un gen informador o de resistencia a fármaco, cuyo producto proteico se evalúa fácilmente. Dichos genes informadores incluyen acetohidroxiácido sintasa (ARAS), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (LacZ), beta-glucoronidasa (GUS), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína verde fluorescente (GFP), peroxidasa de rábano picante (HRP), luciferasa (Luc), nopalina sintasa (NOS), octopina sintasa (OCS), y derivados de los mismos. Están disponibles múltiples marcadores seleccionables que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfinotricina, puromicina, y tetraciclina. Dependiendo del ensayo, la cuantificación de la cantidad de expresión génica permite determinar un grado de inhibición que es mayor que 10 %, 33 %, 50 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula no tratada según la presente invención. Dosis más bajas de material inyectado y tiempos más largos después de la administración del agente de iARN pueden dar como resultado la inhibición en una fracción más pequeña de células (por ejemplo, al menos 10 %, 20 %, 50 %, 75 %, 90 % o 95 % de células silenciadas). La cuantificación de la expresión génica en una célula puede mostrar cantidades similares de inhibición al nivel de acumulación de ARNm diana o de traducción de proteína diana. Como un ejemplo, la eficiencia de inhibición se puede determinar evaluando la cantidad de producto génico en la célula; se puede detectar ARNm con una sonda de hibridación que tiene una secuencia nucleotídica fuera de la región usada para el ARN bicatenario inhibidor, o se puede detectar polipéptido traducido con un anticuerpo producido contra la secuencia polipeptídica de esa región.

El ARN se puede introducir en una cantidad que permite la administración de al menos una copia por célula. Dosis más altas (por ejemplo, al menos 5, 10, 100, 500 o 1000 copias por célula) de material pueden dar una inhibición más eficaz; también pueden ser útiles dosis más bajas para aplicaciones específicas.

En un aspecto preferido, la eficacia de un agente de iARN de la invención (por ejemplo, un ARNip que silencia un polimorfismo en un gen mutante) se prueba para determinar su capacidad para degradar específicamente ARNm mutante (por ejemplo, ARNm de htt mutante y/o la producción de la proteína huntingtina mutante) en células, en particular, en neuronas (por ejemplo, líneas clonales neuronales estriatales o corticales y/o neuronas primarias). También son adecuados para los ensayos de validación basados en células otras células fácilmente transfectables, por ejemplo células HeLa o células COS. Las células se transfectan con ADNc humanos de tipo salvaje o mutantes (por ejemplo, ADNc de huntingtina de tipo salvaje o mutante humano). Se cotransfectan ARNip estándar, ARNip modificado, o vectores capaces de producir ARNip a partir de ARNm en bucle en U. Se mide la reducción selectiva del ARNm mutante (por ejemplo, ARNm de huntingtina mutante) y/o de la proteína mutante (por ejemplo, huntingtina

mutante). La reducción de ARNm o proteína mutante se puede comparar con niveles de ARNm o proteína normal. Para fines de comparación, se puede evaluar ARNm o proteína normal introducida exógenamente (o ARNm o proteína normal endógena). Cuando se utilizan células neuronales, que se sabe que son algo resistentes a las técnicas de transfección convencionales, puede ser deseable introducir agentes de iARN (por ejemplo, ARNip) por captación pasiva.

VII. Métodos de tratamiento:

La presente invención proporciona métodos tanto profilácticos como terapéuticos para tratar un sujeto en riesgo de (o susceptible a) una enfermedad o trastorno causado, en todo o en parte, por una proteína mutante de ganancia de función. La enfermedad o trastorno es la enfermedad de Huntington.

"Tratamiento" o "tratar", como se usa aquí, se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico (por ejemplo, un agente de ARN o vector o transgén que lo codifica) a un paciente, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido o línea celular aislado de un paciente, que tiene la enfermedad o trastorno, un síntoma de enfermedad o trastorno o una predisposición hacia una enfermedad o trastorno, con el fin de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, recuperarse de, mejorar o afectar la enfermedad o trastorno, los síntomas de la enfermedad o el trastorno, o la predisposición hacia la enfermedad.

La invención proporciona un método para prevenir en un sujeto una enfermedad o trastorno como se describe anteriormente, administrando al sujeto un agente terapéutico (por ejemplo, un agente de iARN o vector o transgén que lo codifica). Los sujetos en riesgo de la enfermedad se pueden identificar, por ejemplo, por cualquiera o una combinación de ensayos de diagnóstico o de pronóstico como se describen aquí. La administración de un agente profiláctico puede ocurrir antes de la manifestación de los síntomas característicos de la enfermedad o trastorno, de forma que la enfermedad o trastorno se prevenga o, alternativamente, se retrase en su progresión.

La invención también permite métodos para tratar sujetos terapéuticamente, es decir, alterar la aparición de síntomas de la enfermedad o trastorno.

El método modulador implica poner en contacto una célula que expresa un mutante de ganancia de función con un agente terapéutico (por ejemplo, un agente de iARN o vector o transgén que lo codifica) que es específico para un polimorfismo dentro del gen, de forma que se logre la interferencia específica de secuencia con el gen. Estos métodos se pueden realizar *in vitro* (por ejemplo, cultivando la célula con el agente) o, alternativamente, *in vivo* (por ejemplo, administrando el agente a un sujeto).

Con respecto a métodos tanto profilácticos como terapéuticos de tratamiento, tales tratamientos se pueden adaptar o modificar específicamente, basándose en el conocimiento obtenido del campo de la farmacogenómica. "Farmacogenómica", como se usa aquí, se refiere a la aplicación de tecnologías de genómica, tales como secuenciación génica, genética estadística, y análisis de expresión génica a fármacos en desarrollo clínico y a la venta. Más específicamente, el término se refiere al estudio de cómo los genes de un paciente determinan su respuesta a un fármaco (por ejemplo, "fenotipo de respuesta al fármaco" o "genotipo de respuesta al fármaco" de un paciente). Así, la invención proporciona métodos para adaptar un tratamiento profiláctico o terapéutico de un individuo con cualquiera de las moléculas de gen diana de la presente invención o moduladores de gen diana según el genotipo de respuesta al fármaco del individuo. La farmacogenómica permite que un profesional clínico o médico dirija los tratamientos profilácticos o terapéuticos a los pacientes que se beneficiarán más del tratamiento y para evitar el tratamiento de pacientes que experimentarán efectos secundarios tóxicos relacionados con el fármaco.

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

VIII. Composiciones farmacéuticas

La invención se refiere al uso de los agentes descritos anteriormente para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos como se describe más adelante. Por consiguiente, los moduladores (por ejemplo, agentes de iARN) de la presente invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Dichas composiciones normalmente comprenden la molécula de ácido nucleico, proteína, anticuerpo, o compuesto modulador, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa aquí, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Se conoce bien en la técnica el uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Excepto en tanto que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el

compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones. También se pueden incorporar en las composiciones compuestos activos suplementarios.

Una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con su ruta de administración prevista. Los ejemplos de las vías de administración incluyen parenteral, por ejemplo administración intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), y transmucosal. Las disoluciones o suspensiones usadas para administración parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, disolución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminetetraacético; amortiguadores tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables, o viales de dosis múltiple hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones (cuando son solubles en agua) o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersión inyectables estériles. Para administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen disolución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ), o disolución salina amortiguada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril, y debe ser líquida hasta el punto de que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y se debe preservar contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, usando un revestimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersión, y usando tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede provocar incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

Las disoluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío y liofilización, que da un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una disolución previamente filtrada de forma estéril del mismo.

Las composiciones orales incluyen, en general, un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o comprimir en comprimidos. Con el fin de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usar en forma de comprimidos, trociscos, o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un vehículo líquido para uso como un enjuague bucal, en las que el compuesto en el vehículo líquido se aplica por vía oral y se enjuaga y expectora o se traga. Se pueden incluir aglutinantes y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un aromatizante tal como menta piperita, salicilato de metilo, o aromatizante de naranja.

Para administración por inhalación, los compuestos se administran en forma de un spray en aerosol desde un recipiente o dispensador a presión que contiene un propulsor apropiado, por ejemplo un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para que atraviesen la barrera. Dichos penetrantes se conocen en general en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal se puede lograr mediante el uso de sprays nasales o supositorios. Para administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, bálsamos, geles, o cremas, como se conoce en general en la técnica.

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

En una realización, los agentes activos se preparan con vehículos que protegerán el agente frente a la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables biocompatibles, tales como etilenoacetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar suspensiones liposomales (que incluyen liposomas dirigidos contra células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos virales) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar según métodos conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo como se describe en la patente de EE. UU. núm. 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parentales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Forma de dosificación unitaria, como se usa aquí, se refiere a unidades físicamente discretas aptas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se va a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Los requisitos para las formas unitarias de dosificación vienen dictados por y dependen directamente de las características únicas del agente activo y del efecto terapéutico particular a lograr, y las limitaciones inherentes en la técnica de combinar tal agente activo para el tratamiento de individuos.

La toxicidad y eficacia terapéutica se puede determinar por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la relación LD50/ED50. Se prefieren agentes que presentan grandes índices terapéuticos. Aunque se pueden usar agentes que presentan efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado en el diseño de un sistema de administración que dirija tales agentes al sitio de tejido afectado, para minimizar el posible daño a células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Se pueden usar los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular, y se pueden usar estudios en animales a la hora de formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosis de tales agentes se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo, dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada.

Para cualquier agente, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis se puede formular en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluye la EC50 (es decir, la concentración del agente de prueba que logra una respuesta semimáxima) como se determina en cultivo celular. Tal información se puede usar para determinar con más exactitud dosis útiles en los seres humanos. Se pueden medir niveles en plasma, por ejemplo por cromatografía de líquidos de alta resolución.

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

Esta invención se ilustra además por los siguientes ejemplos, que no se debe interpretar como limitativos.

EJEMPLOS

A diferencia de otros tipos de enfermedades autosómicas dominantes, la enfermedad de Huntington no contiene una mutación puntual, por ejemplo cambio de un solo nucleótido. Por tanto, no se puede implementar la estrategia para diseñar ARNip dirigido contra una mutación puntual en el alelo de la enfermedad. En su lugar, la presente invención se refiere a ARNip diseñados dirigidos contra polimorfismos en el gen huntingtina, de los que hay alrededor de 30 disponibles en GenBank. La presente invención también identifica el polimorfismo en el alelo de la enfermedad de Huntington que difiere del alelo de tipo salvaje, de manera que el ARNip destruye sólo el ARNm de la enfermedad y deja intacto el ARNm del alelo de tipo salvaje (normal). Así, sólo se destruye la proteína huntingtina mutante, y la proteína normal está intacta.

Ejemplo I: Prueba de agentes de iARN (por ejemplo, ARNip) contra htt mutante en lisados de *Drosophila*

Se diseñó un ARNip que silencia la posición 2886 en el ARNm de htt como se describe *más arriba*. La secuencia del ARNip se representa en la Figura 5a (SEQ ID NO: 24 codificante; 25 no codificante). Se desprotegió ARN sintético (Dharmacon) según el protocolo del fabricante. Se hibridaron hebras de ARNip (Elbashir et al., 2001a).

Los ARN diana se prepararon según lo siguiente. Se transcribieron ARN diana con T7 ARN polimerasa recombinante, etiquetada con histidina, de productos de PCR como se ha descrito (Nykänen et al., 2001; Hutvagner et al., 2002). Se generaron moldes de PCR para codificante y no codificante de htt amplificando 0,1 ng/ml (concentración final) de molde plasmídico que codifica ADNc de htt usando los siguientes pares de cebadores: diana codificante de htt, 5'-GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAA CAG TAT GTCTCA GAC ATC-3' (SEQ ID NO:30) y 5'-UUCG AAG UAU

UCC GCG UAC GU-3' (SEQ ID NO:31); diana no codificante de htt, 5'-GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAC AAG CCT AAT TAG TGA TGC-3' (SEQ ID NO:32) y 5'-GAA CAG TAT GTC TCA GAC ATC-3' (SEQ ID NO:33).

5 Se probó el ARNip usando un ensayo de iARN *in vitro*, que caracteriza los lisados de embrión de *Drosophila*. Se llevaron a cabo las reacciones y los análisis de iARN *in vitro* como se ha descrito previamente (Tuschl et al., 1999; Zamore et al., 2000; Haley et al., 2003). Se usaron dianas de ARN a concentración de ~ 5 nM, de manera que las reacciones estuvieran principalmente en condiciones de un solo reemplazo. La escisión de la diana en estas condiciones es proporcional a la concentración de ARNip.

10 La Figura 5a muestra la eficacia del ARNip dirigido contra la posición 2886 en el htt mutante. Los datos demuestran claramente que el ARNip dirige la escisión de la diana codificante a un mayor grado que la observada para la diana no codificante. Sin embargo, se reconoce que este ARNip diseñado en primer lugar no produjo una molécula muy activa, al menos en este ensayo *in vitro*. El análisis termodinámico de la fortaleza del par de bases en los dos extremos del dúplex de ARNip indicó fortalezas de pares de bases aproximadamente equivalentes. La Figura 4 representa el análisis termodinámico de extremos 5' de hebras codificantes (SEQ ID NO:20; 22 respectivamente) y no codificantes (SEQ ID NO: 21; 23 respectivamente) de ARNip para el dúplex de ARNip en 5a. Se calculó ΔG (kcal/mol) en NaCl 1 M a 37°C.

20 Para mejorar la eficacia del dúplex de ARNip diseñado, el extremo 5' de la hebra codificante o la posición 19 de la hebra no codificante del ARNip de htt probado en la Figura 5a se alteró para producir dúplex de ARNip en los que el extremo 5' de la hebra codificante estaba completamente desapareado (Figura 5c; SEQ ID NO: 28 codificante; SEQ ID NO: 29 no codificante) o en un par de bases A:U (Figura 5b; SEQ ID NO:26 codificante; SEQ ID NO:27 no codificante). La falta de apareamiento del extremo 5' de una hebra de ARNip -la hebra codificante, en este caso- hace que la hebra funcione con la exclusión de la otra hebra. Cuando el extremo 5' de la hebra codificante de htt estaba presente en un par de bases A:U y el extremo 5' de la hebra no codificante de htt estaba en un par G:C, la hebra codificante dominó la reacción (Figura 5b-c), pero la hebra no codificante de htt retuvo la actividad similar a la observada para el ARNip originalmente diseñado.

30 **Ejemplo II: Inactivación por iARN de la proteína Htt en células cultivadas**

En un primer experimento, los ARNip dirigidos contra un polimorfismo en el ARNm de htt (es decir, el polimorfismo en la posición 2886 en el ARNm de htt) se probaron para determinar su capacidad para disminuir la proteína Htt endógena en células HeLa. Las células HeLa se cultivaron y transfectaron según lo siguiente. Las células HeLa se mantuvieron a 37°C en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Invitrogen) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS), 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (Invitrogen). Las células se sometieron a pasadas regulares a sub-confluencia, y se sembraron a 70 % de confluencia 16 horas antes de la transfección. La transfección transitoria mediada por Lipofectamine™ (Invitrogen) de los ARNip se realizó en placas de 6 pocillos por duplicado (Falcon), como se describe para las líneas de células adherentes por el fabricante. A cada pocillo se añadió una mezcla de transfección estándar que contenía ARNip 100-150 nM y 9-10 µl de Lipofectamine™ en 1 ml de OPTI-MEM® reducido en suero (Invitrogen). Las células se incubaron en mezcla de transfección a 37°C durante 6 horas, y se cultivaron adicionalmente en DMEM libre de antibiótico. Para el análisis de transferencia Western en diversos intervalos de tiempo, las células transfectadas se recogieron, se lavaron dos veces con disolución salina amortiguada con fosfato (PBS, Invitrogen), se ultracongelaron en nitrógeno líquido, y se conservaron a -80°C para el análisis.

45 Se probaron tres ARNip contra una secuencia diana común en el exón 1, y se probaron cuatro ARNip para el polimorfismo de la posición 2886. El análisis de transferencia Western se llevó a cabo según lo siguiente. Las células tratadas con ARNip se recogieron como se describe anteriormente, y se lisaron en amortiguador de lisis informador enfriado en hielo (Promega) que contenía inhibidor de proteasas (completo, libre de EDTA, 1 comprimido/10 ml de amortiguador, Roche Molecular Biochemicals). Después de aclarar los lisados resultantes por centrifugación, la proteína en los lisados claros se cuantificó mediante el kit del ensayo de proteínas Dc (Bio-Rad). Las proteínas en 60 µg de lisado celular total se resolvieron mediante 10 % de SDS-PAGE, se transfirieron sobre una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF, Bio-Rad), y se inmunotransfirieron con anticuerpos contra CD80 (Santa Cruz). El contenido de proteína se visualizó con un kit de inmunotransferencia quimioluminiscente BM (Roche Molecular Biochemicals). Las transferencias se expusieron a película de rayos X (Kodak MR-1) durante diversos tiempos (30 s a 5 min). La Figura 6a representa los resultados del análisis Western. La tubulina sirvió de control de carga. Los datos se cuantifican y se normalizaron en la Figura 6b. De los ARNip probados, 2886-4, mostró reproduciblemente eficacia potenciada en células HeLa cultivadas (Figura 6). Este ARNip también mostró reproduciblemente eficacia *in vitro* potenciada (no mostrada). ARNip de GFP es un ARNip de control que no comparte homología de secuencia con ARNm de htt.

60 Asimismo, se pueden probar ARNip contra regiones polimórficas en el ARNm de htt en células transfectadas con ADNc de htt humano o en células transfectadas con constructos informadores de htt. Las cotransfecciones transitorias mediadas por Lipofectamine™ (Invitrogen) de los ADNc o plásmidos informadores y los ARNip se realizan como se describe *más arriba*. Para probar la capacidad de ARNip para dirigirse contra los constructos de htt informados, se usó iARN para inhibir la expresión de GFP-htt en líneas celulares HeLa humanas cultivadas. Brevemente, se transfectaron células HeLa con dúplex de ARNip de GFP-htt, que silencia la secuencia de ARNm de GFP-htt. Para

analizar los efectos de iARN contra GFP-htt, se prepararon lisados a partir de células tratadas con dúplex de ARNip en diversos momentos después de la transfección. Se llevaron a cabo experimentos de transferencia Western como se describe más arriba. Brevemente, se recogieron células HeLa en diversos momentos después de la transfección, su contenido de proteína se resolvió sobre 10 % de SDS-PAGE, se transfirió sobre membranas de PVDF, y se inmunotransfirió con anticuerpos apropiados. Los resultados de este estudio indicaron que el ARNip contra GFP puede eliminar la expresión de la expresión de GFP-htt en células HeLa transfectadas con el gen GFP-htt. Para estudios dirigidos contra htt exógenamente introducida, los procedimientos son como se describen, excepto que se usan anticuerpos anti-Htt para la inmunotransferencia.

También se puede usar iARN para inhibir la expresión de htt en células neuronales cultivadas. Las células ejemplares incluyen las líneas celulares PC12 (Scheitzer et al., Thompson et al.) y NT3293 (Tagle et al.) como se describe previamente. Células adicionales ejemplares incluyen células establemente transfectadas, por ejemplo células neuronales o células neuronalmente derivadas. Se pueden usar líneas celulares PC12 que expresan el exón 1 del gen huntingtina humana (Htt), aunque la expresión del exón 1 reduce la supervivencia celular. Las células GFP-Htt PC12 que tienen un gen GFP-htt inducible también se pueden usar para probar o validar la eficacia de ARNip.

Ejemplo III: Administración de ARNip de Htt en un entorno *in vivo*

Los modelos de ratones R6/2 (que expresan el producto de ADNc de htt de R6/2 humano) son un modelo animal aceptado para estudiar la eficacia de la administración de ARNip en un entorno *in vivo*. Se usaron ratones R6/2 genéticamente manipulados para probar la eficacia de ARNip en el extremo 5' de ARNm de huntingtina. Se inyectó ARNip de Htt en el cuerpo estriado de ratones R6/2 mediante una bomba Alzet. Los ratones se trataron durante 14 días con el sistema de administración de bomba ARNip/Alzet.

Los resultados de este estudio indicaron que los dos ratones que recibieron el ARNip con Trans-IT TKO (Mirus) como una disolución 20 o 200 nM a 0,25 µl/hora no mostraron deterioro de la alteración motora desde el día 67 hasta el día 74. En general, se espera que estos R6/2 tengan una reducción continuada en la varilla giratoria más allá del día 60.

Referencias

Aronin et al., *Neuron*, Nov; 15(5):1193-201 (1995)

Aronin et al., *Phil Trans Royal Society*, junio 29; 354 (1386):995-1003 (1999)

Bagella et al., *J. Cell. Physiol.* 177:206-213 (1998)

Brummelkamp et al., *Science* 296:550-553 (2002)

Calegari et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(22):14236-40 (2002)

Difiglia et al., *Science*, Sep 26;277(5334): 1990-3 (1997)

Elbashir et al., *Genes Dev* 15, 188-200 (2001a)

Haley et al., *Methods* 30, 330-336 (2003)

Hutvagner y Zamore, *Science* 297, 2056-2060 (2002)

Jacque et al., (2002)

Kremer *et al.*, (1994)

Laforet et al., *J. Neurosci.*, Dec 1;21(23):9112-23 (2001)

Lee et al., *EMBO J.* 21: 4663-4670.(2002)

Lewis et al., *Nature Genetics* 32:107-108 (2002)

Lin et al., (1993)

Liu et al., (1999)

McCaffrey et al., *Gene Ther.* 2002 Dic;9(23):1563 (2002)

McManus et al., *RNA* 8, 842-850 (2002)

- Miyagishi et al., Nature Biotechnol. 20:497-500 (2002)
- Nykänen et al., Cell 107, 309-321 (2001)
- 5 Paddison et al., Genes Dev 16, 948-958. (2002)
- Paul et al., Nat Biotechnol 20, 505-508 (2002)
- Scheitzer et al.
- 10 Sui et al., Proc Natl Acad Sci USA 99, 5515-5520 (2002)
- Tagle et al.
- 15 Thompson et al.
- Tuschl, T., Nat Biotechnol. 2002 May;20(5):446-8 (2002)
- Tuschl et al., Genes Dev 13, 3191-3197 (1999)
- 20 Xia et al., (2002)
- Yohrling G.J. et al., Mol Cell Neurosci. May;23(1):28-38 (2003)
- 25 Yu et al., Proc Natl Acad Sci U S A 99, 6047-6052 (2002)
- Zamore et al., Cell 101, 25-33 (2000)
- Zamore et al., Nature Medicine, volumen 9 número 3 págs. 266 - 267 (2003)
- 30 Zeng et al., (2002)

Equivalentes

- 35 Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más de experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas aquí. Tales equivalentes pretenden estar englobados por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cantidad eficaz de un agente de iARN para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de padecer una enfermedad caracterizada o causada por una proteína mutante de ganancia de función, en la que el agente de iARN es capaz de dirigirse contra un polimorfismo alélico dentro de un gen que codifica dicha proteína mutante de manera que se produzca una interferencia específica de secuencia de dicho gen, en la que la proteína mutante de ganancia de función es huntingtina, y la enfermedad es la enfermedad de Huntington, y en la que el agente de iARN es un precursor de ARN diseñado por ingeniería, o un constructo de expresión diseñado por ingeniería para expresar un precursor de ARN diseñado por ingeniería, y en la que la región polimórfica contra la que se dirige el agente de iARN es distinta de la mutación de la región CAG ampliada del gen.
- 10
2. El agente de iARN para uso según la reivindicación 1, en el que el agente de iARN se dirige contra un polimorfismo seleccionado del grupo que consiste en P1-P5 y P6-P43.
- 15 3. El agente de iARN para uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el agente de iARN es un constructo de expresión seleccionado de vectores retrovirales, casetes de expresión lineal, plásmidos, vectores virales, y vectores derivados de virus.
- 20 4. El agente de iARN para uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el constructo de expresión comprende un promotor de la ARN polimerasa II o un promotor de la ARN polimerasa III, opcionalmente en el que la secuencia del promotor de la ARN III es el promotor del ARNnp U6 o el promotor H1.
- 25 5. El agente de iARN para uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el agente de iARN está contenido en una célula hospedante.
- 30 6. El agente de iARN para uso según la reivindicación 5, en el que la célula hospedante es una célula de mamífero, opcionalmente una célula de mamífero no humana o una célula humana.
- 35 7. El agente de iARN para uso según las reivindicaciones 1-6, en el que el constructo de expresión expresa una cantidad eficaz de un precursor de ARN diseñado por ingeniería dirigido contra ARNm de Htt, de manera que se produce el silenciamiento de ARN de dicho ARNm, en el que el precursor de ARN diseñado por ingeniería comprende (i) una hebra no codificante que tiene suficiente complementariedad con el ARNm de Htt para dirigir la escisión específica de la diana o la represión traduccional del ARNm de Htt; y (ii) una hebra codificante que es sustancialmente complementaria a la hebra no codificante, de modo que las hebras codificante y no codificante sean capaces de hibridarse entre sí.
- 40 8. El agente de iARN para uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el agente de iARN comprende una primera hebra que comprende alrededor de 16-25 nucleótidos homólogos a una región del gen que comprende el polimorfismo, y una segunda hebra que comprende alrededor de 16-25 nucleótidos complementarios a la primera hebra.
9. El agente de iARN para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 7-8, en el que la primera hebra comprende una secuencia nucleotídica idéntica a la secuencia del polimorfismo.

1 TTGCTGTG AGGCAGAAC TCGGGGGCA GGGGGGGGT GTTCCTCTG CCAGCCATFG
 61 GCAGAGTCC GAGGTAGG CTGTCAATCA TGTGGCCGG CGTGGCCCG CCTCCGCCG
 121 CGGGCCCCG CTTCCGCCG GCACGCTCG GGACGCAAG CGCCGTTGG GCTGCCGGGA
 181 CGGTCCAAG ATGGACGGC GTCAGGTTT TCTTTTACC TCGGGCCAG AGCCCAATC
 241 ATGCCCCG TGTGAGGG CGCCGGAGT CGCCCGGAG CCTCCGGGA CTGCCGTGCC
 301 GGGGGGAGA CCGCC██████████ GACCCITGGA AAGCTGATGA AGCCCTTGA GTCCCTCAAG
 361 TCCYTCCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC ACCAGCAGC GCAGCAGCAG
 421 CAGCAGCAGC AACACCCGC ACCGCCGCC CGCCGGCCG CGCCTCTCA GCTTCTCTCAG
 481 CCGCCGCCG AGCAGCAGC GCTCTGCTT CAGCCGCAAG CGCCCGCCG GCGCCCGCCG
 541 CCGCCACC GCGCCGCTGT GGTGAGGAG CCGCTCCACC GACCAAGAA AGAACTTTCA
 601 GCTACCAAGA AAGACCGTGT GAATCATTT CTACAAATAT GTGAAACAT AGTGGCACAG
 661 TCTGTACAA ATTCICAGA ATTCAGAA CTCTGGCA TCGTATGGA ACTTTTCTG
 721 CTGTGCAGT ATGAGCAGA GTCAGATGC AGGATGTTG CTGACGAAATG CCTCAACAAA
 781 GTTATCAAAG CTTTGATGGA TTCTAATCTT CCAAGGTTAC AGCTCCAGCT CTATAAGGAA
 841 ATTAAAAGA ATGGGCCCC TCGGATTTT CGTGTGCC CTTGGAGTT TCTGAGCTG
 901 GCTCACCTG TCGGCCCTCA GAAATGCAG CCTTACCTGG TCAACCTCT GCGGTGCCCTG
 961 ACTCGAACAA GCAGAGACC CGAAGAAATCA GTCCAGGAGA CCTTGGCTGC AGCTGTCTCC
 1021 AAAATTATGG CTTCITTTGG CAATTTTGA AATGACAATG AAATTAAGGT TTTGTTAAG
 1081 GCCTTCATAG CGAACCTGAA GTCAAGCTCC CCCACCAATC GCGGCACAG GGTGATCA
 1141 GCAGTGAGCA TCTGCCACCA CTCAGAAGG ACACAATATT TCTATAGTTG GCTACTAAAT
 1201 GTGCTCTTAG GCTTACTCGT TCTGTCCAG GATGACACT CCACTCTGCT GATCTTGGC

FIG.1A

FIG.1B

1261 GEGCTGCTCA CCTGAGGTA TTTGGTECC TFGTGCAGC AGCAGGTCAA GGACACAAGC
1321 CTGAAAGGCA GCTTCGGAGT GACAAGBAAA GAAATGGAAG TCTTCCTTC TGCAGAGCAG
1381 CTTGTCCAGG TTTATGAACT GACGTTACAT CATACACAGC ACCAAGACCA CAATGTTGTG
1441 ACCGGAGCCC TGGAGCTGPT GCAGCAGCTC TTCAGAAAGC CTCACACCCGA GCTTCGCAA
1501 ACCCTGACC GAGTCGGGG CATTGGECAG CTCACGGCTG CTAAGGAGGA GTCTGGTGGC
1561 CGAAGCCGTA GTGGGAGTAT TGTGGAACCT ATAGCTGGAG GGGTTCCTC ATGCAGCCCT
1621 GTCCTTTCAA GAAAACAAAA AGECAAAGTG CTCTTAGSAG AAGAAGAAGC CTTGGAGGAT
1681 GACCTTGAAT CGAGATCGGA TGTACGAGC TCTGCCTTAA CAGCCTCAGT GAAAGGATGAG
1741 ATCAGTGGAG AGCTGGCTGC TTCTTCAGGG GTTCCACTC CAGGGTCAGC AGTTCATGAC
1801 ATCATFCACAG AACAGCCACG GTCACAGCAC ACACTGCAGG CCGACTCAGT GGAFTCTGGCC
1861 AGCTGTGACT TGACAAGCTC TGCCACTGAT GGGGATGAGG AGGATATCTT GAGCCACAGC
1921 FCCAGCCAGG TCAGGCCCGT CCCATCTGAC CCEGCCATGG ACCCTGAATGA TGGGACCCAG
1981 GCCTCGTCGC CCATCAGCGA CAGCTCCCAG ACCACCCACCG AAGGGCCTGA TTCAGCTGTT
2041 ACCCCTTCAG ACAGTTCGTA AATGTGTTA GACGGTACCG ACAACCAGTA TTTGGGCCGTG
2101 CABATTGGAC AGCCCCAGGA TGAAGATGAG GAAGCCACAG GTATTCTTCC TGATGAAGCC
2161 TCGGAGCCCT TCAGGAACTC TTCCATGGCC CTTCAACAGG CACATTTATT GAAAAACATG
2221 AGTCACTGCA GGCAGCCTC TGACAGCAGT GTTGATAAAT TTGIGTTGAG AGATGAAGCT
2281 ACTGAACCGG GTGATCAAGA AAACAAGCCT TGCCGCATCA AAGTGCAT TGGACAGTCC
2341 ACTGATGATG ACTCTGCACC TCTTGTCCAT TGTGTCCGCC TTTTATCTCC TTCGTTTTTG
2401 CTAACAGGG GAAAAAATGT GCTGGTCCG GACAGGGATG TGAGGGTCCG CGTGAAGGCC
2461 CTGGCCCTCA GCTGTSTGG AGCAGCTGTG GCCCTCCACC CCGAATCTT CTTCAGCAA

2521 CTCIATAAAG TTCCTCTTTGA CACCACGGAA TACCCTGAGG AACAGTATGT CTCAGACATC
 2581 TFGAACTACA TCGATCATGG AGACCCACAG GTPCGAGGAG CCACTGCCAT TCTCTGTGGG
 2641 ACCCTCATCT GCTCCAFCTT CAGCAGGTCC CGCTTCCACG TGGACATTTG GATGGCCACC
 2701 APTAGAACC TCACAGGAAA TACATTTCTT TTGGGGGATT GCATTCCTTT GCTGGCGAAA
 2761 ACACZGAAG ATGAGTCTTC TGTACTTGC AAGTTAGCTT GTACAGCTGT GAGGAAGTGT
 2821 GFCATGAGTC TCTGCCAGCAG CAGCTACAGT GAGTTAGGAC TGCAGCTGAT CATCGATGTG
 2881 CPGACTCTGA GGAACAGTTC CTATTTGGCTG CPGAGCACAG AGCTTCTGGA AACCTTTCCA
 2941 GAGATTTGACT TCAGGCTGGT GAGCTTTTTG GAGGCAAAAG CAGAAAACCT ACACAGAGGG
 3001 GCATCATCATT ATACAGGGCT TTAAAACTG CAAGAACCAG TGCTCAATAA TGTGTGATC
 3061 CATTGTCTTG GAGATGAAGA CCCCAGGGTG CGACATGTTG CCGCAGCATC ACTAATTAGG
 3121 CTGTGCCCAA AGCTGTTTTA TAAATGTGAC CAAGSACAAG CTGATCCAGT AGTGGCCGTG
 3181 GCAAGAGATC AAAGCAGTGT TTACCTGAAA CTCTCATGCG ATGAGACGCA GCCTCCATCT
 3241 CATTCTCTCG TCAGCACAAAT AACCCAGATA TATAGAGGCT ATAACCTACT ACCAAGCAATA
 3301 ACAGACGTCA CTATGGAAA TAACTTTCA AGAGTTATTG CAGCAGTTTC TCAATGACTA
 3361 ATCACATCAA CCACCAGAGC ACTCACATTT GGATGCTGTG AAGCTTTGTG TCTTCTTTCC
 3421 ACTGCCCTTC CAGTTTGCAT TTGGAGTTTA GGTGGCACT GTGGAGTSCC TCCACTGACT
 3481 GCCTCAGATG AGTCTAGGAA GAGCTGTACC GTTGGGATGG CCACAATGAT TCTGACCCCTG
 3541 CTCTCGTFCAG CTTGGTTCCC APTGGATCTC TCAGSCCATC AAGATGCTTT GATTTTGGCC
 3601 GGAAACTTGC TTGCAGCCAG TCTCCCAA TCTCTGAGAA GTTCATGSGC CTCTGAAGAA
 3661 GAAGCCAACC CAGCAGCCAC CAAGCAAGAG GAGGCTGGC CAGCCCTGGG GGACCGGCCC
 3721 CTGGTGGCCA TGGTGGAGCA GCTCTTCTCT CACCTGCTGA AGGTGATTA CATTGTGTCC

FIG.1C

3781 CACGTCCTGG ATGACGTGGC TCCEGGACCC GCAATAAAGG CAGCCTTGCC TTCTCTAACA
 3841 AACCCCCCTT CTCIAAGTCC CATCCGACGA AAGGGAAGG AGAAGAACC AGGAGAACA
 3901 GCATCTGTAC CGTTGAGTCC CAAGAAGGC AGTGAGGCCA GTGCAGCTTC TAGACAATCT
 3961 GATACCTCAG GTCCGTGTAC AACAAGTAA TCCTCATCAC TGGGAGTTE CTATCATCTT
 4021 CCTTCATACC TCANACTGCA TGATGTCCTG AAAGCTACAC ACGCTAACA CAAGGTCACG
 4081 CTGGATCTTC AGAACAGCAC GGAAGAAGTT GGAGGGTTTC TCCGCTCAGC CTTGGATGTT
 4141 CTTTCTCAGA TACTAGAGCT GCGCACACTG CAGGACATFG GGAAGTGTGT TGAAGAGATC
 4201 CTAGGATACC TGAATCTCTG CTTTAGTGA GAACCAATGA TGGCAACTGT TTGTGTTCAA
 4261 CAATTGTTGA AGACTCTCTT TGGCACAAAC TTGGCCTCCC AGTETGATGG CTTATCTTCC
 4321 AACCCACGA AGTCACAAGG CCGAGCACAG CCGCTTGGCT CCTCCAGTGT GAGCCACGGC
 4381 TTGTACCACT ACTGCTTCAT GCGCCCGTAC ACCCACTTCA CCCAGGCCCT CGCTGACGCC
 4441 AGCCTGAGGA ACATGTTGCA GCGGGAGCAG GAGAACGADA CCTCGGATG GTTTGATGTC
 4501 CTCCAGAAAG TGCTPACCCA GNTGAAGACA AACCTCACGA GGTTCACAAA GAACCGTSCA
 4561 GATAAGAATG CTATTCATAA TCACATTCGT TTGTTTGAAC CTCCTTGTAT AAAAGCTTTA
 4621 AACAGTACA CGACTACAAAC ATGTGTCCAG TTACAGAAGC AGTTTTAGA TTTGCTGGG
 4681 CAGCTGGTTC AGTTACGGGT TAATTACTGT CTTCTGGAT CAGATCAGGT GTTTATTTGGC
 4741 TTTGTATTGA AACAGTTTGA ATACATGAA GTGGGCCAGT TCAGGGAATC AGAGGCAATC
 4801 ATTCCAAACA TCTTTTCTT CTGTTTATA CTATCTTATG AACGCTATCA TTCAAAACAG
 4861 ATCATFGGA TTCCTAAAAT CATTCAGCTC TGTGATGGCA TCATGGCCAG TGGAAAGGAAG
 4921 GCTGTGACAC ATGCCATACC GGCTCTGCAG CCCATAGTCC ACGACCTCTT TGTATTAAGA
 4981 GGAACAATA AAGCTGATGC AGGAAAAGG CTGAAAACCC AAAAAGAGGT GGTGGTGTCA

5041 ATGTTACTGA GACTCATCCA GTACCATCAG GTGTTGGAGA TGTTCATTCT TGTCCCTGCCG
 5101 CAGTGCCACA AGGAGAAATGA AGACAAGTGG AAGGACTGT CFCGACAGAT AGCTGACATC
 5161 ATCCCTCCCAA TGTTAGCCAA ACAGCCAGATG CACATPACT CFCATGAAGC CCTTGGAGTG
 5221 TTAATAFACAT TATTGAGAT TTTGGCCCTT TCCTCCTCC GTCGGGTAGA CATGCTTTTA
 5281 CGGAGTATGT TCGTCACTCC AANACAATG GGGTCCGTGA GCACTGTTC AClGTGGATA
 5341 TCGGGAATTC TGGCCATTTT GAGGTTCTG APTTCCCAGT CAACTGAAGA TATTGTTCCT
 5401 TCTCGTATTC AGGAGCTCTC CTTCTCTCCG TATTAAATCT CCTGTACAGT AATTAATAGG
 5461 TTAAGAGATG GGGACAGTAC TTCACGGCTA GAAGAACACA GTGAAGGGAA ACAATAAAG
 5521 AATTYGCCAG AAGAAACATT TTCRAAGTIT CTATTACAC TGGTTGGTAT TCTTTTAGAA
 5581 GACATTTGTTA CAAAACAGCT GAAGGTGGAA ATCAGTGAGC AGCAACATAC TTTCTATTCC
 5641 CAGGAAC TAG GCACACTGCT AATGIGTCTG ATCCACATCT TCAAGTCTGG AATGTTCCGG
 5701 AGAATCACAG CAGCTGCCAC TASCCTGTTT CCGAGTGATG GCCTGTGGGG CAGTTTCTAC
 5761 ACCCTGGACA GCTTGAACTT GCGGGCTCGT TCCATGATCA CCACCCACCC GGCCTGGTG
 5821 CTGCTCTGGT GTCAGATACT GCTGCTTGT C AACCACACCG ACTACCGCTG GTGGCCAGAA
 5881 GTGCAGCAGA CCCCGAAAG ACACAGTCTG TCCAGCACAA AGTTACTTAG TCCCAGATG
 5941 TCTGGAGAAG AGGAGGATC TCACTTGGCA GCCAAACTTG GAATGTGCAA TAGAGAAATA
 6001 GTACGAAGAG GGGCTCTCAE TCTCTTCTGT GATTATGCTT GTCAGAACCT CCATGACTCC
 6061 GAGCACTHAA CGTGGCTCAE TGTAAATCAC ATTCAGATC TGAATAGCCT TTCCCACGAG
 6121 CCTCCAGTAC AGGACTTCAT CAGTSCCGTT CATCCGAACCT CTGCTGCCAG CGGCCCTCTC
 6181 ATCCAGGCAA TTCAGTCTCG TTGCGAAAC CTTTCAACTC CAACCACTGT GAAGAAACT
 6241 CTTCAGTCT TGGAGGGGAT CCACTCAGC CAGTCCGGAG CTGTGCTCAC GCTGTATGTG

FIG.1E

6301 GACAGGGCTTC TGTGCCACCCC TTTCCCGTGTG CTGGCTCGCA TGGTCGACAT CCTTGGCTTGT
6361 CGCCGGGTAG AATAGCTTCT GCGTGCRAAT TTACAGAGCA GCATSGCCCA GTTGGCAATG
6421 GAAGAACYCA ACAGAAATCCA GGAATACCTT CAGAGCACCG GGCTGGCTCA GAGACACCAA
6481 AGGCTCTATT CCTTGCCTGA CAGGTTTCTT CTCTCCACCA TCCAAGACTC ACTTAGTCCC
6541 TCTCCTCCAG TCTCTTCCCA CCCGCTGAC GGGGATGGC ACGTGTACAT GGAACACAGTG
6601 AGTCCGGACA AAGACTGGTA CGTTCATCTT GTCAAAATCCC AGTGTGGAC CAGGTCAGAT
6661 TCTGCACCTG TGAAGGTGC AGAGCTGGG AATCGGATTC CTGCTGAAGA TATGAATGCC
6721 TTCAATGATGA ACTCGGAGTT CAACCTAAGC CTGCTAGCTC CATGCTTAAG CCTAGGGATG
6781 AGTGAATTT CTGGTGGCCA GAAGAGTGCC CTTTTGAAG CAGCCCGTGA GGTCACTCTG
6841 GCCCGTGTGA GGGCACCGT GCAGCAGTC CCTGCTGTC ATCATGTCTT CCAGCCCGAG
6901 CTGCCCTCAG AGCCGGCGGC CTACTGGAGC AAGTTGAATG ATCTGTTTGG GGATGCTGCA
6961 CTGTATCAGT CCTTGGCCAC TCTGGCCCGG GCCCTGGCAC AGTACCTGGT GGTGGTCTCC
7021 AACTTGCCCA GTCATTTGCA CCTTCTCTCT GACAAGAGAG AGGACATTTT GAAATTTCTG
7081 GTGGCAACCC TTGAGGCCCT GTCCCTGGCAT TTGATCCATG ACCAGATCCC GCTGAGTCTG
7141 GATCTCCAGG CAGGGCTGGA CTGCTGCTGC CTGGCCCTGC AGCTGCCCTGG CCTCTCGAGC
7201 GTGGTCTCCT CCACAGAGTT TGTGACCCAC GCCTGTCTCC TCATCTACTG TGTGCACTTC
7261 ATCCTGGAGG CCGTTGCAGT GCAGCCTGGA GAGCAGCTTC TTAGTCCAGA AAGAAGGACA
7321 AATACCCCAA AAGCCATCAG CGAGGAGGAG GAGGAAGTAG ATCCAAACAC ACAGATCTT
7381 AAGTATATCA CTGCAGCTG TGAGATGGTG GCAGAAATGG TGGAGTCTCT GCAGTGGGIG
7441 TTGGCCTTGG GTCATAAAG GAATAGCGGC GTGCCGGCGT TTCTCACGCC ATTGCTCAGG
7501 AACATCATCA TCAGCCCTGCC CCGCCTGCC CTGTCAACA GCTACACAG TGTGCCCCCA

FIG.1F

7561 CTGGTGTGGA AGCTTGGATG GTCACCCAAA CCGGGAGGGG APTTTGGCAC AGCAATTCCTT
 7621 GAGATCCCCG TGGAGTTCCT CCAGGAAAAG GAAGTCTTTA AGGAGTTCAT CTACCGGCATC
 7681 AACACACTAG GCTGGACCAG TCGTACTCAG TTTGAAGAAA CTTGGGCCAC CCTCCCTTGGT
 7741 GTCCTGGTGA CGGAGCCCTT CGTGATGGAG CAGGAGGAGA GCCCACCCAGA AGAAGACACA
 7801 GAGAGGACCC AGATCAACGT CCTGGCCGTG CAGGCCATCA CCTCACTGGT GCTCAGTGCA
 7861 ATGACTGTGC CTGTGGCCGG CAACCCAGCT GTAAGCTGCT EGGAGCAGCA GCCCCGGAAC
 7921 AAGCCTCTGA AAGCTCTCGA CACCAGGTTT GGGAGGAAGC TGAGCAATTAT CAGAGGGATT
 7981 GTGGAGCAAG AGATTCAAGC AATGGTTTCA AAGAGACAGA ATATTGCCAC CCATCATTTA
 8041 TATCAGGCAT GGGATCCTGE CCTTCTCTG TCTCCGGCTA CTACAGGTGC CCTCATCAGC
 8101 CACGAGAAGC TGCTGCTACA GATCAACCC CAGCCGGAGC TGGGGAGCAT GAGCTACAAA
 8161 CTCGGCCAGG TGTCCATACA CTCCTGTGEG CTGGGGAACA GCATCACACC CCTGAGGGAG
 8221 GAGGAATGGG ACGAGGAAGA GGAGGAGGAG GCCGACGCC CTTGCACCTTC GTCACCCACC
 8281 ACGTCTCCAG TCAACTCCAG GAAACACCGG GCTGGAGTTG ACATCCACTC CTGTTCCGAG
 8341 TTTTGTCTG AGTTGATACAG CCGCTGGATC CTGCCGTCCA GCTCAGCCAG GAGGACCCCG
 8401 GCCATCCCTGA TCAGTGAGGT GGTGAGATCC CTTCTAGTGG TCTCAGACTT GTTCACCCGAG
 8461 CGCAACCAGT TTGAGCTGAT GTATGTGACG CTGACAGAAC TGGGAAGGT GCACCCCTCA
 8521 GAAGACGAGA TCCCTGGCTCA GTACCCTGGT CCTGCCACCT GCAAGGCAGC TGCCGTCTCTT
 8581 GGGATGGACA AGGCCCTGGC GGAGCCTGTC AGCCGCTGTC TGGAGAGCAC GCTCAGGAGC
 8641 AGCCACCTGC CCAGCAGGGT TGGAGCCCTG CACGGCCTCC TCTATGTGCT GGAGTCCGAC
 8701 CTGCTGGACG ACACCTGCCAA GCACCTCATC CCGGTGATCA CGGACTATCT CCTCTCCAAC
 8761 CTGAAAGGGA TCGCCCACTG CGTGAACATT CACAGCCAGC AGCACGTACT GGTCAATGTGT

FIG.1G

8821 GCCACTGCCGT TTTACTCTCAT TGAGAACTAT CCTCTGGACG TAGGGCCGGA ATTTTCAGCA
8881 TCAATAATAC AGATGTGTGG GGTGATGCTG TCTGGAAGTG AGGAGTCCAC CCCCCTCCATC
8941 ATTACCCTACT GTGCCCTCAG AGCCCTGGAG CGCCTCCTCC TCTCTGAGCA GCTCTCCCGC
9001 CTGGATGCAG AATCGCTGGT CAAGCTGAGT GTGGACAGAG TGAACGTGCA CAGCCCGCAC
9061 CGGGCCATGG CGGCTCTGGG CCTGATGCTC ACCTGCATGT ACACAGGAAA GGAGAAAGTC
9121 AGTCCGGGTA GAACATCAGA CCTAATCCF GCAGCCCCG ACAGCGAGTC AGTGAATGTT
9181 GCTATGGAGC GGGTATCTGT TCTTTTGTAT AGGATCAGGA AAGGCTTTC TTTGTAAGCC
9241 AGAETGGTGG CCAGGATCCT GCCCCAGTTC CTAGACGACT TCTTCCCACC CCAGGACATC
9301 ATGRACAAG TCATCGGAGA GTTCTGTCC AACACGACGC CATACCCCCA GTTCATGGCC
9361 ACCGTGGTGT ATAAGTGTT TCAGACTCTG CACAGCACCG GGCAGTCTGC CATGGTCCGG
9421 GACTGGGTC A TGTGTCCCT CTCCTAATCTC ACCCAGAGG CCCCCTCC CATGGCCACG
9481 TCGAGCCTCT CCTGCTTCTT TGTACGGCG TCCACCAGCC CGTGGTCCG GCGGATCCTC
9541 CCACATGTCA TCAGCAGGAT GGGCAAGCTG GAGCGGTGG ACGTGAACCT TTTCTGCTG
9601 GTCGCCACAG ACTTCTACAG ACACCAGATA GAGGAGGAGC TCGACCCGAG GGCCTTCCAG
9661 TCTGTGCTTG AGGTGGTTGC ACCCCACAGA AGCCCATATC ACCGGCTGCT GACTTGTTA
9721 CGAATGTCC ACAAGTCCAC CACTGC ██████████ GCGCCATGGT GGGAGAGACT GTGAGGCGGC
9781 AGCTGGGCC GGAGCCTTTG GAAGTCTGTG CCTTGTGCC CTGCTCCAC CGAGCCAGCT
9841 TGTCTCCCTAT GGGCTTCCG ACATGCCCGG GCGGGCCAGG CAACGTGCGT GCTCTGCCA
9901 TGTGGCAGAA GTGCTCTTTG TGGCAGTGC CAGGCAGGA GTGCTGAG TCTTGTGGG
9961 GCTGAGCCTG AGGCCTTCCA GAAAGCAGGA GCAGCTGTSC TCCACCCCAT GTGGGTGACC
10021 AGGTCCTTC TCCTGATAGT CACCTGCTGG TTGTTGCCAG GTTCAGCTG CTCTTGCATC

FIG.1H

10081 TGGGCCAGAA GTCCCTCCCTC CTGCAGGCTG GCTGTGGCC CCTCTCTCTGT CCTGCAGTAG
 10141 AAGGTGCCGT GAGCAGGCTT TGGGAACACT GGCCTGGGTC TCCCTGGTGG GGTGTGCATG
 10201 CCACGCCCCG TGTCTGGATG CACAGATGCC ATGGCCCTGTG CTGGGCCAGT GCCTGGGGGT
 10261 GCTAGACACC CGGCACCAAT CTCCTTCTC TCTTTCTTC TCRGGATTA AATTTAATT
 10321 ATATCAGTAA AGAGATTAAT TTTAACGAAC TCTTTCTATG CCCGTGTAAA GTAATGTAAT
 10381 CGCAAGGCTT GTGCTGCATG CGACAGCCTC CGGGTGGTG GACAGGGCC CCGGCCACGC
 10441 TCCCTCTCCT GTAGCCACTG GCATAGCCCT CCTGAGCACC CGCTGACATT TCCCTTGTAC
 10501 ATGTTCTCTG TTATGCATT CACAAGTGC ACAGGTCAC TGGGATGTAG AGAGCCGTTA GTGGCCAGGT
 10561 GCCACAGCA GGAATGAGG CAGCCCCCA TTATCCTAGG GGTGGCTCA ACTGCAGCCC
 10621 CTCCTCCTCG GGCACAGAG ACTGTCTTC TCCACCCACC AGTCAGGGAC AGCAGCCTCC
 10681 CTGTCACTCA GCTGAGAAG CCAGCCCTCC CTGGCTGTGA GCAGCCTCCA CTGHTGCCAG
 10741 AGACAATGGC CTCCCCTCC TSTCTCTGC TAGCCCTGGG GTGGCGTCTG CCTAGGAGCT
 10801 GCCTGGCAGG TGTGGGACC TGCTGCTCCA TGGATGCATG CCTAAGAGT GTCACTGAGC
 10861 TGTGTTTGT CTGAGCCTCT CTCGGTCAAC AGCAAGCCTT GGTGCTTGG CACTGTTAGT
 10921 GACAGAGCCC AGCATCCCTT CTGCCCCCGT TCCAGCTGAC ATCTTGCAGG GTGACCCCTT
 10981 TTAGTCAGGA GAGTCAGAT CTGTCTCAT CCGAGACTGC CCCACGGCCC TSTCAGAGCC
 11041 GCCACTCCTA TCCCCAGGAC AGGTCCCTGG ACCAGCCTCC TGTGTGCAGG CCCAGAGGAG
 11101 CCAAGTCATT AAAATGGAAG TGGATCTGG ATGCCCGGC TCTGTCTCAT GTASGAGCTG
 11161 GATTTGGGAG CTCCTCTTGC CGACTGGCTG TGAGACGAGG CAGGGGCTCT GCTTCTCCTCAG
 11221 CCTPAGAGC GAGCCAGGCA AGGTTGGCGA CTGTCAATG CTTGGTTG GTCATCCCCG
 11281 TCGATGTTTT GGGTATTGAA TGTGGTAAGT GGAGGAAATG TTGGAACCTCT GTGCAGGTGC

FIG.11

11341 TGCCTTGAGA CCCCCAAGCT TCCACCTGTC CCTCTCCTAT GTGECAGCTG GGGAGCAGCT
 11401 GAGATGTGGA CTGTGATGCT GCCACATAC GTGAGGSGGA GCTGAAAGG AGCCCCGTGCT
 11461 CAAAGGGAGC CCTCTCTG AGCAGCCTCT GCCAGGCCCTG FATGAGGCTT TTCCCACCAG
 11521 CTCCCAACAG AGGCTCCTCC CAGCCAGGAC CACCTGCTCC TCGTGGCGG GCAGCAGGAG
 11581 CGGTAGAAAG GGTCCGATG TTTGAGGAGG CCTTAAGGG AAGCTACTGA ATTATAACAC
 11641 GTAAGAAAAT CACCATTCCT CCGTATGGT FGGGGCTCC TGTTCCTCAT CCTAGCTTTT
 11701 TCCTGGAAA GCCCGCTAGA AGGTTGGGA ACCAGGGGAA AGTCTCAGA ACTGTGCTG
 11761 CTCCCACCC GCTCCCGCC TCCCCTGAG GTTATGTCAG CAGCTCTGAG ACAGCAGTAT
 11821 CACAGGCCAG ATGTTGTTCC TGGCTAGAG TTTACATTTG TAAGAAATAA CACTGTGAAAT
 11881 GTAAAACAGA GCCATTCCT TGGATGCAAT AUCGCTGGC TCAACATAGA GTTTGCTCTC
 11941 CTCCTGTTA CGACGGTATC TAAACCAGTC CTTAGCAAGG GGCTCAGAAC ACCCCGCTCT
 12001 GGCAGTAGGT GTCCCCACC CCCAAGACC TGCCTGPTG CTCGGGAGAT GAATATGAGC
 12061 TCATTAGTAA AATGACTTC ACCCACCCT ATACATAAAG TATCCATCCA TGTGCCATATA
 12121 GACACATCTA TAATTTACA CACACACCTC TCAAGACCGA GATGCATGGC CTCTAAGAGT
 12181 GCCCGTGTG GTTCTTCTG GAAGTTGACT TTCCTTAGAC CCGCCAGGTC AAGTTAGCCC
 12241 CGTGACGGAC ATCCAGGCT GGGACGTGGT CAGGGCAGGG CTCAATCAAT GCCCAGTAGG
 12301 ATCCCACCTG CGAAGATGGT CTCCATATCA GCTCTCTCCA GAAGGGAGGA AGACTTTATC
 12361 ATGTTCCCTAA AATCTCTGG CAAGCACCCA TCGTATATC CAAATTTGT TGCAAAATGTG
 12421 ATTAATTTGG TTGTCAAGTT TTGGGGGTGG GCTGTGGGGA GATGCTTTT GTTTTCCCTGC
 12481 TGGTAATATC GGGAAAGATT TTAATCAAA CACGGTAGAA TTGTTTGGCA ATGCACGTGAA
 12541 GCGTGTCTTCT TTCCCAAAAT GTGCCCTCCCT FCCGGTGGG GCCCAGCTGA GTCTATGTAG

FIG.1J

12601 GTGATGTTTC CAGCTGCCAA GTGCTCTTTG TFACTGTCCA CCTCAATTTC TGCCAGCGCA
12661 TGTGTCTCTT CAAGGGGAAA ATGTGAAGCT GAACCCCTTC CAGACACCCA GAATGTAGCA
12721 TCTGAGAAGG CCCTGTGCCC TAAAGGACAC CCCTCGCCCC CATCTTCATG GAGGGGGTCA
12781 TPTCAGAGCC CTCGSAGCCA ATGAACAGCT CCTCCTCTTG GAGCTGAGAT GAGCCCCACG
12841 TGGAGCTCGG GACGGATAGT AGACAGCAAT AACTCGGTGT GTGCCCCCTT GGCAGGTGGA
12901 ACTTCCCTCC GTTGGGGGGT GGAGTGAGGY TAGTCTGTG TGTCTGGTG GTGGAGTCAG
12961 GCTTCTCTTG CTACCTGTGA GCATCCTTCC CAGCAGACAT CCTCATGGG CTTTGTCCCT
13021 CCCCCGCTTC CTCCCCTGTC GGGGAGGACC CGGGACCACA GCTGCTGGCC AGGTTAGACT
13081 TGGAGCTGTC CTCACAGGG GTCACGTGTA GGAGTGAGAA GAAGGAAGAT CTTGAGAGCT
13141 GCTGAGGGAC CTTGGAGAGC TCAGGATGGC TCAGACGAGG ACACTCGCTT GCCGGGCCCTG
13201 GCCCTCCTGG GAAGGAGGA GCTGCTCAGA ATGCCGCAAG ACAACTGAAG GCAACCTGGA
13261 AGGTCAGGG CCCGCTCTTC CCCCATGTGC CTGTCACGCT CTGGTGCAGT CAAAGGAACG
13321 CCTTCCCCTC AGTTGTTTCT AAGAGCACAG TCTCCCCTG CAATCTGGGT GGTAACTGCC
13381 AGCCTTGGAG GATCGTGGC AACGTGGACC TGCCPACGGA GCGTGGGCTC TGACCCAACT
13441 GGGGCTCCT TGCCCAGGTC TCACTGCTTT GCACCGTGGT CAGAGGGACT GTCAGCTGAG
13501 CTTGAGCTCC CCTGGAGCCA GCAGGGCTGT GATGGGCGAG TCCCGGAGCC CCACCCASAC
13561 CTGAATGCTT CTGAGAGCAA AGGGAAGGAC TGACGAGAGA TGTATATTTA ATTTTTTAAC
13621 TCTGCAAAAC AATTGATATC CAAATTAAG GGAAAATATG GAAACCATCA AT

FIG.1K

1 matleklnka feelkksfqqq qqqqqqqqqq qqqqqqqqqq fppppppppp pqlppppppqa
61 qpllpqpqp pppppppppp avaeephrp kkselsatkkd rvnhcltice nivaqsvrns
121 pefqkllgia mefllicsdd aedvrvnvað eclnkvikal mdsnlprlql elykeikknq
181 aprslraalw rfaelahlyr pqkcrpylvn llpclrtrsk rpeesvgetl aaavpkimas
241 fgnfandnei kvllkafian lkssstirr taagsavsic qhsrrtqyfy swllnvlgl
301 lypvedehst llilgvlltl rylvpllqqq vkdtslkgsf gvtrkemevs psaeqlvqvvy
361 eltlhhtqh dhvvtgale llqqlfrtpp pellqtlitav ggigqltaak eesggrsrsg
421 siveiliagg sscspvlark qgkvllgee eaieddeesr sdvsssaita svkdeisgel
481 aassgvstpg saghdiliteq prsqhtlqad svdlascdlt ssatdgdeed ilshsssqvs
541 avpsdpamd1 ndgtqasspi sdssqttteg pdsavtppsds seivldgtdn qyiglgigqp
601 qdedeeatgi lpdeaseafr nsmalqqah llknmshcrq psdssvdkfv lrdeatepgd
661 genkpcrirk digqtdde aplvncvrl1 sasflitgk nvlvprdrvr vsvkalalasc
721 vgaavalhpe sffsklykvp ldtteypee qvsvdlinyid hgdpqvrqat aillcgtllcs
781 ilsrerfhw dwmgtirtlt gntfsladci pllrkttlkde ssvtcklact avrncvmslc
841 sssyse19lq liidvltlzn sswlvrtel letlaeaidfr lvsfleakae nlhrqahhyt
901 glkkgervl nnvvihlld edprvrhvae aslirlvqkl fykcdgggad pvvavardqs
961 svylkilmhe tqppshfsvs titriyrgyn llpsitdvtm ennlsvrviaa vshelittstt
1021 raltfgoccea lcllstafov ciwslgwhcg vpllsasdes rksctvgmat militllssaw
1081 fpldlsahqd allagnlla asapkslrss waseeeanpa atkqeevwpal lgdralvpmv
1141 eglfshllkv inicahvldd vapgpaikaa lpsltnppsl spirrkqkek epgeqasvpl
1201 spkkqseasa asrqdtegp vbtkseselg sfyhlpsylk lndvltkatha nykvtldlqn
1261 stekfggflr saldvisgil elatlddigm cveeilgylk scfsrepmma tvcvqqlkt
1321 lfgtnlasqf dglssnpsks qgradr1gss svrpglyhyc fmaptyhftq aladaslrnm
1381 vgaegendts gwfdv1qkvs tqiktntlsv tknradkna1 hnhirilfepl vikalkqytt
1441 ttcvqlqkv ldl1aqlvq1 rvnyc1ldsd qvfigfvlkq feylevgqfr esealipnif
1501 fflvllsyer yhskqilgip ki1q1cdgim asgrkavtha ipalqpivhð lfvirgtuka
1561 dagkeletqk evvsmllz1 iqyhqvlcmf ilvlqccchke nedkwkrlsr q1ad1ilpml
1621 akqgmhidsh ealgvintlf eilapsslrip vdmllrsmfv tpntmasvat vq1wisgila
1681 ilrvlisqst edivleriqe lsfstylisc tvinrlrdgd ststleehse gkqiknlpee

1741 tferfllqlv gilledivtk qlkvemseqq htfcycqelgt llmclihifk sgmfrritaa
1801 atrlfrsdgc ggsfytlldsl nlrarsmitt hpalvllwqq illlvnhtdy rwwaevqgtp
1861 krhslsstkl lspqmsgeee dsdlaaklgn cnreivrrga lllfcdyvcq nhdsehltw
1921 livnhlqdl i slshheppvqd fisavhrnsa asglfqaig srcenlstpt mlkktlqcle
1981 gihlsqsgav ltlyvdrllic tpfzrlarmv dilacrrvem llaanlqssm aqlpmeelnr
2041 iqeylqssgl aqrhqrlysl ldrfrlstmq dsllspsppvs shpldgdghv sletvspdkd
2101 wyvhlvksqc wtrsdalle gaelynrripa edmnafmuns efnsl llapc lslgnseisg
2161 gqksalfcaa revtlarvsg tvqqlpavhh vfqpelpaep aaywskindl fgdaailyqsl
2221 ptlaralagy lvvsklpsh lhlppeked ivkfvvatle alswhliheq iplsldlqag
2281 ldccclalql pglwsvvsst efvthacsli ycvhfileav avqgqqls perrtntpka
2341 iseeeeevdp ntqnpkyita acemvaemve slqsvlalg h krnsgvpaf l tp llrnlilis
2401 larlpvnsy trvpplvwkl gwsppggdf gtafpeipve flqkevfke ftyrintlwg
2461 tsrtqfeetw atllgvlvtq plvmeqeesp peedtertqi nvlavqaits l vlsamtvpv
2521 agnpavscle gqprnkplka ldtrfgrkls iirgiveqei qamvskreni athhlyqawd
2581 pvpslspatt galishekli lqinperelg smsyklgqvs ihsvwlgnsl tplreeewde
2641 eeeeeadapa psspptspvn sxkhragvdi hscsqfilel ysrwilpsss arrtपालis
2701 evvrsllvvs dlfterngfe lmyvtltele rvhpsedeil aqylvpatck aaavlgmdka
2761 vaepvsrllle stlrsshps rvgalhgvlly vlecdlldte akqlipvisd yllsnlkgia
2821 hvvnhesqgh vlvmcatafy lienypldv g pefsasiqm cgvmisgsee stpsliyhca
2881 lrglerllls eglerldaes lvklsvdrvn vhsphramaa lglmitcmyt gkekvspgrr
2941 sdpnpaapds esvivamery svlfdriirk g fpcearvvar ilpqflddff ppqdimnkvi
3001 geflsmqppy pqfmatvvyk vfgtllhstgg ssaavrdwvml slsftqrap vamatwslsc
3061 ffvssastspw vaailphvis rmgkleqvdv nlfclvatdf yrhgieeeld rrafqsvlev
3121 vaaggspyhr lltcitrnvhk vtcc

FIG. 2B

FIG. 3

diana codificante de *htf*: 5' -...ugcagcugaucaucgauugcugaccugaggaacaguc...3'
diana no codificante de *htf*: 3' -...acguogacuagnagcuacacgacugggacuccuugcaag...5'

FIG. 4

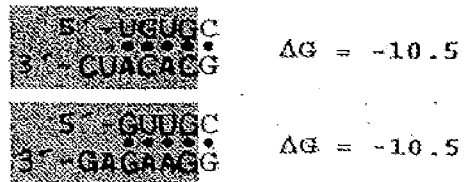


FIG. 5A

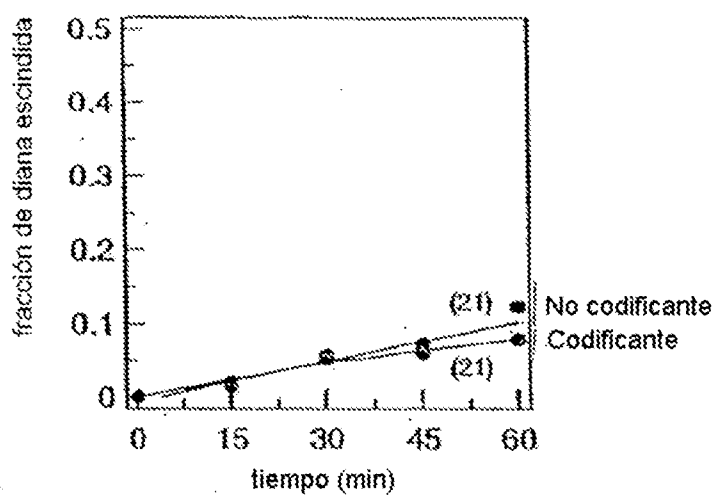
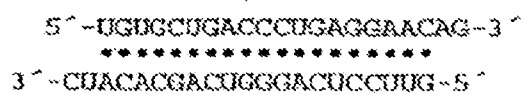


FIG. 5B

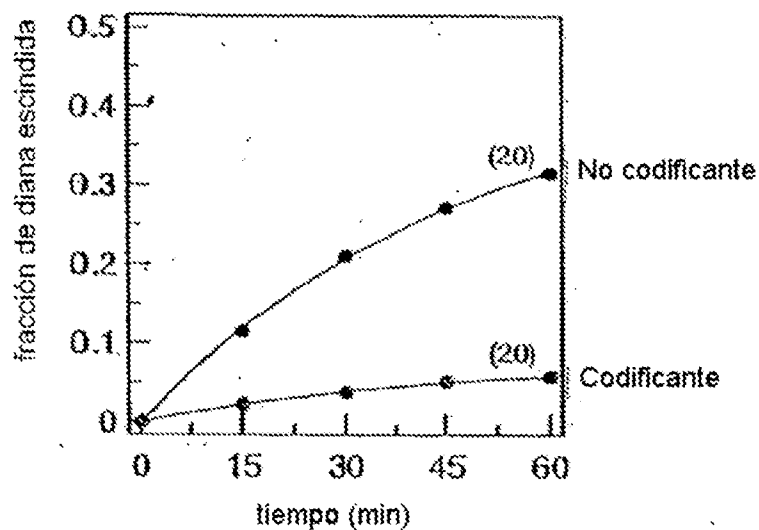
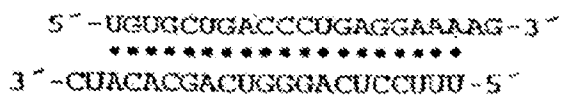


FIG. 5C

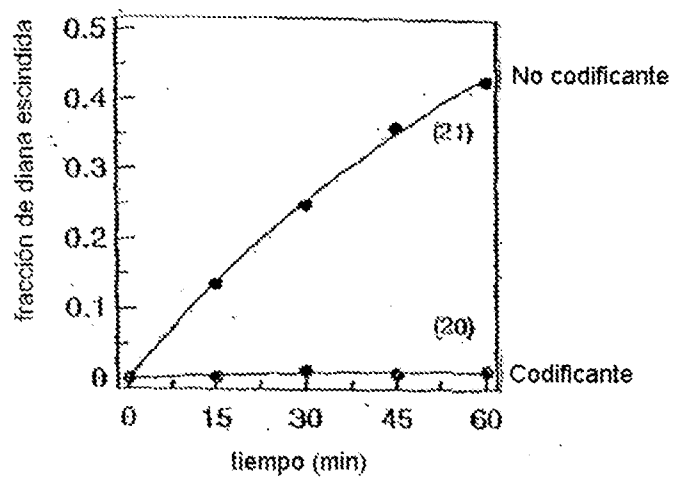
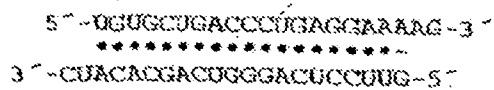
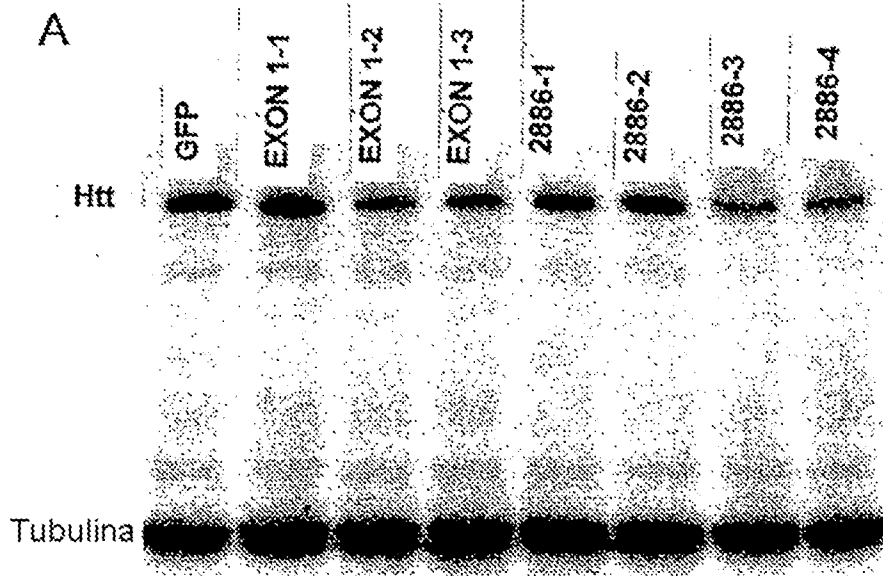


FIG. 6



B

