



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0117341-3 B1

(22) Data do Depósito: 30/03/2001

(45) Data de Concessão: 21/06/2016



(54) Título: MÉTODO PARA AVALIAR UM AGENTE AGINDO EM UM PRODUTO DE GENE, MÉTODO PARA AVALIAR SE UM PRODUTO DE GENE É UM ALVO ADEQUADO PARA DESCOBERTA DE DROGAS E MÉTODO PARA AVALIAR SE UM PRODUTO DE GENE É UM ALVO ADEQUADO PARA AVALIAR A HABILIDADE DE UM AGENTE AGIR NO PRODUTO DE GENE

(51) Int.Cl.: C12Q 1/68

(30) Prioridade Unionista: 01/12/2000 EP 0012325.0, 30/03/2000 US 60/193,594, 31/01/2001 US 60/265,232

(73) Titular(es): WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH. MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FORDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.. MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY. UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS MEDICAL CENTER

(72) Inventor(es): THOMAS TUSCHL, PHILLIP A. SHARP, PHILLIP D. ZAMORE, DAVID P. BARTEL

"MÉTODO PARA AVALIAR UM AGENTE AGINDO EM UM PRODUTO DE GENE, MÉTODO PARA AVALIAR SE UM PRODUTO DE GENE É UM ALVO ADEQUADO PARA DESCOBERTA DE DROGAS E MÉTODO PARA AVALIAR SE UM PRODUTO DE GENE É UM ALVO ADEQUADO PARA AVALIAR A HABILIDADE DE UM AGENTE AGIR NO PRODUTO DE GENE"

"Dividido do PI0107536-5, depositado em 30/03/2001"

Antecedentes da invenção

[0001] Interferência de RNA ou "RNAi" é um termo inicialmente criado por Fire e parceiros para descrever a observação de que o RNA de fita dupla (dsRNA) pode bloquear a expressão de gene quando ele é introduzido em vermes (Fire e outros (1998) Nature 391, 806-811). O dsRNA dirige o silenciamento pós-transcricional, específico para o gene em muitos organismos, incluindo vertebrados, e tem provido uma nova ferramenta para estudar a função do gene. RNAi envolve a degradação de mRNA, mas muitos dos mecanismos bioquímicos por trás desta interferência são desconhecidos. A recapitulação dos aspectos essenciais de RNAi *in vitro* é necessária para uma análise bioquímica do fenômeno.

Sumário da invenção

[0002] É descrita aqui a interferência mediada por dsRNA, específica para gene, em um sistema sem células derivado do blastoderma sincicial de embriões de *Drosophila*. O sistema *in vitro* complementa soluções genéticas para dissecar a base molecular de RNAi. Como descrito aqui, os mecanismos moleculares sujeitos a RNAi foram examinados usando o sistema *in vitro* de *Drosophila*. Os resultados mostraram que RNAi é ainda dependente de ATP que desacoplada da tradução de mRNA. Isto é, síntese de proteína não é requerida para RNA *in vitro*. Na reação de RNAi, ambas as fitas (no sentido e anti-

sentido) do dsRNA são processadas em pequenos fragmentos ou segmentos de RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos (nt) de comprimento (RNAs com mobilidade em géis de sequenciamento que correspondem aos marcadores que têm 21-23 nt de comprimento, opcionalmente referidos como RNA de 21-23 nt). O processamento do dsRNA para os pequenos fragmentos de RNA não requer o mRNA alvo, o que demonstra que a espécie de RNA pequeno é gerada pelo processamento do dsRNA e não como um produto de degradação de mRNA alvo para dsRNA. O mRNA é clivado somente dentro da região de identidade com o dsRNA. A clivagem ocorre em sítios 21-23 nucleotídeos aparte, o mesmo intervalo observado para o próprio dsRNA, sugerindo que os fragmentos de 21-23 nucleotídeos do dsRNA estão guiando a clivagem de mRNA. Aqueles RNAs de 21-23 nt purificados que medeiam a RNAi confirmam que estes fragmentos estão guiando a clivagem de mRNA.

[0003] Consequentemente, a presente invenção relaciona-se com moléculas de RNA isoladas (fita dupla; fita simples) de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos que medeiam RNAi. Isto é, os RNAs isolados da presente invenção medeiam a degradação de mRNA de um gene ao qual o mRNA corresponde (medeiam degradação de mRNA que é o produto de transcrição do gene, que também é referido como um gene alvo). Para conveniência, tal mRNA também é referido aqui como mRNA a ser degradado. Como usado aqui, os termos RNA, molécula(s) de RNA, segmento(s) de RNA e fragmento(s) de RNA são usados intercaladamente para se referir a RNA que medeia a interferência do RNA. Estes termos incluem RNA de fita dupla, RNA de fita simples, RNA isolado (RNA parcialmente purificado, RNA essencialmente puro, RNA sintético, RNA

produzido recombinantemente), bem como RNA alterado que difere de RNA de ocorrência natural pela adição, deleção, substituição e/ou alteração de um ou mais nucleotídeos. Tais alterações podem incluir a adição de material não de nucleotídeo, tal como a(s) extremidade(s) do RNA de 21-23 nt ou internamente (em um ou mais nucleotídeos do RNA). Nucleotídeos nas moléculas de RNA da presente invenção também podem compreender nucleotídeos não padrões, incluindo nucleotídeos ou deoxiribonucleotídeos de ocorrência não natural. Coletivamente, todos tais RNAs alterados são referidos como análogos ou análogos de RNA de ocorrência natural. O RNA de 21-23 nucleotídeos da presente invenção necessita somente ser suficientemente similar ao RNA natural que tenha a capacidade para mediar (que medeia) RNAi. Como usado aqui a frase "que medeia RNAi" refere-se a (indicação) da capacidade para distinguir quais RNAs devem ser degradados pelo maquinário ou processo de RNAi. O RNA que medeia RNAi interage com o maquinário de RNAi de modo a dirigir o maquinário para degradar mRNAs particulares. Em uma configuração, a presente invenção relaciona-se com moléculas de RNA de cerca de 21 a 23 nucleotídeos que dirigem a clivagem de mRNA específico ao qual sua sequência corresponde. Não é necessário que haja perfeita correspondência das seqüências, mas a correspondência deve ser suficiente para permitir o RNA dirigir a clivagem de RNAi do mRNA alvo. Em uma configuração particular, as moléculas de RNA de 21-23 nt da presente invenção compreendem um grupo hidroxila em 3'.

[0004] A presente invenção também se relaciona com métodos para produzir moléculas de RNA de cerca de 21 a cerca de 23

nucleotídeos com a capacidade para mediar a clivagem de RNAi. Em uma configuração, o sistema *Drosophila in vitro* é usado. Nesta configuração, dsRNA é combinado com um extrato solúvel derivado de embriões de *Drosophila*, produzindo assim uma combinação. A combinação é mantida sob condições nas quais o dsRNA é processado em moléculas de RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos. Em uma outra configuração, o sistema de *Drosophila in vitro* é usado para obter seqüências de RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos as quais medeiam a interferência de RNA do mRNA de um gene particular (p. e., oncogene, gene viral). Nesta configuração, RNA de fita dupla que corresponde a uma seqüência a ser alvejada é combinado com um extrato solúvel derivado de embriões de *Drosophila*, produzindo assim uma combinação. A combinação é mantida sob condições nas quais o RNA de fita dupla é processado em RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos de comprimento. Como mostrado aqui, RNA de 21-23 nt medeia RNAi do mRNA do gene alvo (o gene cujo mRNA deve ser degradado). O método para obter RNAs de 21-23 nt usando o sistema de *Drosophila in vitro* pode adicionalmente compreender isolar a seqüência de RNA da combinação.

[0005] A presente invenção também se relaciona com RNA de 21-23 nt produzido pelos métodos da presente invenção, bem como a RNAs de 21-23 nt produzidos por outros métodos, tais como síntese química ou técnicas de DNA recombinante, que tenham a mesma ou substancialmente as mesmas seqüências que as do RNAs de ocorrência natural que medeiam RNAi, tal como aqueles produzidos pelos métodos da presente invenção. Todos estes são referidos como RNAs de 21-23 nt que medeiam a interferência do RNA. Como usado aqui, o termo RNA isolado

inclui RNA obtido por quaisquer meios, incluindo processamento ou clivagem de dsRNA como descrito aqui; produção por métodos sintéticos químicos; e produção por técnicas de DNA recombinante. A invenção adicionalmente também se refere aos usos dos RNAs de 21-23 nt, tal como para tratamento terapêutico ou profilático e composições compreendendo RNAs de 21-23 nt que medeiam RNAi, tais como composições farmacêuticas compreendendo RNAs de 21-23 nt e um portador apropriado (p. e., um tampão ou água).

[0006] A presente invenção também refere-se a um método para mediar interferência de RNA do mRNA de um gene em uma célula ou organismo (p. e., mamífero tal como um camundongo ou um humano). Em uma configuração, RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nt que alveja o mRNA a ser degradado é introduzido dentro da célula ou organismo. A célula ou organismo é mantida sob condições nas quais a degradação do mRNA ocorre, mediando assim interferência do RNA do mRNA do gene na célula ou organismo. A célula ou organismo pode ser uma na qual RNAi ocorra à medida que a célula ou organismo é obtido ou uma célula ou organismo pode ser um que tenha sido modificado tal que RNAi ocorra (p. e., por adição de componentes obtidos a partir de uma célula ou de um extrato de célula que medeia RNAi ou a ativação de componentes endógenos). Como usado aqui, o termo "célula ou organismo no qual RNAi ocorre" inclui tanto uma célula quanto um organismo no qual RNAi ocorre à medida que a célula ou organismo é obtido, ou uma célula ou organismo que tenha sido modificado de modo que a RNAi ocorra. Em uma outra configuração, o método para mediar a interferência de RNA de um gene, em uma célula, compreende combinar RNA de fita dupla que corresponda

a uma seqüência do gene com um extrato solúvel derivado de embriões de *Drosophila*, produzindo assim uma combinação. A combinação é mantida sob condições nas quais o RNA de fita dupla é processado em RNAs de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos. O RNA de 21 a 23 nt é então isolado e introduzido dentro da célula ou do organismo. A célula ou organismo é mantido sob condições nas quais a degradação do mRNA do gene ocorra, mediando, assim, a interferência do RNA do gene na célula ou no organismo. Como descrito para a configuração anterior, a célula ou organismo é uma no qual RNAi ocorra naturalmente (na célula ou organismo como obtido) ou tenha sido modificado de tal maneira que RNAi ocorra. Os RNAs de 21 a 23 nt também podem ser produzidos por outros métodos, tais como métodos sintéticos químicos ou técnicas de DNA recombinante.

[0007] A presente invenção também se relaciona com componentes bioquímicos de uma célula, tal como uma célula de *Drosophila*, que processa dsRNA em RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos. Em adição, componentes bioquímicos de uma célula que estão envolvidos na mira de mRNA por RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos são o objeto da presente invenção. Em ambas configurações, os componentes bioquímicos podem ser obtidos de uma célula na qual eles ocorrem ou podem ser produzidos por outros métodos, tais como síntese química ou métodos de DNA recombinante. Como usado aqui, o termo "isolado" inclui materiais (p. e., componentes bioquímicos, RNA) obtidos de uma fonte na qual eles ocorrem e materiais produzidos por métodos tais como síntese química ou métodos de ácido nucleico recombinante (DNA, RNA).

[0008] A presente invenção também se relaciona com um

método para nocautear [knocking down] (parcialmente ou completamente) o gene alvo, provendo assim uma alternativa para métodos atualmente disponíveis de nocaute de um gene ou de genes. Este método de nocautear a expressão de gene pode ser usado terapêuticamente ou para pesquisa (p.e., para gerar modelos de estados de doença, para examinar a função de um gene, para avaliar se um agente atua em um gene, para validar alvos para descoberta de drogas). Naqueles exemplos em que a função do gene é eliminada, a célula ou organismo resultante também pode ser referido como um nocaute. Uma configuração do método para produzir células e organismos nocauteados compreende introduzir uma célula ou organismo no qual um gene (referido como um gene alvo) deve ser nocauteado, o RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nt que alveja o gene, e manter a célula ou organismo resultante sob condições nas quais RNAi ocorra, resultando na degradação do mRNA do gene alvo, produzindo assim, células ou organismos nocauteados. As células e organismos nocauteados produzidos pelo presente método também são o objeto desta invenção.

[0009] A presente invenção também refere-se a um método para examinar ou avaliar a função de um gene em uma célula ou organismo. Em uma configuração, o RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nt que alveja o mRNA do gene para degradação é introduzido dentro de uma célula ou organismo no qual RNAi ocorre. A célula ou organismo é referida como uma célula ou organismo de teste. A célula ou organismo de teste é mantida sob condições nas quais a degradação do mRNA do gene ocorre. O fenótipo da célula ou organismo de teste é então observado e comparado com aquele de uma célula ou organismo controle apropriada, tal como a célula ou organismo correspondente que

é tratada da mesma maneira, exceto que o gene alvo (específico) não é alvejado. Um RNA de 21 a 23 nt que não alveja o mRNA para degradação pode ser introduzido dentro da célula ou organismo controle em substituição do RNA introduzido dentro da célula ou organismo de teste, apesar de que não é necessário fazer isto. Uma diferença entre os fenótipos das células ou organismos de teste e de controle provê informação sobre a função do mRNA degradado. Em uma outra configuração, o RNA de fita dupla que corresponde a uma sequência do gene é combinado com um extrato solúvel que medeia RNAi, tal como o extrato solúvel derivado de embriões de *Drosophila* aqui descritos, sob condições nas quais o RNA de fita dupla é processado para gerar RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos. O RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos é isolado e, então, introduzido dentro de uma célula ou organismo no qual RNAi ocorre (célula de teste ou organismo de teste). A célula de teste ou organismo de teste é mantida sob condições nas quais a degradação do mRNA ocorre. O fenótipo da célula ou organismo de teste é então observado e comparado com aquele de um controle apropriado, tal como uma célula ou organismo correspondente que seja tratado da mesma maneira que a célula ou organismo de teste, exceto que o gene alvo não é alvejado. Uma diferença entre os fenótipos das células ou organismos de teste e de controle provê a informação sobre a função do gene alvo. A informação provida pode ser suficiente para identificar (definir) a função do gene ou pode ser usada em conjunto com a informação obtida destes ensaios ou análises para fazer isto.

[0010] Ademais o objeto da presente invenção é um método para validar se um agente atua em um gene. Neste método, o

RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos que alveja o mRNA a ser degradado é introduzido dentro de uma célula ou organismo no qual RNAi ocorre. A célula ou organismo (que contém o RNA introduzido) é mantida sob condições nas quais a degradação de mRNA ocorre, e o agente é introduzido dentro da célula ou organismo. Se o agente tem um efeito na célula ou organismo, este efeito é determinado; se o agente não tem efeito na célula ou organismo, então o agente atua no gene.

[0011] A presente invenção também se relaciona com um método para validar se um produto de gene é um alvo para descoberta ou desenvolvimento de drogas. O RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos que alveja o mRNA que corresponde ao gene para degradação é introduzido dentro de uma célula ou organismo. A célula ou organismo é mantida sob condições nas quais a degradação do mRNA ocorre, resultando em expressão diminuída do gene. Se expressão diminuída do gene tem um efeito na célula ou organismo, ela é determinada, de modo que se expressão diminuída do gene tiver um efeito, então o produto de gene é um alvo para descoberta ou desenvolvimento de droga.

[0012] A presente invenção também abrange um método para tratar uma doença ou condição associada com a presença de uma proteína em um indivíduo compreendendo administrar ao indivíduo RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos que alveja o mRNA da proteína (o mRNA que codifica a proteína) para degradação. Como um resultado, a proteína não é produzida ou não é produzida até a extensão que teria na ausência do tratamento.

[0013] Ademais é abrangido pela presente invenção um gene identificado pelo sequenciamento de moléculas de RNA de 21 a

23 nucleotídeos endógenas que medeiam interferência de RNA.

[0014] Também é abrangido pela presente invenção, um método para identificar sítios alvo dentro de um mRNA que sejam particularmente adequados para RNAi bem como um método para avaliar a capacidade dos RNAs de 21-23 nt em mediar RNAi.

Descrição resumida dos desenhos

[0015] O arquivo desta patente contém pelo menos um desenho executado em cores. Cópias desta patente com desenho(s) em cores serão providas pelo Escritório de Marcas e Patentes através de requerimento e pagamento da taxa necessária.

[0016] A figura 1 é uma representação esquemática dos mRNAs e dsRNAs repórteres de Rr-Luc e Pp-Luc. Os comprimentos e posições dos ssRNA, asRNA, e dsRNA são mostrados em barras pretas com relação às sequências do mRNA repórter de Rr-Luc e Pp-Luc. Os retângulos pretos indicam as duas seqüências codificadoras das lucíferas não relacionadas, as linhas correspondem às regiões 5' e 3' não-traduzidas dos mRNAs;

[0017] A figura 2A é um gráfico da razão de atividades de luciferase após alvejar mRNA de Pp-Luc a 50 pM com ssRNA, asRNA, ou dsRNA a 10 nM a partir do segmento 505 bp do gene de Pp-Luc mostrando interferência específica para o gene por dsRNA *in vitro*. Os dados são os valores médios de sete experimentos \pm desvio padrão. Quatro lisados preparados independentemente foram usados. A atividade de luciferase foi normalizada para o controle do tampão; uma razão igual a um indica nenhuma interferência específica para gene;

[0018] A figura 2B é um gráfico da razão de atividades de luciferase após alvejar mRNA de Rr-Luc a 50 pM com ssRNA,

asRNA, ou dsRNA a 10 nM a partir do segmento de 501 bp do gene de Rr-Luc mostrando interferência específica para o gene por dsRNA *in vitro*. Os dados são os valores médios de seis experimentos \pm desvio padrão. Uma razão de Rr-Luc/Pp-Luc igual a um indica nenhuma interferência específica para gene;

[0019] A figura 3A é uma representação esquemática da estratégia experimental usada para mostrar que a incubação no lisado de embriões de *Drosophila* potencializa dsRNA para interferência específica do gene. Os mesmos dsRNAs usados na figura 2 (ou tampão) foram pré-incubados em série usando diluições de duas vezes em seis reações sucessivas com lisado de embriões de *Drosophila*, então testados quanto a sua capacidade para bloquear a expressão do mRNA. Como um controle, a mesma quantidade de dsRNA (10 nM) ou tampão foi diluída diretamente no tampão e incubada com mRNAs Pp-Luc e Rr-Luc e lisado;

[0020] A figura 3B é um gráfico de potenciação quanto alvejando mRNA de Pp-Luc. As colunas pretas indicam que o dsRNA ou o tampão foi pré-incubado em série; as colunas brancas correspondem a uma diluição direta por 32 vezes do dsRNA. Os valores foram normalizados para aqueles dos controles tampão;

[0021] A figura 3C é um gráfico de potenciação do mRNA de Rr-Luc alvo. O controle tampão correspondente é mostrado na figura 3B;

[0022] A figura 4 é um gráfico mostrando o efeito de dsRNA competidor na interferência específica para o gene. As concentrações crescentes de nanos de dsRNA (508 bp) foram adicionadas às reações contendo 5nM de dsRNA (os mesmos dsRNAs usados nas figuras 2A e 2B) alvejando o mRNA Pp-Luc

(colunas pretas, eixo geométrico esquerdo) ou mRNA Rr-Luc (colunas brancas, eixo geométrico direito). Cada reação continha tanto um mRNA alvo (Pp-Luc para as colunas pretas, Rr-Luc para as brancas) quanto um mRNA controle não-relacionado (Rr-Luc para as colunas pretas, Pp-Luc para as brancas). Os valores foram normalizados para o controle tampão (não mostrado). As reações foram incubadas sob condições padrões (veja Métodos);

[0023] A figura 5A é um gráfico mostrando o efeito de dsRNA na estabilidade do mRNA. O mRNA Pp-Luc, círculos; o mRNA Rr-Luc, quadrados; símbolos cheios, incubação de tampão; símbolos vazios, incubação com dsRNA Pp;

[0024] A figura 5B é um gráfico mostrando a estabilidade de mRNA Rr-Luc incubado com dsRNA Rr ou dsRNA Pp. Os quadrados cheios, tampão; quadrados vazios, dsRNA Pp (10 nM) círculos vazios, dsRNA Rr (10 nM);

[0025] A figura 5C é um gráfico mostrando a dependência do comprimento de dsRNA. A estabilidade do mRNA Pp-Luc foi avaliada após incubação no lisado na presença de tampão ou dsRNAs de comprimentos diferentes. Os quadrados cheios, tampão; círculos vazios, dsRNA de 49 bp (10 nM); triângulos invertidos vazios, dsRNA de 149 bp (10 nM); triângulos vazios, dsRNA de 505 bp (10 nM); losangos vazios, dsRNA de 997 bp (10 nM). As reações foram incubadas sob condições padrões (veja Métodos);

[0026] A figura 6 é um gráfico mostrando que RNAi requer ATP. Creatina cinase (CK) usa fosfato de creatina (CP) para gerar ATP. Círculos, +ATP, +CP, +CK; quadrados, -ATP, +CP, +CK; triângulos, -ATP, -CP, +CK; triângulos, -ATP, -CP, +CK; triângulos invertidos, -ATP, +CP, -CK;

[0027] A figura 7A é um gráfico de síntese de proteína, como refletida por atividade de luciferase produzida após incubação de mRNA de Rr-Luc na reação de RNAi *in vitro* por 1 hora, na presença dos inibidores de síntese de proteína anisomicina, cicloheximida, ou cloranfenicol, em relação a uma reação sem qualquer inibidor, mostrando que RNAi não requer translação de mRNA;

[0028] A figura 7B é um gráfico mostrando a translação de mRNAs de Pp-Luc capeados com 7-metil-guanosina e adenosina (círculos e quadrados, respectivamente) na reação de RNAi na ausência de dsRNA, como medido através da atividade da luciferase produzida em uma incubação de uma hora;

[0029] A figura 7C é um gráfico mostrando a incubação em uma reação de RNAi do mRNA Pp-luc capeado com 7-metil-guanosina radio-marcado com ^{32}P uniformemente (círculos) e mRNA PP-luc capeado com adenosina (quadrados), na presença de (símbolos vazios) e na ausência (símbolos cheios) de dsRNA Pp-luc de 505 bp;

[0030] A figura 8A é um gráfico da análise da desnaturação em gel de agarose do mRNA Pp-luc incubado em uma reação de RNAi padrão com tampão, asRNA-Pp de 505 nt, ou dsRNA-Pp de 505 bp para os tempos indicados, mostrando que asRNA causa uma pequena quantidade de RNAi *in vitro*;

[0031] A figura 8B é um gráfico da análise da desnaturação em gel de agarose do mRNA Rr-luc incubado em uma reação de RNAi padrão com tampão, asRNA-Pp de 505 nt, ou dsRNA-Pp de 505 bp para os tempos indicados, mostrando que asRNA causa uma pequena quantidade de RNAi *in vitro*;

[0032] A figura 9 é um esquema das posições dos três dsRNAs, 'A', 'B', e 'C', em relação ao mRNA Rr-luc;

[0033] A figura 10 indica os sítios de clivagem mapeados nos primeiros 267 nt do mRNA Rr-luc (ID. SEQ. nº 1). A barra azul abaixo da seqüência indica a posição 'C' dos dsRNA, e os círculos azuis indicam a posição dos sítios de clivagem causados por este dsRNA. A barra verde denota a posição 'B' de dsRNA, e os círculos verdes, sítios de clivagem. A barra magenta indica a posição 'A' de dsRNA, e os círculos magenta, as clivagens. Uma clivagem excepcional dentro de uma corrida de 7 uracilas está marcada com uma ponta de seta vermelha;

[0034] A figura 11 é um modelo proposto para RNAi. RNAi é considerada a começar com a clivagem do dsRNA para produtos com 21-23 nt através de uma nuclease específica para dsRNA, talvez em um complexo de multi-proteínas. Estes dsRNAs curtos podem então ser dissociados por uma helicase dependente de ATP, possivelmente um componente do complexo inicial, para asRNAs de 21-23 nt que poderiam então alvejar o mRNA para clivagem. Os asRNAs curtos são imaginados a permanecer associados com as proteínas específicas de RNAi (círculos) que foram originalmente ligadas pelo dsRNA de comprimento total, explicando assim a ineficiência de asRNA para disparar a RNAi *in vivo* e *in vitro*. Finalmente, uma nuclease (triângulos) clivaria o mRNA;

[0035] A figura 12 é um gráfico de barras mostrando o silenciamento de gene específico para seqüência pelos fragmentos de 21-23 nt. A razão da atividade de luciferase após o alvejamento de mRNA Pp-Luc e Rr-Luc através de 5 nM do dsRNA Pp-Luc ou Rr-Luc (500 bp) ou dos fragmentos de 21-23 nt isolados de uma incubação anterior do respectivo dsRNA em lisado de *Drosophila*. A quantidade de 21-23 mers isolados, presentes na reação de incubação corresponde,

aproximadamente, à mesma quantidade de 21-23 gerados durante uma reação de incubação com 5 nM de dsRNA com 500 bp. Os dados são valores médios de 3 experimentos e o desvio padrão é dado por barras de erro. A atividade da luciferase foi normalizada para o controle tampão;

[0036] A figura 13A ilustra a purificação de fragmentos de RNA em uma coluna de filtração em gel, Superdex HR 200 10/30 (Pharmacia), usando o método descrito no Exemplo 4. O dsRNA foi marcado com ^{32}P , e a radioatividade recuperada em cada fração de coluna foi colocada em gráfico. As frações também foram analisadas pela desnaturação por letroforese em gel (inserção);

[0037] A figura 13B demonstra a capacidade do RNA de luciferase-Rr, após incubação no lisado de *Drosophila* e o fracionamento como na figura 13A, para mediar a interferência específica da seqüência com a expressão de um mRNA alvo de luciferase-Rr. Um microlitro de cada fração re-suspensa foi testado em uma reação de RNAi *in vitro* com 10 microlitros (veja Exemplo 1). Este procedimento produz uma concentração de RNA na reação de RNAi *in vitro* padrão que é aproximadamente igual à concentração daquelas espécies de RNA na reação original antes de ser carregado na coluna. A luminescência relativa por segundo foi normalizada ao valor médio de dois controles tampões;

[0038] A figura 13C é o controle de especificidade para a figura 13B. Ele demonstra que o RNA fracionado da figura 13B não medeia, eficientemente, a interferência específica para a seqüência com a expressão de um mRNA Pp-luciferase. As avaliações são como na figura 13B;

[0039] As figuras 14A e 14B são representações

esquemáticas do constructo repórter e duplicatas de siRNA. A figura 14A ilustra as regiões de gene repórter da luciferase do vagalume (Pp-luc) e amor-perfeito do mar (Rr-luc), a partir de plasmídeos pGL2-Controle, pGL3-Controle, e pRL-TK (Promega). Elementos regulatórios SV40, o promotor de timidina-quinase de HSV, e duas íntrons (linhas) estão indicados. A sequência da luciferase GL3 é 95% idêntica à de GL2, mas RL é completamente não relacionada com ambos. A expressão de luciferase a partir de pGL2 é aproximadamente 10 vezes menor que aquela de pGL3 nas células de mamífero transfectadas. A região alvejada pelas duplicatas de siRNA está indicada como barra preta abaixo da região de codificação dos genes de luciferase. A figura 14B mostra as sequências no sentido (superior) e anti-sentido (inferior) das duplicatas de siRNA alvejando luciferase de GL2 (ID SEQ N^{os} 10 e 11), de GL3 (ID SEQ N^{os} 12 e 13), e de RL (ID SEQ N^{os} 14 e 15) estão indicadas. As duplicatas de siRNA de GL2 e de GL3 diferem somente por 3 substituições de nucleotídeos simples (enquadrados em cinza). Um controle não específico, uma duplicata com a sequência de GL2 invertida, invGL2 (ID SEQ N^{os} 16 e 17), foi sintetizada. A projeção de 2 nt em 3' de 2'-deoxitimidina está indicado como TT; uGL2 (ID SEQ N^{os} 18 e 19) é similar a siRNA GL2 mas contém a projeção ribo-uridina em 3';

[0040] As figuras 15A-15J são gráficos mostrando interferência de RNA por duplicatas de siRNA. As razões de luciferase de alvo para controle foram normalizadas para um controle tampão (bu, barras pretas); barras cinza indicam razões de luciferase de GL2 ou de GL3 de *Photinus pyralis* (Pp-luc) para luciferase de RL *Renilla reniformis* (Rr-luc)

(eixo esquerdo), barras brancas indicam razões de RL em relação a GL2 ou GL3 (eixo direito). As figuras 15A, 15C, 15E, 15G, e 15I mostram os resultados de experimentos realizados com a combinação de plasmídeos repórteres de pGL2-Controle e pRL-TK, as figuras 15B, 15D, 15F, 15H, e 15J com plasmídeos repórteres de pGL3-Controle e pRL-TK. A linha de célula usada para o experimento de interferência está indicada no topo de cada plotagem. As razões de Pp-luc/Rr-luc para o controle tampão (bu) variou entre 0,5 e 10 para pGL2/pRL, e entre 0,03 e 1 para pGL3/pRL, respectivamente, antes da normalização e entre as várias linhas de células testadas. Os dados plotados tiveram média tirada a partir de três experimentos independentes \pm S.D; e

[0041] As figuras 16A-16F são gráficos mostrando os efeitos dos 21 nt de siRNAs, 50 bp, e dsRNAs de 500 bp na expressão de luciferase em células HeLa. O comprimento exato dos dsRNAs longos está indicado abaixo das barras. As figuras 16A, 16C, e 16E descrevem experimentos realizados com plasmídeos repórteres pGL2-Controle e pRL-TK, as figuras 16B, 16D, e 16F descrevem experimentos realizados com plasmídeos repórteres pGL3-Controle e pRL-TK. Os dados tiveram média tirada a partir de dois experimentos independentes \pm S.D. As figuras 16A, 16B representam a expressão Absoluta de Pp-luc, plotada em unidades de luminescência arbitrárias. As figuras 16C, 16D, representam a expressão de Rr-luc, plotada em unidades de luminescência arbitrárias. As figuras 16E, 16F, representam as razões da luciferase alvo normalizada para luciferase controle. As razões de atividade de luciferase para duplicatas de siRNA foram normalizadas para um controle tampão (bu, barras pretas); as razões de luminescência para

dsRNAs de 50 ou 500 bp foram normalizadas para as respectivas razões observadas para dsRNA de 50 e 500 bp a partir da GFP humanizada (hG, barras pretas). Deve ser notado, que todas as diferenças na sequência entre os dsRNAs de 49 e 484 bp alvejando GL2 e GL3 não são suficientes para conferir especificidade entre alvos GL2 e GL3 (identidade ininterrupta de 43 nt no segmento de 49 bp, identidade ininterrupta maior que 239 nt no segmento de 484 bp) (Parrish, S. e outros, Mol. Cell, 6:1077-1087 (2000)).

Descrição detalhada da invenção

[0042] O RNA de fita dupla (dsRNA) dirige a degradação específica para sequência de mRNA através de um processo conhecido como interferência de RNA (RNAi). O processo é conhecido por ocorrer em uma ampla variedade de organismos, incluindo embriões de mamíferos e outros vertebrados. Usando o sistema de *Drosophila in vitro* descrito aqui, foi demonstrado que dsRNA é processado em segmentos de RNA de 21-23 nucleotídeos (nt) de comprimento, e além disso, que quando estes fragmentos de 21-23 nt são purificados e adicionados de volta aos extratos de *Drosophila*, eles medeiam a interferência de RNA na ausência de dsRNA mais longo. Portanto, estes fragmentos de 21-23 nt são mediadores específicos para sequência de degradação de RNA. Um sinal molecular, que pode ser o comprimento específico dos fragmentos, deve estar presente nestes fragmentos de 21-23 nt para recrutar fatores celulares envolvidos em RNAi. A presente invenção abrange estes fragmentos de 21-23 nt e seus usos para inativar especificamente a função de gene. O uso destes fragmentos (ou oligonucleotídeos produzidos recombinantemente ou sintetizados quimicamente de uma mesma

natureza ou similar) habilita o alvejamento de mRNAs específicos para degradação em células de mamíferos. O uso de dsRNAs longos em células de mamíferos para produzir RNAi não é usualmente prático, presumivelmente por causa dos efeitos prejudiciais da resposta do interferon. O alvejamento específico de uma função de gene particular, que é possível com fragmentos de 21-23 nt da presente invenção, é útil em aplicações funcionais genômicas e terapêuticas.

[0043] Em particular, a presente invenção se relaciona com moléculas de RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos que medeiam RNAi. Em uma configuração, a presente invenção relaciona-se a moléculas de RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos que dirigem a clivagem do mRNA específico ao qual eles correspondem. As moléculas de RNA de 21-23 nt da presente invenção também podem compreender um grupo 3' hidroxila. As moléculas de RNA de 21-23 nt podem ser de fita simples ou de fita dupla (como dois RNAs de 21-23 nt); tais moléculas podem ser terminadas sem corte ou compreender projeções ("overhangs") (p. e., 5', 3'). Em configurações específicas, a molécula de RNA é de fita dupla e tanto terminada sem corte quanto compreende projeções (como dois RNAs de 21-23 nt).

[0044] Em uma configuração, pelo menos uma fita da molécula de RNA tem uma extremidade 3' projetante de cerca de 1 a cerca de 6 nucleotídeos (p. e., nucleotídeos de pirimidina, nucleotídeos de purina) de comprimento. Em outras configurações, a extremidade 3' projetante tem cerca de 1 a cerca de 5 nucleotídeos de comprimento, de cerca de 1 a cerca de 3 nucleotídeos e de cerca de 2 a cerca de 4 nucleotídeos de comprimento. Em uma configuração, a molécula de RNA é de

fita dupla, uma fita tem uma extremidade 3' projetante a outra fita pode ser terminada sem corte ou ter uma projeção. Na configuração na qual a molécula de RNA é de fita dupla e ambas as fitas compreendem uma projeção, o comprimento das projeções pode ser o mesmo ou um comprimento diferente para cada fita. Em uma configuração particular, o RNA da presente invenção compreende fitas de 21 nucleotídeos que são emparelhadas e as quais têm projeções de cerca de 1 a cerca de 3, particularmente de cerca de 2 nucleotídeos em ambas extremidades 3' do RNA. Para reforçar adicionalmente a estabilidade do RNA da presente invenção, as extremidades 3' projetantes podem ser estabilizadas contra degradação. Em uma configuração, o RNA é estabilizado pela inclusão de nucleotídeos purina, tais como nucleotídeos de adenosina ou guanosina. Alternativamente, a substituição de nucleotídeos de pirimidina por análogos modificados, p. e., substituição de extremidades 3' projetantes de 2 nucleotídeos de uridina por 2' de deoxitimidina é tolerada e não afeta a eficiência de RNAi. A ausência de um 2' hidroxila reforça significativamente a resistência de nuclease da projeção no meio de cultura de tecido.

[0045] As moléculas de RNA de 21-23 nt da presente invenção podem ser obtidas usando um número de técnicas conhecidas pelos técnicos no assunto. Por exemplo, o RNA pode ser sintetizado quimicamente ou produzido recombinantemente usando métodos conhecidos na técnica. Os RNAs de 21-23 nt também podem ser obtidos usando o sistema de *Drosophila in vitro* descrito aqui. O uso do sistema *Drosophila in vitro* impõe combinar dsRNA com um extrato solúvel derivado de embriões de *Drosophila*, produzindo assim uma combinação. A

combinação é mantida sob condições nas quais o dsRNA é processado para RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos. O sistema de *Drosophila in vitro* também pode ser usado para obter RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos de comprimento, o qual medeia a interferência de RNA do mRNA de um gene particular (p. e., oncogene, gene viral). Nesta configuração, RNA de fita dupla que corresponde a uma sequência do gene é combinado com um extrato solúvel derivado de embriões de *Drosophila*, produzindo assim uma combinação. A combinação é mantida sob condições nas quais o RNA de fita dupla é processado para RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos. Como mostrado aqui, RNA de 21-23 nt medeia a RNAi do mRNA a ser degradado. A presente invenção também se relaciona com as moléculas de RNA de 21-23 nt produzidas pelos métodos aqui descritos.

[0046] Em uma configuração, os métodos aqui descritos são usados para identificar ou obter moléculas de RNA de 21-23 nt que são úteis como mediadores específicos de sequência de degradação de RNA e, assim, para inibição de mRNAs, tais como mRNAs humanos, que codificam produtos associados com ou causadores de uma doença ou de uma condição indesejável. Por exemplo, a produção de uma oncoproteína ou proteína viral pode ser inibida em humanos para impedir a doença ou condição de ocorrer, limitar a extensão na qual ela ocorre ou revertê-la. Se a sequência do gene a ser alvejado em humanos é conhecida, RNAs de 21-23 nt podem ser produzidos e testados quanto a sua capacidade para mediar RNAi em uma célula, tal como uma célula humana ou de outro primata. Aquelas moléculas de RNA humano de 21-23 nt demonstrando mediar RNAi podem ser testadas, se desejado, em um modelo animal apropriado para

avaliar adicionalmente sua eficácia *in vivo*. Cópias adicionais de RNAs de 21-23 nt demonstrando mediar RNAi podem ser produzidas pelos métodos aqui descritos.

[0047] O método para obter a sequência de RNA de 21-23 nt usando o sistema de *Drosophila in vitro* pode adicionalmente compreender o isolamento da sequência de RNA a partir da combinação. As moléculas de RNA de 21-23 nt podem ser isoladas usando um número de técnicas conhecidas pelos técnicos no assunto. Por exemplo, a eletroforese em gel pode ser usada para separar RNAs de 21-23 nt a partir da combinação, fatias de gel compreendendo as sequências de RNA removidas e RNAs eluídos a partir das fatias de gel. Alternativamente, os métodos de não-desnaturação, tais como cromatografia de coluna de não-desnaturação, podem ser usados para isolar o RNA produzido. Em adição, a cromatografia (p. e. cromatografia de exclusão de tamanho), centrifugação de gradiente de glicerol, purificação por afinidade com anticorpo podem ser usadas para isolar RNAs de 21-23 nt. O complexo RNA-proteína isolado do sistema de *Drosophila in vitro* pode também ser usado diretamente nos métodos descritos aqui (p. e., método para mediar RNAi de mRNA de um gene). Os extratos solúveis derivados de embriões de *Drosophila* que medeiam RNA ou a RNAi, estão abrangidos pela invenção. O extrato solúvel de *Drosophila* pode ser obtido em uma variedade de modos. Por exemplo, o extrato solúvel pode ser obtido a partir de blastoderma sincicial de embriões de *Drosophila*, como descrito nos Exemplos 1, 2, e 3. Os extratos solúveis podem ser derivados a partir de outras células nas quais a RNAi ocorra. Alternativamente, os extratos solúveis podem ser obtidos a partir de uma célula que não realize a RNAi. Neste

caso, os fatores necessários para mediar a RNAi podem ser introduzidos dentro de tal célula e o extrato solúvel é então obtido. Os componentes do extrato também podem ser sintetizados quimicamente e/ou combinados usando métodos conhecidos na técnica.

[0048] Qualquer dsRNA pode ser usado nos métodos da presente invenção, provido que ele tenha suficiente homologia com o gene alvo para mediar RNAi. A sequência do dsRNA, para uso nos métodos da presente invenção, não necessita ser conhecida. Alternativamente, o dsRNA, para uso na presente invenção, pode corresponder a uma sequência conhecida, tal como aquela de um gene completo (um ou mais) ou porção do mesmo. Não existe limite máximo no comprimento do dsRNA que pode ser usado. Por exemplo, o dsRNA pode variar de cerca de 21 pares base (bp) do gene até o comprimento total do gene ou mais. Em uma configuração, o dsRNA usado nos métodos da presente invenção tem cerca de 1000 bp de comprimento. Em uma outra configuração, o dsRNA tem cerca de 500 bp de comprimento. Em ainda uma outra configuração, o dsRNA tem cerca de 22 bp de comprimento.

[0049] Os RNAs de 21 a 23 nt descritos aqui podem ser usados em uma variedade de modos. Por exemplo, as moléculas de RNA de 21 a 23 RNA podem ser usadas para mediar a interferência do RNA de mRNA de um gene em uma célula ou organismo. Em uma configuração específica, o RNA de 21 a 23 nt é introduzido dentro de células humanas ou em humanos de modo a mediar a interferência de RNA nas células ou em células no indivíduo, de modo a evitar ou tratar uma doença ou condição indesejável. Neste método, um gene (ou genes) que causam ou contribuem para a doença ou condição indesejável é

alvejado e o mRNA correspondente (o produto transcricional do gene alvo) é degradado por RNAi. Nesta configuração, um RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos que alveja o mRNA correspondente (o mRNA do gene alvo) para degradação é introduzido dentro da célula ou do organismo. A célula ou organismo é mantido sob condições sob as quais a degradação do mRNA correspondente ocorra, mediando, portanto, a interferência do RNA do mRNA do gene na célula ou organismo. Em uma configuração particular, o método para mediar a interferência de RNA de um gene em uma célula compreende combinar RNA de fita dupla que corresponda a uma sequência do gene com um extrato solúvel derivado de embriões de *Drosophila*, produzindo assim, uma combinação. A combinação é mantida sob condições nas quais o RNA de fita dupla é processado em RNA de cerca de 21 a a cerca de 23 nucleotídeos. O RNA de 21 a 23 nt é então isolado e introduzido dentro da célula ou do organismo. A célula ou organismo é mantida sob condições nas quais a degradação de mRNA do gene ocorra, mediando assim a interferência do RNA do gene na célula ou organismo. No evento em que o RNA de 21-23 nt é introduzido dentro de uma célula, na qual a RNAi não ocorre normalmente, os fatores necessários para mediar RNAi são introduzidos dentro de tal célula ou a expressão dos fatores necessários é induzida em tal célula. Alternativamente, o RNA de 21 a 23 nt, produzido por outros métodos (p. e., síntese química, produção de DNA recombinante), para ter uma composição igual a ou suficientemente similar a do RNA de 21 a 23 nt conhecido por mediar RNAi pode ser similarmente usado para mediar RNAi. Tais RNAs de 21 a 23 nt podem ser alterados por adição,

deleção, substituição ou modificação de um ou mais nucleotídeos e/ou podem compreender materiais de não nucleotídeos. Uma configuração adicional desta invenção é um método *ex vivo* para tratar células de um indivíduo para degradar um gene(s) que causa(m) ou está(ao) associado(s) com uma doença ou condição indesejável, tal como leucemia ou AIDS. Nesta configuração, as células a serem tratadas são obtidas do indivíduo usando métodos conhecidos (p. e., flebotomia ou coleta de medula óssea) e RNAs de 21 a 23 nt que medeiam degradação do mRNA(s) correspondente(s) é (são) introduzido(s) dentro das células, as quais são então re-introduzidas dentro do indivíduo. Se necessário, os componentes bioquímicos necessários para que a RNAi ocorra também podem ser introduzidos dentro das células.

[0050] O mRNA de qualquer gene pode ser alvejado para degradação usando os métodos para mediar a interferência do mRNA aqui descritos. Por exemplo, qualquer mRNA celular ou viral, pode ser alvejado e, como um resultado, a expressão da proteína codificada (p. e., uma oncoproteína, uma proteína viral) será diminuída. Em adição, o mRNA de qualquer proteína associada com/causadora de uma doença ou condição indesejável pode ser alvejada para degradação usando os métodos aqui descritos.

[0051] A presente invenção também refere-se a um método para examinar a função de um gene em uma célula ou organismo. Em uma configuração, uma sequência de RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos que alveja mRNA do gene para degradação é introduzida dentro da célula ou do organismo. A célula ou organismo é mantida sob condições sob as quais a degradação de mRNA do gene ocorre. O fenótipo da célula ou do

organismo é então observado e comparado com um controle apropriado, provendo assim informação sobre a função do gene. Em uma outra configuração, RNA de fita dupla que corresponde a uma sequência do gene é combinado com um extrato solúvel derivado de embriões de *Drosophila* sob condições nas quais o RNA de fita dupla é processado para gerar RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos. O RNA de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos é isolado e, então, introduzido dentro da célula ou do organismo. A célula ou organismo é mantida sob condições nas quais a degradação do mRNA do gene ocorre. O fenótipo da célula ou do organismo é então observado e comparado ~~com~~ a um controle apropriado, identificando assim a função do gene.

[0052] Um aspecto adicional desta invenção é um método para avaliar a capacidade de RNAs de 21-23 nt para mediar RNAi e, particularmente, determinar quais RNA(s) de 21-23 nt o medeiam mais eficientemente a RNAi. Em uma configuração do método, o dsRNA correspondendo a uma sequência de um mRNA a ser degradado, é combinado com um mRNA marcado detectavelmente (p. e., marcado na extremidade, tal como rádio-marcado) e o extrato solúvel desta invenção, produzindo assim uma combinação. A combinação é mantida sob condições sob as quais o RNA de fita dupla é processado e o mRNA é degradado. Os sítios da clivagem mais eficazes são mapeados por comparação da migração dos produtos da clivagem do mRNA marcado para marcadores de comprimento conhecido. Os 21 mers transpondo estes sítios são então projetados e testados quanto a sua eficiência em mediar RNAi.

[0053] Alternativamente, o extrato da presente invenção pode ser usado para determinar se existe um segmento

particular ou segmentos particulares do mRNA correspondendo a um gene os quais são mais eficientemente alvejados por RNAi que outras regiões e, portanto, podem ser sítios alvo especialmente úteis. Em uma configuração, dsRNA correspondente a uma seqüência de um gene a ser degradado, mRNA marcado do gene é combinado com um extrato solúvel que medeia RNAi, produzindo assim uma combinação. A combinação resultante é mantida sob condições sob as quais o dsRNA é degradado e os sítios no mRNA que são o mais eficientemente clivados são identificados, usando métodos conhecidos, tais como comparação com padrões de tamanho conhecido em um gel de sequenciamento.

Visão geral de exemplos

[0054] A análise bioquímica de RNAi se tornou possível com o desenvolvimento do lisado de embriões de *Drosophila* que recapitula silenciamento dependente de dsRNA de expressão de gene descrito no Exemplo 1 (Tuschl e outros, *Genes Dev.*, 13:3191-7 (1999)). No sistema *in vitro*, dsRNA, mas não no sentido ou asRNA, alveja um mRNA correspondente para degradação, ainda que não afete a estabilidade de um mRNA de controle não relacionado. Além disso, a pré-incubação do dsRNA no lisado potencializa sua atividade para alvejar degradação de mRNA, sugerindo que o dsRNA deve ser convertido para uma forma ativa ligando proteínas no extrato ou por modificação covalente (Tuschl e outros, *Genes Dev.*, 13:3191-7 (1999)).

[0055] O desenvolvimento de um sistema livre de células do blastoderma sincicial de embriões de *Drosophila* que recapitula muitos dos aspectos de RNAi é descrito aqui. A interferência observada nesta reação é específica para

seqüência, é promovida por dsRNA, mas não por RNA de fita simples, funciona por degradação de mRNA específica, requer uma extensão mínima de dsRNA e é a mais eficiente com dsRNA longo. Além disso, a pré-incubação de dsRNA potencializa sua atividade. Estes resultados demonstram que RNAi é mediada por processos específicos para seqüência em reações solúveis.

[0056] Como descrito no Exemplo 2, o sistema *in vitro* foi usado para analisar os requisitos de RNAi e para determinar o destino do dsRNA e do mRNA. RNAi *in vitro* requer ATP, mas não requer qualquer translação de mRNA ou reconhecimento da capa de 7-metil-guanosina do mRNA alvo. O dsRNA, mas não RNA de fita simples, é processado *in vitro* para uma população de espécies de 21-23 nt. A desaminação de adenosinas com o dsRNA não parece ser requerida para a formação dos RNAs de 21-23 nt. Como descrito aqui, o mRNA é clivado somente na região correspondente à seqüência do dsRNA e que o mRNA é clivado em intervalos de 21-23 nt, indicando fortemente que os fragmentos de 21-23 nt do dsRNA estão alvejando a clivagem do mRNA. Além disso, como descrito nos Exemplos 3 e 4, quando os fragmentos de 21-23 nt são purificados e adicionados de volta ao extrato solúvel, eles medeiam RNA.

[0057] A presente invenção é ilustrada pelos exemplos seguintes, os quais não são pretendidos a serem limitantes de qualquer modo.

Exemplo 1 Degradação de mRNA alvo por materiais e métodos de RNA de fita dupla

RNAs

[0058] mRNA de Rr-Luc consistiu da seqüência de codificação de luciferase de Rr de 926 nt flanqueada por 25 nt de seqüência 5' não transladada do poli-ligador de

plasmídeo pSP64 e 25 nt de sequência 3' não transladada consistindo de 19 nt de sequência de poli-ligador pSP64 seguido por um sítio Sac I de 6 nt. mRNA de Pp-Luc continha a sequência de codificação de luciferase de Pp de 1653 nt com um sítio Kpn I introduzido imediatamente antes do códon de parada de luciferase de Pp. A sequência de codificação de Pp foi flanqueada por sequências 5' não transladadas consistindo de 21 nt de poli-ligador de plasmídeo pSP64 seguidos pelos 512 nt da região 5' não transladada (UTR) do mRNA da corcunda de *Drosophila* e sequências 3' não transladadas consistindo da UTR 3' de corcunda de 562 nt seguida por um sítio Sac I de 6 nt. As sequências de UTR 3' de corcunda usadas continham seis mutações de G para U que destroem a função dos Nanos Elementos de Resposta *in vivo* e *in vitro*. Ambos mRNAs repórteres terminaram em uma cauda poli(A) de 25 nt codificada no plasmídeo transcrito. Para ambos mRNAs de Rr-Luc e de Pp-Luc, os transcritos foram gerados por transcrição derivada de gabaritos de plasmídeo clivado em um sítio Nsi I que imediatamente seguiu a cauda poli(A) codificada de 25 nt. Para garantir que os transcritos terminassem com uma cauda poli(A), os gabaritos de transcrição clivados em Nsi I foram resectados com Polimerase de DNA T4 na presença de dNTPs. O kit SP6 mMessage Mmachine (Ambion) foi usado para transcrição *in vitro*. Usando este kit, cerca de 80% dos transcritos resultantes são capeados com 7-metil guanossina. Rádio-marcação com ^{32}P foi realizada incluindo $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-UTP}$ na reação de transcrição.

[0059] Para Pp-Luc, ss, as, e dsRNA corresponderam as posições 93-597 em relação ao início de translação, produzindo um dsRNA de 505 bp. Para Rr-Luc, ss, as, e dsRNA

corresponderam as posições 118 a 618 em relação ao início de translação, produzindo um dsRNA de 501 bp. O nano dsRNA de competidores de *Drosophila* corresponderam às posições 122 a 629 em relação ao início de translação, produzindo um dsRNA de 508 bp. ssRNA, asRNA, e dsRNA (diagramados na figura 1) foram transcritos *in vitro* com polimerase de RNA T7 de gabaritos gerados pela reação em cadeia de polimerase. Após purificação com gel dos transcritos de RNA T7, gabarito de DNA residual foi removido por tratamento com Dnase RQ1 (Promega). O RNA foi então extraído com fenol e clorofórmio, e então precipitado e dissolvido em água.

Anelamento de RNA e eletroforese em gel nativo.

[0060] ssRNA e asRNA (0,5 μ M) em Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) com NaCl 20 mM foram aquecidos a 95°C por 1 min e então resfriados e anelados à temperatura ambiente por 12 a 16 h. Os RNAs foram precipitados e re-suspensos em tampão lise (abaixo). Para monitorar o anelamento, os RNAs sofreram eletroforese em um gel de agarose a 2% em tampão TBE e corados com brometo de etídio (Sambrook e outros, Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY (1989)).

Preparação do lisado

[0061] Embriões com zero a duas horas de idade de moscas Oregon R foram coletados em Agar de melaços fermentados a 25°C. Os embriões foram descorionados por 4 a 5 min em alvejante a 50% (v/v), lavados com água, corados secos, e transferidos para um moedor de tecido Potter-Elvehjem (Kontes). Os embriões foram lisados a 4°C em um ml de tampão lise (acetato de potássio a 100 mM), HEPES-KOH a 30 mM, pH 7,4, acetato de magnésio a 2mM) contendo ditiotreitól (DTT) a

5 mM e 1 mg/ml de Pefabloc SC (Boehringer-Mannheim) por grama de embriões levemente úmidos. O lisado foi centrifugado por 25 min a 14.500 x g a 4°C, e a lavagem do sobrenadante congelada em alíquotas em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C.

Condições da reação

[0062] As condições de preparação e reação do lisado foram derivadas daquelas descritas por Hussain e Leibowitz (Hussain and Leibowitz, *Gene* 46:13-23 (1986)). As reações continham lisado a 50% (v/v), mRNAs (concentração final de 10 a 50 pM), e tampão lise a 10% (v/v) contendo o ssRNA, asRNA, ou dsRNA (concentração final de 10 nM). Cada reação também continha fosfato de creatina a 10 mM, creatina fosfocinase a 10 µg/ml, GTP a 100 µM, UTP a 100 µM, CTP a 100 µM, ATP a 500 µM, DTT a 5 µM, RNasin a 0,1 U/ml (Promega), e 100 µM de cada aminoácido. A concentração final de acetato de potássio foi ajustada para 100 mM. Para condições padrões, as reações foram montadas em gelo e então pré-incubadas a 25°C por 10 min antes de adicionar mRNA. Após adicionar mRNAs, a incubação foi continuada por um adicional de 60 min. A etapa de pré-incubação de 10 min foi omitida para os experimentos nas figuras 3A-3C e 5A-5C. As reações foram temperadas com quatro volumes de Tampão Lise Passivo a 1,25x (Promega). A atividade de luciferase de Pp e de Rr foi detectada em um Luminômetro Monolight 2010 (Analytical Luminescence Laboratory) usando o Sistema de Ensaio Reporter de Luciferase Dupla (Promega).

Estabilidade do RNA

[0063] Reações com mRNA rádio-marcado com ³²P foram temperadas pela adição de 40 volumes de tampão PK 2x (Tris-

HCl a 200 mM, pH 7,5, EDTA a 25 mM, NaCl a 300 mM, sulfato de sódio dodecila a 2% p/v). Proteinase K (E. M. Merck; dissolvida em água) foi adicionada para uma concentração final de 465 µg/ml. As reações foram então incubadas por 15 min a 65°C, extraídas com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), e precipitadas com um volume igual de isopropano. As reações foram analisadas por eletroforese em um gel de formaldeído/agarose (0,8% p/v) (Sambrook e outros, Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Plainview, NY. (1989)). A radioatividade foi detectada expondo o gel de agarose (secado a vácuo sobre membrana Nytran Plus (Amersham)] a uma placa de imagem (Fujix) e quantificada usando um software Fujix Bas2000 e Image Gauge 3.0 (Fujix).

Lisados comerciais

[0064] Reações de Lisado de reticulócito de coelho não tratado (Ambion) e extrato de germe de aveia (Ambion) foram montadas de acordo com as instruções do fabricante. dsRNA foi incubado no lisado a 27°C (germe de aveia) ou 30°C (lisado de reticulócito) por 10 min antes da adição de mRNAs.

Resultados e discussão

[0065] Para avaliar se dsRNA poderia bloquear especificamente expressão de gene *in vitro*, mRNAs repórteres derivados de dois genes diferentes de luciferase que estão não relacionados tanto com especificidade de substrato em seqüência quanto em luciferina foram usados: luciferase de *Renilla reniformis* (amor perfeito do mar) (Rr-Luc) e luciferase de *Photuris pennsylvanica* (vagalume) (Pp-Luc). O dsRNA gerado de um gene foi usado para alvejar aquele mRNA de luciferase enquanto o outro RNA de luciferase foi um controle interno co-transladado na mesma reação. dsRNAs de

aproximadamente 600 bp foram preparados por transcrição de produtos de reação de cadeia de polimerase dos genes de Rr-Luc e de Pp-Luc. Cada dsRNA começa ~100 bp a jusante do início de translação (figura 1). RNA no sentido (ss) e anti-sentido (ss) foram transcritos *in vitro* e anelados entre si para produzir o dsRNA. Eletroforese em gel nativo dos asRNA e ssRNA Rr 501 e Pp 505 nt usados para formar os dsRNAs Rr e Pp foram pré-formados. Os ssRNA, asRNA, e dsRNAs foram cada um testados quanto a sua capacidade para bloquear especificamente a expressão de seu mRNA cognato mas não a expressão do mRNA de controle interno não relacionado.

[0066] Os ssRNA, asRNA, ou dsRNA foram incubados por 10 min em uma reação contendo lisado de embriões de *Drosophila*, então ambos mRNAs de Pp-Luc e de Rr-Luc foram adicionados e a incubação continuou por um adicional de 60 min. O lisado de embriões de *Drosophila* translada eficientemente exogenamente mRNA transcrito sob as condições usadas. As quantidades de atividades de enzima de Pp-Luc e de Rr-Luc foram medidas e foram usadas para calcular razões de quer Pp-Luc/Rr-Luc (figura 2A) ou Rr-Luc/Pp-Luc (figura 2B). Para facilitar a comparação de experimentos diferentes, as razões de cada experimento foram normalizadas para a razão observada para um controle no qual tampão foi adicionado à reação em lugar de ssRNA, asRNA, ou dsRNA.

[0067] A figura 2A mostra que uma concentração de 10 nM do dsRNA de 505 bp idêntico a uma porção da seqüência do gene Pp-Luc especificamente inibiu a expressão do mRNA de Pp-Luc mas não afetou a expressão do controle interno de Rr-Luc. Nem ssRNA ou asRNA afetaram a expressão do controle interno de Pp-Luc ou de Rr-Luc. Portanto, a expressão de Pp-Luc foi

especificamente inibida por seu dsRNA cognato. Reciprocamente, uma concentração de 10 nM do dsRNA de 501 bp dirigida contra o mRNA Rr-Luc especificamente inibiu a expressão de Rr-Luc mas não aquela do controle interno de Pp-Luc (figura 2B). Novamente, níveis comparáveis de ssRNA ou asRNA tinham pouco ou nenhum efeito na expressão de qualquer mRNA repórter. Na média, dsRNA reduziu a expressão de luciferase específica em 70% nestes experimentos, nos quais a atividade de luciferase foi medida após incubação de 1 h. Em outros experimentos nos quais a capacidade translacional da reação foi restabelecida pela adição de lisado e componentes da reação frescos, uma redução adicional em atividade de luciferase alvejada em relação ao controle interno foi observada.

[0068] A capacidade de dsRNA mas não asRNA para inibir expressão de gene nestes lisados não é meramente uma consequência da maior estabilidade do dsRNA (meia vida de cerca de 2 h) em relação a RNAs de fita simples (meia vida ~10 min). ssRNA e asRNA transcritos com uma capa de 7-metil guanossina foram tão estáveis no lisado quanto dsRNA não capeado, mas não inibiram expressão de gene. Em contraste, dsRNA formado a partir do ssRNA e asRNA capeados bloqueia especificamente a expressão do mRNA alvo.

[0069] RNAi efetiva em *Drosophila* requer a injeção de cerca de 2 fmol de dsRNA em um blastoderma sincicial de embriões (Kennerdell e Carthew, *Cell* 95:1017-1026 (1998); Cartew, www1.pitt.edu/~carthew/manual/RNAi_Protocol.html (1999)). Uma vez que o volume médio de um embrião de *Drosophila* é aproximadamente 7,3 nl, isto corresponde a uma concentração intracelular de cerca de 25 nM (Mazur e outros,

Cryobiology 25:543-544 (1988)). A expressão de gene no lisado de *Drosophila* foi inibida por uma concentração comparável de dsRNA (10 nM), mas abaixar a concentração de dsRNA dez vezes diminuiu a quantidade de interferência específica. dsRNA dez nanomolar corresponde a um excesso de 200 vezes de dsRNA em relação a mRNA alvo adicionado ao lisado. Para testar se este excesso de dsRNA poderia refletir uma etapa dependente do tempo e/ou da concentração na qual o dsRNA alimentado foi convertido para uma forma ativa por interferência específica para gene, o efeito de pré-incubação do dsRNA em sua capacidade para inibir a expressão de seu mRNA cognato foi examinado. Devido à capacidade translacional dos lisados ser significativamente reduzida após 30 min de incubação a 25°C (observações não publicadas), foi desejado garantir que todos fatores necessários para RNAi permanecessem ativos através de todo o período pré-incubação. Portanto, a cada 30 min, uma reação contendo dsRNA e lisado foi misturada com uma reação fresca contendo lisado não incubado (figura 3A). Após seis transferências seriais sucessivas estendendo-se por 3 horas de pré-incubação, o dsRNA, agora diluído 64 vezes em relação a sua concentração original, foi incubado com lisado e 50 pM de mRNA alvo por 60 min. Finalmente, os níveis de enzima de Pp-Luc e de Rr-Luc foram medidos. Para comparação, a quantidade alimentada de dsRNA (10 nM) foi diluída 32 vezes em tampão, e sua capacidade para gerar interferência de dsRNA específica para gene na ausência de qualquer etapa de pré-incubação foi avaliada.

[0070] A pré-incubação do dsRNA em lisado potencializou significativamente sua capacidade para inibir expressão de gene específica. Enquanto o dsRNA diluído 32 vezes não

mostrou efeito, o dsRNA pré-incubado estava, dentro do erro experimental, tão potente quanto dsRNA não diluído, a despeito de ter sofrido uma diluição de 64 vezes. A potenciação do dsRNA por pré-incubação foi observada para dsRNAs alvejando tanto o mRNA de Pp-Luc (figura 3B) quanto o mRNA de Rr-Luc (figura 3C). Levando em consideração a diluição de 64 vezes, a ativação conferida por pré-incubação permitiu uma concentração de 156 pM de dsRNA para inibir mRNA alvo de 50 pM. Adicionalmente, a diluição do dsRNA "ativado" pode ser efetiva mas não foi testada. Nós notamos que embora ambos dsRNAs testados fossem inativos pelo procedimento de pré-incubação, cada um reteve totalmente sua especificidade para interferir com a expressão somente do mRNA ao qual ele é homólogo. Estudo adicional das reações pode prover uma rota para identificar o mecanismo de potenciação de dsRNA.

[0071] Uma explicação possível para a observação que a pré-incubação do dsRNA reforça sua capacidade para inibir expressão de gene nestes lisados é que fatores específicos quer os modificam e/ou associam com o dsRNA. Conseqüentemente, a adição de quantidades crescentes de dsRNA à reação pode titular tais fatores e diminuir a quantidade de interferência específica para gene causada por um segundo dsRNA de seqüência não relacionada. Para ambos mRNA de Pp-Luc e mRNA de Rr-Luc, a adição de concentrações crescentes de nanos de dsRNA de *Drosophila* não relacionados à reação diminuiu a quantidade de interferência específica para gene causada por dsRNA alvejando o mRNA repórter (figura 4). Nenhuma das concentrações testadas de nanos dsRNA afetou os níveis de translação do mRNA não alvejado, demonstrando que os nanos dsRNA especificamente titularam fatores envolvidos

em interferência específica para gene e não componentes do maquinário translacional. O(s) fator(es) limitante(s) foi(ram) titulado(s) por adição de aproximadamente dsRNA a 1000 nM, um excesso de 200 vezes em relação ao dsRNA a 5 nM usado para produzir interferência específica.

[0072] A interferência *in vitro* pode refletir quer uma inibição específica de translação de mRNA quanto a destruição alvejada do mRNA específico. Para distinguir estas duas possibilidades, os destinos dos mRNAs de Pp-Luc e de Rr-Luc foram examinados diretamente usando substratos rádio-marcados com ^{32}P . Estabilidade de mRNA de Pp-Luc ou de mRNA de Rr-Luc a 10 nM incubados em lisado com quer tampão ou dsRNA PP de 505 bp (10 nM). As amostras foram desproteinizadas após os tempos indicados e os mRNAs rádio-marcados com ^{32}P foram então re-dissolvidos por eletroforese em gel de desnaturação. Na ausência de dsRNA, tanto os mRNAs de PP-Luc quanto de Rr-Luc foram estáveis nos lisados, com ~75% do mRNA alimentado restando após 3 h de incubação. (Cerca de 25% do mRNA alimentado é rapidamente degradado na reação e provavelmente representa mRNA não capeado gerado pelo processo de transcrição *in vitro*). Na presença de dsRNA (505 bp, 10 nM) alvejando o mRNA Pp-Luc, menos que 15% do mRNA Pp-Luc restou após 3 h (figura 5A). Como esperado, o mRNA Rr-Luc permaneceu estável na presença do dsRNA alvejando mRNA Pp-Luc. Reciprocamente, dsRNA (501 bp, 10 nM) alvejando o mRNA Rr-Luc provocou a destruição do mRNA de Rr-Luc mas não teve efeito na estabilidade de mRNA de Pp-Luc (figura 5B). Portanto, o dsRNA especificamente provocou a destruição acelerada do mRNA do qual ele é homólogo sem efeito na estabilidade do mRNA de controle não relacionado. Esta descoberta indica que *in vivo*,

pelo menos em *Drosophila*, o efeito de dsRNA é desestabilizar diretamente o mRNA alvo, não mudar a localização sub-celular do mRNA, por exemplo, fazendo-o ficar especificamente retido no núcleo, resultando em degradação não específica.

[0073] Estes resultados são consistentes com a observação que RNAi conduz a níveis de mRNA citoplásmico reduzidos *in vivo*, como medido por hibridização *in situ* (Montgomery e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:15502-15507 (1998)) e coramento Northern (Ngo e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14687-14692 (1998)). Análises de coloração Northern em tripanosomas e hidra sugerem que dsRNA tipicamente diminui níveis de mRNA em menos que 90% (Ngo e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14687-14692 (1998); Lohmann e outros, Dev. Biol. 214:211-214 (1999)). Os dados apresentados aqui mostram que níveis de mRNA *in vitro* são reduzidos 65% a 85% após incubação de três horas, um efeito comparável com observações *in vivo*. Eles também concordam com a descoberta que RNAi em *C. elegans* é pós-transcricional (Montgomery e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:15502-15507 (1998)). A explicação mais simples para os efeitos específicos em síntese de proteína é que ela reflete a taxa acelerada de deterioração de RNA. Entretanto, os resultados não excluem efeitos independentes mas específicos na translação bem como na estabilidade.

[0074] RNAi, *in vivo*, parece requerer uma extensão mínima de dsRNA (Ngo e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 95:14687-14692 (1998)). A capacidade de duplicatas de RNA de comprimentos de 49 bp, 149 bp, 505 bp, e 997 bp (diagramados na fig. 1) para alvejar a degradação do mRNA Pp-Luc *in vitro* foi avaliada. Bem de acordo com observações *in vivo*, o dsRNA

de 49 pb não foi efetivo *in vitro*, enquanto o dsRNA de 149 bp intensificou a deterioração de mRNA somente ligeiramente, e tanto os dsRNAs de 505 quanto de 997 bp provocaram robusta degradação de mRNA (figura 5C). dsRNA de 50 bp alvejando outras porções do mRNA provoca degradação de mRNA detectável, embora não tão robusta quanto aquela vista para dsRNA de 500 bp. Portanto, embora algum dsRNA curto não medeie RNAi, outros de aproximadamente a mesma extensão, mas composição diferente, serão capazes de fazê-la.

[0075] Se a interferência específica para gene observada em lisados de *Drosophila* era uma propriedade geral de sistemas de translação sem células foi examinada. Os efeitos de dsRNAs na expressão de mRNA de Pp-Luc e de Rr-Luc foram examinados em extratos de germe de aveia e lisados de reticulócito de coelho disponíveis comercialmente. Não houve efeito da adição de 10 nM em qualquer ssRNA, asRNA, ou dsRNA na expressão de qualquer repórter de mRNA em extratos de germe de aveia. Em contraste, a adição de 10 nM de dsRNA ao lisado de reticulócito de coelho provocou uma diminuição não específica profunda e rápida em estabilidade de mRNA. Por exemplo, a adição de dsRNA de Rr-Luc provocou degradação de ambos mRNAs de Rr-Luc e de Pp-Luc dentro de 15 min. O mesmo efeito não específico foi observado com a adição de dsRNA de Pp-Luc. A destruição não específica de mRNA induzida pela adição de dsRNA ao lisado de reticulócito de coelho presumivelmente reflete a ativação observada anteriormente de Rnase L por dsRNA (Clemens e Williams, *Cell* 13:565-572 (1978); Williams e outros, *Nucleic Acids Res.* 6:1335-1350 (1979); Zhou e outros, *Cell* 72:753-765 (1993); Matthews, *Interactions between Viruses and the Cellular Machinery for*

Protein Synthesis. Em *Translational Control* (eds. J. Hershey, M. Mathews e N. Sonenberg), págs. 505-548. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY. (1996)). Linhas de células de camundongos carentes de trajetórias anti-virais induzidas por dsRNA foram recentemente descritas (Zhou e outros, *Virology* 258:435-440 (1999)) e podem ser úteis na pesquisa para RNAi de mamífero. Embora RNAi seja sabida a existir em algumas células de mamíferos (Wianny e Zernicka-Goetz *Nat. Cell Biol.* 2:70-75 (2000)), em muitos tipos de células de mamífero sua presença é provavelmente obscurecida pela rápida indução de dsRNA de respostas anti-virais não específicas.

[0076] A destruição alvejada por dsRNA de mRNA específico é característica de RNAi, a qual tem sido observada *in vivo* em muitos organismos, incluindo *Drosophila*. O sistema descrito acima recapitula em uma reação *in vitro* muitos aspectos de RNAi. O mRNA alvo é especificamente degradado enquanto mRNAs de controle não relacionados presentes na mesma solução não são afetados. O processo é o mais eficiente com dsRNAs maiores que 150 bp de comprimento. A reação de degradação específica por dsRNA *in vitro* é provavelmente geral para muitos, se não todos, mRNAs uma vez que ela foi observada usando dois genes não relacionados.

[0077] A magnitude dos efeitos em estabilidade de mRNA *in vitro* descrita aqui são comparáveis com aquela relatada *in vivo* (Ngo e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95:14687-14692 (1998); Lohmann e outros, *Dev. Biol.*, 214:211-214 (1999)). Entretanto, a reação *in vitro* requer um excesso de dsRNA em relação a mRNA. Em contraste, umas poucas moléculas de dsRNA por célula podem inibir a expressão de gene *in vivo* (Fire e outros, *Nature*, 391:806-811 (1998); Kennerdell e

Carthew, Cell, 95:1017-1026 (1998)). A diferença entre a estequiometria de dsRNA para um mRNA alvo *in vivo* e *in vitro* não deve ser surpreendente em que a maioria das reações *in vitro* são menos eficientes que seus processos correspondentes *in vivo*. Interessantemente, a incubação do dsRNA no lisado potencializou grandemente sua atividade para RNAi, indicando que ele está quer modificado ou se torna associado com outros fatores ou ambos. Talvez um número pequeno de moléculas seja efetivo para inibir o mRNA alvo *in vivo* porque o dsRNA injetado foi ativado por um processo similar àquele relatado aqui para RNAi em lisados de *Drosophila*.

Exemplo 2 RNA de fita dupla dirige a clivagem dependente de ATP de mRNA em intervalos de 21 a 23 nucleotídeos

Métodos e material

RNAi *in vitro*

[0078] Reações de RNAi *in vitro* e preparação de lisado foram como descritas no Exemplo 1 (Tuschl e outros, Genes Dev., 13:3191-7 (1999)) exceto que a reação continha 0,03 g/ml de creatina cinase, fosfato de creatina a 25 μ M (Fluka), e ATP a 1 mM. Fosfato de creatina foi recém-dissolvido em 500 mM em água para cada experimento. GTP foi omitido das reações, exceto nas figuras 2 e 3.

Síntese de RNA

[0079] mRNAs de PP-luc e de Rr-luc e dsRNAs de Pp e de Rr (incluindo dsRNA 'B' na figura 6) foram sintetizados por transcrição *in vitro* como descrito anteriormente (Tuschl e outros, Genes Dev., 13:3191-7 (1999)). Para gerar gabaritos de transcrição para dsRNA 'C', a base de RNA sentido 5' foi gcgtaatacgaactcactataGAACAAAGGAAACGGATGAT (ID SEQ N° 2) e a base de RNA sentido 3' foi GAAGAAGTTATTCTCCAAAA (ID SEQ N°

3); a base de asRNA 5' foi gcgtaatac gactcactataGAAGAAGTTATTCTCCAAAA (ID SEQ N° 4) e a base de asRNA 3' foi GAACAAAGGAAACGATGAT (ID SEQ N° 5). Para dsRNA 'A' a base de RNA sentido 5' foi gcgtaatac gactcactataGTAGCGCGGTGTATTATAACC (ID SEQ N° 6) e a base de RNA sentido 3' foi GTACAACGTCAGGTTTACCA (ID SEQ N° 7); a base de asRNA 5' foi gcgtaatac gactcactataGTACAACGTCAGGTTTACCA (ID SEQ N° 8) e a base de asRNA 3' foi GTAGCGCGGTGTATTATAACC (ID SEQ N° 9) (letras minúsculas, sequência promotora T7).

[0080] mRNAs foram marcados na extremidade 5' usando transferase de guanilila (Gibco/BRL), S-adenosil metionina (Sigma), e α -³²P-GTP (3000 Ci/mmol; New England Nuclear) de acordo com as instruções do fabricante. RNAs rádio-marcados foram purificados por seleção de poli(A) usando o kit Poli(A) Tract III (Promega). RNAs não radioativos capeados com 7-metil-guanosina e adenosina foram sintetizados em reações de transcrição *in vitro* com um excesso de 5 vezes de 7-metil-G(5')ppp(5')G ou A(5')ppp(5')G em relação a GTP. Análogos de capa foram comprados de New England Biolabs.

Esgotamento de ATP e inibição de síntese de proteína

[0081] ATP foi esgotada incubando o lisado por 10 minutos a 25°C com glucose a 2 mM e hexocinase a 0,1 U/ml (Sigma). Inibidores de síntese de proteína foram comprados de Sigma e dissolvidos em etanol absoluto como matéria prima concentrada 250 vezes. As concentrações finais de inibidores na reação foram: anisomicina, 53 mg/ml; cicloheximida, 100 mg/ml; cloranfenicol, 100 mg/ml. Síntese de proteína relativa foi determinada medindo a atividade de proteína de luciferase Rr produzida por translação do mRNA de Rr-luc na reação de RNAi

após 1 hora como descrito anteriormente (Tuschl e outros, Genes Dev., 13:3191-7 (1999)).

Análise de processamento de dsRNA

[0082] dsRNAs marcados por ATP com α -³²P internamente (505 bp Pp-luc ou 501 Rr-luc) ou RNA anti-sentido de Rr-luc capeado com 7-metil-guanosina (501 nt) foram incubados em concentração final de 5 nM na presença ou ausência de mRNAs não marcados em lisado de drosophila por 2 horas em condições padrões. As reações foram interrompidas pela adição de tampão proteinase K 2X e desprotenizadas como descrito anteriormente (Tuschl e outros, Genes Dev., 13:3191-3197 (1999)). Os produtos foram analisados por eletroforese em géis de sequenciamento de poliacrilamida a 15% ou 18%. Os padrões de comprimento foram gerados por digestão de T1 de Rnase completa de RNA e asRNA no sentido de Rr-luc de 501 nt marcada por ATP com α -³²P.

[0083] Para análise de clivagem de mRNA, mRNA rádio-marcado com ³²P-5' (descrito acima) foi incubado com dsRNA como descrito anteriormente (Tuschl e outros, Genes Dev., 13:3191-3197 (1999)) e analisados por eletroforese em géis de sequenciamento de poliacrilamida a 5% (figura 5B) e 6% (figura 6C). Padrões de comprimento incluíram padrões de tamanho de RNA disponíveis comercialmente (FMC Bioproducts) rádio-marcados com transferase de guanilila como descrito acima e hidrólise de base parcial e escadas de T1 Rnase gerados a partir do mRNA rádio-marcado 5'.

Ensaio de desaminação

[0084] dsRNAs marcados por ATP com ³²P internamente (5 nM) foram incubados em lisado de Drosophila por 2 horas em condições padrões. Após desproteínização, amostras foram

corridas em géis de sequenciamento a 12% para separar dsRNAs de comprimento total dos produtos de 21-23 nt. Os RNAs foram eluídos a partir das fatias de gel em NaCl 0,3 M durante a noite, precipitados com etanol, coletados por centrifugação, e re-dissolvidos em 20 μ l de água. O RNA foi hidrolizado em 5-fosfatos de nucleosídeo com P1 nuclease (reação de 10 μ l contendo 8 μ l de RNA em água, KOAc 30 mM pH 5,3, ZnSO₄ 10 mM, 10 μ g ou 3 unidades de nuclease P1, 3 horas, 50°C). Amostras (1 ml) foram co-coradas com 5 mononucleotídeos não radioativos [(A₂₆₀)unidades de 0,05 D. E. de pA, pC, pG, pI e pU] em placas de HPTLC de celulose (EM Merck) e separadas na primeira dimensão em ácido isobutírico/25% amônia/água (66/1/33, v/v/v) e na segunda dimensão em fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,8/sulfato de amônio/1-propanol (100/60/2, v/p/v; Silberklang e outros, 1979). A migração dos padrões internos não reativos foi determinada por sombreamento de UV.

Resultados e discussão

RNAi requer ATP

[0085] Como descrito no Exemplo 1, lisados de embriões de *Drosophila* recapitulam fielmente RNAi (Tuschl e outros, *Genes Dev.*, 13:3191-7 (1999)). Anteriormente, silenciamento de gene mediado por dsRNA era monitorado medindo a síntese de proteína de luciferase a partir do mRNA alvo. Portanto, essas reações de RNAi continham um sistema regenerador de ATP, necessário para a translação eficiente do mRNA. Para testar se ATP era, de fato, requerida para RNAi, os lisados foram esgotados para ATP por tratamento com hexocinase e glucose, que converte ATP para ADP, e RNAi foi monitorada diretamente seguindo o destino de mRNA de luciferase de *Renilla reniformis* (Rr-luc) rádio-marcada com ³²P (figura 6). O

tratamento com hexocinase e glucose reduziu o nível de ATP endógeno no lisado de 250 μ M para abaixo de 10 μ M. A regeneração de ATP requereu tanto fosfato de creatina quanto creatina cinase exógenos, que agem para transferir um fosfato de alta energia de fosfato de creatina para ADP. Quando extratos de ATP esgotada foram suplementados com quer fosfato de creatina ou creatina cinase separadamente, nenhuma RNAi foi observada. Portanto, RNAi requer ATP *in vitro*. Quando ATP, fosfato de creatina, e creatina cinase foram todos adicionados juntos às reações contendo o lisado de ATP esgotado, a degradação dependente de dsRNA do mRNA de Rr-luc foi restabelecida (figura 6). A adição de ATP exógena não foi requerida para RNAi eficiente no lisado esgotado, provido que tanto fosfato de creatina quanto creatina cinase estivessem presentes, demonstrando que a concentração endógena (250 mM) de nucleotídeo de adenosina é suficiente para suportar RNAi. RNAi com um mRNA de luciferase de *Photinus pyralis* (Pp-luc) também foi dependente de ATP.

[0086] A estabilidade do mRNA de Rr-luc na ausência de dsRNA Rr foi reduzida em lisados de ATP esgotados em relação àquela observada quando o sistema regenerador de energia foi incluído, mas deterioração do mRNA sob estas condições não exibiu a característica cinética de rápida deterioração de RNAi *in vitro*, nem gerou os produtos de clivagem de mRNA estáveis característicos de RNAi dirigida por dsRNA. Estes experimentos não estabelecem se o requisito de ATP para RNAi é direto, implicando ATP em uma ou mais etapas no mecanismo de RNAi, ou indireto, refletindo um papel para ATP na manutenção de altas concentrações de um outro trifosfato de nucleosídeo no lisado.

Translação não é requerida para RNAi *in vitro*

[0087] O requisito para ATP sugeriu que RNAi poderia ser acoplada a translação de mRNA, um processo altamente dependente de energia. Para testar esta possibilidade, vários inibidores de síntese de proteína foram adicionados à reação preparando uma análise por gel de agarose de desnaturação de mRNA de Pp-luc rádio-marcado com ³²P 5' após incubação para tempos indicados em uma reação de RNAi padrão com e sem inibidores de síntese de proteína. A anisomicina de inibidores de translação eucarióticos, uma inibidora de formação de ligação de peptídeo, cicloheximida, um inibidor de alongamento de cadeia de peptídeo, e puromicina, uma imitação de tRNA que provoca terminação prematura de translação (Cundliffe, Antibiotic Inhibitors of Ribosome Function. In The Molecular Basis of Antibiotic Action, E. Gale, E. Cundliffe, P. Reynolds, M. Richmond e M. Warning, eds. (Nova Iorque: Wiley), págs. 402-547 (1981)) foram testados. Cada um destes inibidores reduziu a síntese de proteína no lisado de *Drosophila* em mais que 1.900 vezes (figura 7A). Em contraste, cloranfenicol, um inibidor de síntese de proteína mitocondrial de *Drosophila* (Page e Orr-Weaver, Dev. Biol., 183:195-207 (1997)), não teve efeito na translação nos lisados (figura 7A). Apesar da presença de anisomicina, cicloheximida, ou cloranfenicol, RNAi prosseguiu em eficiência normal. Puromicina também não perturbou RNAi eficiente. Portanto, síntese de proteína não é requerida para RNAi *in vitro*.

[0088] O iniciamento translacional é um processo dependente de ATP que envolve o reconhecimento da capa de 7-metil guanosina do mRNA (Kozak, Gene, 234:187-208 (1999);

Merrick and Hershey, *The Pathway and Mechanism of Eukaryotic Protein Synthesis*. In *Translational Control*, J. Hershey, M. Mathews e N. Sonenberg, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), págs. 31-69 (1996)). O lisado de *Drosophila* usado para suportar RNAi *in vitro* também recapitula a dependência de capa da translação; mRNA de Pp-luc com uma capa de 7-metil-guanosina foi transladada mais que 10 vezes mais eficientemente do que foi o mesmo mRNA com uma capa de A(5')ppp(5')G (figura 7B). Ambos RNAs foram igualmente estáveis no lisado de *Drosophila*, mostrando que esta diferença em eficiência não pode ser meramente explicada por deterioração mais rápida do mRNA com uma capa de adenosina (veja também Gebauer e outros, *EMBO J.*, 18:6146-54 (1999)). Embora o maquinário translacional possa discriminar entre mRNAs de Pp-luc com capas de 7-metil guanosina e adenosina, os dois mRNAs foram igualmente suscetíveis a RNAi na presença de dsRNA Pp (figura 7C). Estes resultados sugerem que as etapas no reconhecimento de capa não estão envolvidas em RNAi.

dsRNA é processado para espécies de 21-23 nt

[0089] RNAs de 25 nt de comprimento são gerados a partir de ambas as fitas no sentido e anti-sentido de genes passando por silenciamento de gene pós-transcricional em plantas (Hamilton e Baulcombe, *Science*, 286:950-2 (1999)). A análise por gel de acrilamida de desnaturação dos produtos formados em uma incubação de duas horas de dsRNAs rádio-marcados com ³²P e asRNA capeado em lisado sob condições de RNAi padrões, na presença ou ausência de mRNAs alvo. Foi descoberto que dsRNA também é processado para pequenos fragmentos de RNA. Quando incubada em lisado, aproximadamente 15% da

radioatividade alimentada de tanto o dsRNA Rr de 501 bp quanto do dsRNA Pp de 505 bp apareceram nos fragmentos de RNA de 21 a 23 nt. Por causa que os dsRNAs têm mais que 500 bp de comprimento, o rendimento de 15% de fragmentos implica que múltiplos RNAs de 21-23 nt são produzidos a partir de cada molécula de dsRNA de comprimento completa. Outros produtos estáveis não foram detectados. As pequenas espécies de RNA foram produzidas a partir de dsRNAs nos quais ambas fitas foram rádio-marcadas com ^{32}P uniformemente. A formação dos RNAs de 21-23 nt a partir do dsRNA não requer a presença do mRNA correspondente, demonstrando que a pequena espécie de RNA é gerada pelo processamento do dsRNA, ao invés de como um produto de degradação de mRNA alvo por dsRNA. Foi notado que 22 nucleotídeos correspondem a duas voltas de uma hélice RNA-RNA de forma A.

[0090] Quando dsRNAs rádio-marcados dentro de fita quer no sentido ou no anti-sentido foram incubados com lisado em uma reação de RNAi padrão, RNAs de 21-23 nt foram gerados com eficiência comparável. Estes dados suportam a idéia que os RNAs de 21-23 nt foram gerados por processamento simétrico do dsRNA. Uma variedade de dados suportam a idéia que o RNA de 21-23 nt é eficientemente gerado somente a partir de dsRNA e não é a consequência de uma interação entre RNA de fita simples e o dsRNA. Primeiro, um RNA ou asRNA no sentido de PP-luc de 505 nt rádio-marcado com ^{32}P não foi convertido eficientemente para o produto de 21-23 nt quando ele foi incubado com dsRNA PP de 505 bp não radioativo a 5 nM. Segundo, na ausência de mRNA, um asRNA Rr capeado com 7-metil guanossina de 501 nt produziu somente uma quantidade levemente detectável de RNA de 21-23 nt (RNAs de fita simples capeados

são tão estáveis no lisado quanto dsRNA, Tuschl e outros, Genes Dev., 13:3191-7 (1999)), provavelmente devido a uma quantidade pequena de dsRNA contaminar a preparação anti-sentido. Entretanto, quando mRNA de Rr-luc foi incluído na reação com o asRNA Rr capeado rádio-marcado com ^{32}P , uma quantidade pequena de produto de 21-23 nt foi gerada, correspondendo a 4% da quantidade de RNA de 21-23 nt produzida a partir de uma quantidade equimolar de dsRNA Rr. Este resultado é improvável de refletir a presença de dsRNA contaminador na preparação de asRNA Rr, uma vez que significativamente mais produto foi gerado a partir do asRNA na presença do mRNA de Rr-luc do que na ausência. Ao contrário, os dados sugerem que asRNA pode interagir com as seqüências de mRNA complementarias para formar dsRNA na reação e que o dsRNA resultante é subsequente processado para as espécies pequenas de RNA. asRNA Rr pode suportar um baixo nível de RNAi genuína *in vitro* (veja abaixo), consistente com esta explicação.

[0091] Foi a seguir perguntado se a produção dos RNAs de 21-23 nt a partir de dsRNA requeria ATP. Quando o dsRNA Pp de 505 bp foi incubado em um lisado esgotado para ATP por tratamento com hexocinase e glucose, RNA de 21-23 nt foi produzido, embora 6 vezes mais lento que quando ATP foi regenerada no lisado esgotado pela inclusão de creatina cinase e fosfato de creatina. Portanto, ATP pode não ser requerida para produção das espécies de RNA de 21-23 nt, mas pode ao contrário simplesmente reforçar sua formação. Alternativamente, ATP pode ser requerida para processamento do dsRNA, mas em uma concentração menor que aquela restante após tratamento com hexocinase. A base molecular para a

mobilidade mais lenta dos fragmentos de RNA pequenos gerados no lisado esgotado por ATP não é entendida.

[0092] Wagner e Sun (Wagner e Sun, *Nature*, 391:744-745 (1998)) e Sharp (Sharp, *Genes Dev.*, 13:139-41 (1999)) têm especulado que o requisito para dsRNA em silenciamento de gene por RNAi reflete o envolvimento de uma deaminase de adenosina específica para dsRNA no processo. Desaminases de adenosina de dsRNA desenrolam dsRNA convertendo adenosina para inosina, que não forma par base com uracil. Desaminases de adenosina de dsRNA funcionam na edição pós-transcricional de mRNA (para revisão veja Bass, *Trends Biochem. Sci.*, 22:157-62 (1997)). Para testar quanto ao envolvimento de desaminase de adenosina de dsRNA em RNAi, o grau de conversão de adenosina para inosina nos dsRNAs de Rr-luc de 501 bp e de Pp-luc de 505 bp após incubação com lisado de embriões de *Drosophila* em um padrão em reação de RNAi *in vitro* foi examinado. A desaminação de adenosina em dsRNA de comprimento total e nas espécies de RNA de 21-23 nt foi avaliada por cromatografia de camada fina bidimensional. Fosfato inorgânico (P_i) foi produzido pela degradação de mononucleotídeos por fosfatos que contaminam nuclease P1 comercialmente disponível (Auxilien e outros, *J. Mol. Biol.* 262:437-458 (1996)). O grau de desaminação de adenosina nas espécies de 21-23 nt também foi determinado. O dsRNA de comprimento total rádio-marcado com adenosina [^{32}P] foi incubado no lisado, e tanto o dsRNA de comprimento total quanto os produtos de RNA de 21-23 nt foram purificados a partir de um gel de acrilamida de desnaturação, clivados para mononucleotídeos com nuclease P1, e analisados por cromatografia de camada fina bidimensional.

[0093] Uma fração significativa das adenosinas no dsRNA de comprimento total foi convertida para inosina após 2 horas (3,1% e 5,6% de conversão para dsRNAs de Pp-luc e de Rr-luc, respectivamente). Em contraste, somente 0,4% (dsRNA Pp) ou 0,7% (dsRNA Rr) das adenosinas nas espécies de 21-23 nt foram desaminadas. Estes dados implicam que menos de 1 em 27 moléculas das espécies de RNA de 21-23 nt contém uma inosina. Portanto, é improvável que desaminação de adenosina dependente de dsRNA dentro das espécies de 21-23 nt seja requerida para sua produção.

asRNA gera uma quantidade pequena de RNAi *in vitro*

[0094] Quando mRNA foi rádio-marcada com ^{32}P dentro da capa 5' de 7-metil-guanosina, produtos da deterioração de 5' estáveis acumularam-se durante a reação de RNAi. Tais produtos de deterioração de 5' estáveis foram observados para ambos os mRNAs de Pp-luc e de Rr-luc quando eles foram incubados com seus dsRNAs cognatos. Anteriormente, foi relatado que RNAi eficiente não ocorre quando asRNA é usado em lugar de dsRNA (Tuschl e outros, *Genes Dev.*, 13:3191-7 (1999)). Todavia, mRNA foi mensuravelmente menos estável quando incubado com asRNA que com tampão (figuras 8A e 8B). Isto foi particularmente evidente para o mRNA de Rr-luc: aproximadamente 90% do RNA permaneceu intacto após uma incubação de 3 horas em lisado, mas somente 50% quando asRNA foi adicionado. Menos que 5% permaneceu quando dsRNA foi adicionado. Interessantemente, a diminuição em estabilidade de mRNA provocada por asRNA foi realizada pela formação de uma pequena quantidade dos produtos de deterioração de 5' característicos da reação de RNAi com dsRNA. Esta descoberta assemelha-se à observação que uma pequena quantidade de

produto de 21-23 nt formado do asRNA quando ele foi incubado como o mRNA (veja acima) e dá força à idéia que asRNA pode entrar na trajetória de RNAi, embora ineficientemente.

Sítios de clivagem de mRNA são determinados pela seqüência do dsRNA

[0095] Os sítios de clivagem de mRNA foram examinados usando três dsRNAs diferentes, 'A', 'B', e 'C', colocados ao longo da seqüência de Rr-luc aproximadamente 100 nts. Análise de gel de acrilamida de desnaturação dos produtos de clivagem de 5', estáveis, produzidos após incubação do mRNA de Rr-luc para os tempos indicados com cada um dos três dsRNAs, 'A', 'B', e 'C', ou com tampão (Ø) foi executada. As posições destes em relação à seqüência de mRNA de Rr-luc estão mostradas na figura 9. Cada um dos três dsRNAs foi incubado em uma reação de RNAi padrão com mRNA de Rr-luc rádio-marcado com ³²P dentro da capa 5'. Na ausência de dsRNA, produtos de clivagem de 5' estáveis não foram detectados para o mRNA, mesmo após 3 horas de incubação em lisado. Em contraste, após uma incubação de 20 minutos, cada um dos três dsRNAs produziu uma escada de bandas correspondente a um conjunto de produtos de clivagem de mRNA característicos para aquele dsRNA particular. Para cada dsRNA, os produtos de clivagem de mRNA 5' foram restritos à região do mRNA de Rr-luc que correspondeu ao dsRNA (figuras 9 e 10). Para dsRNA 'A', as extensões dos produtos de clivagem de 5' variou de 236 a logo abaixo de ~750 nt; dsRNA 'A' estende-se dos nucleotídeos 233 a 729 do mRNA de Rr-luc. A incubação do mRNA com dsRNA 'B' produziu produtos de clivagem de 5' de mRNA variando em extensão de 150 a ~600 nt; dsRNA 'B' estende-se dos nucleotídeos 143 a 644 do mRNA. Finalmente, dsRNA 'C'

produziu produtos de clivagem de mRNA de 66 a ~500 nt de comprimento. Este dsRNA estende-se dos nucleotídeos 50 a 569 do mRNA de Rr-luc. Portanto, o dsRNA não somente provê especificidade para a reação de RNAi, selecionando qual mRNA da poça de mRNA celular total será degradado, mas também determina as posições precisas de clivagem ao longo da seqüência de mRNA.

O mRNA é clivado em intervalos de 21-23 nucleotídeos

[0096] Para penetrar adicionalmente no mecanismo de RNAi, as posições de vários sítios de clivagem de mRNA para cada um dos três dsRNAs foram mapeadas (figura 10). Análise de gel de acrilamida de desnaturação de alta resolução de um subconjunto de produtos de clivagem de 5' descritos acima foi realizada. Notadamente, a maioria das clivagens ocorreu em intervalos de 21-23 nt (figura 10). Este espaçamento é especialmente notável à luz de nossa observação que o dsRNA é processado para uma espécie de RNA de 21-23 nt e a descoberta de Hamilton e Baulcombe que um RNA de 25 nt correlaciona-se com silenciamento de gene pós-transcricional em plantas (Hamilton e Baulcombe, *Science*, 286:950-2 (1999)). Dos 16 sítios de clivagem que nós mapeamos (2 para dsRNA 'A', 5 para dsRNA 'B', e 9 para dsRNA 'C'), todos menos dois refletem o intervalo de 21-23 nt. Uma das duas clivagens excepcionais foi um fraco sítio de clivagem produzido por dsRNA 'C' (indicado por um círculo azul na figura 10). Esta clivagem ocorreu 32 nt de 5' do próximo sítio de clivagem. A outra exceção é particularmente intrigante. Após quatro clivagens espaçadas 21-23 nt aparte, dsRNA 'C' provocou a clivagem do mRNA logo nove nt de 3' do sítio de clivagem anterior (ponta de seta vermelha na figura 10). Esta clivagem ocorreu em uma

corrida de sete resíduos de uracil e parece "rearmar" a régua para clivagem; o próximo sítio de clivagem estava 21-23 nt a 3' do sítio excepcional. Os três sítios de clivagem subsequentes que nós mapeamos também estavam espaçados 21-23 nt aparte. Curiosamente, dos dezesseis sítios de clivagem provocados pelos três dsRNAs diferentes, quatorze ocorrem em resíduos de uracil. A significância desta descoberta não está entendida, mas ela sugere que clivagem de mRNA é determinada por um processo que mede intervalos de 21-23 nt e que tem uma preferência de seqüência para clivagem em uracil. Os resultados mostram que as espécies de RNA de 21-23 nt produzidas por incubação de dsRNA de ~500 bp no lisado provocou a interferência específica para seqüência *in vitro* quando isolada de um gel de acrilamida e adicionada a uma nova reação de RNAi no lugar do dsRNA de comprimento completa.

Um modelo para clivagem de mRNA dirigida por dsRNA

[0097] Sem desejar estar limitado por teoria, os dados bioquímicos descritos aqui, junto com recentes experimentos genéticos em *C. elegans* e *Neurospora* (Cogoni e Macino, *Nature*, 399:166-9 (1999); Grishok e outros, *Science*, 287:2494-7 (2000); Ketting e outros, *Cell*, 99:133-41 (1999); Tabara e outros, *Cell*, 99:123-32 (1999)), sugerem um modelo para como dsRNA alveja mRNA para destruição (figura 11). Neste modelo, o dsRNA é primeiro clivado para fragmentos de 21-23 nt de comprimento em um processo provável a envolver genes tais como o *C. elegans* loci *rde-1* e *rde-4*. Os fragmentos resultantes, provavelmente tão curtos quanto asRNA limitado por proteínas específicas para RNAi, seriam então emparelhados com o mRNA e recrutariam uma nuclease que

clivasse o mRNA. Alternativamente, troca de fita poderia ocorrer em um complexo de proteína-RNA que transientemente mantenha um fragmento de dsRNA de 21-23 nt próximo ao mRNA. A separação das duas fitas do dsRNA seguindo à fragmentação pode ser auxiliada por uma helicase de RNA dependente de ATP, explicando a intensificação de ATP observada da produção de RNA de 21-23 nt.

[0098] É provável que cada fragmento de RNA pequeno produza uma, ou no máximo duas clivagens no mRNA, talvez nas extremidades 5' ou 3' do fragmento de 21-23 nt. Os RNAs pequenos podem ser amplificados por uma polimerase de RNA dirigida por RNA tal como aquela codificada pelo gene *ego-1* em *C. elegans* (Smardon e outros, *Current Biology*, 10:169-178 (2000)) ou o gene *qde-1* em *Neurospora* (Cogoni e Macino, *Nature*, 399:166-9 (1999)), produzindo silenciamento de gene pós-transcricional duradouro na ausência do dsRNA que iniciou o efeito de RNAi. RNAi herdável em *C. elegans* requer que os genes *rde-1* e *rde-4* iniciem, mas não persistam em gerações subsequentes. Os genes *rde-2*, *rde-3*, e *mut-7* em *C. elegans* são requeridos no tecido onde RNAi ocorre, mas não são requeridos para início de RNAi herdável (Grishok e outros, *Science*, na imprensa 2000). Estes genes 'efectores' (Grishok e outros, *Science*, na imprensa 2000) são prováveis a codificar proteínas funcionando na seleção real de alvos de mRNA e em sua clivagem subsequente. ATP pode ser requerida em qualquer de um número de etapas durante RNAi, incluindo formação de complexo no dsRNA, dissociação de fita durante ou após clivagem de dsRNA, emparelhamento dos RNAs de 21-23 nt com o mRNA alvo, clivagem de mRNA, e reciclagem do complexo alvejador. Testar estas idéias com o sistema RNAi *in vitro*

será um desafio importante para o futuro. Alguns genes envolvidos em RNAi também são importantes para silenciamento de transposição e co-supressão. Co-supressão é um amplo fenômeno biológico estendendo-se em plantas, insetos e talvez humanos. O mecanismo o mais provável em *Drosophila melanogaster* é silenciamento transcricional (Pal-Bhanra e outros, Cell 99:35-36). Portanto, fragmentos de 21-23 nt são prováveis a estarem envolvidos em controle transcricional, bem como em controle pós-transcricional.

Exemplo 3 Meridianos 21-23 isolados provocaram interferência específica para seqüência quando adicionados a uma nova reação de RNAi

Isolação de fragmentos de 21-23 nt a partir da reação de incubação de dsRNA de 500 bp em lisado

[0099] RNA de fita dupla (de 500 bp) foi incubado em concentração de 10 nM em lisado de embriões de *Drosophila* por 3 h a 25°C sob condições padrões como descrito aqui. Após desproteinização da amostra, os produtos da reação de 21-23 nt foram separados de dsRNA não processado por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) de desnaturação. Para detecção dos fragmentos de 21-23 nt não rádio-marcados, uma reação de incubação com dsRNA rádio-marcado foi carregada em uma pista separada do mesmo gel. Fatias de gel contendo os fragmentos de 21-23 nt não radioativos foram cortadas fora e os fragmentos de 21-23 nt foram eluídos a partir das fatias de gel a 4°C durante a noite em 0,4 ml de NaCl a 0,3 M. O RNA foi recuperado do sobrenadante por precipitação de etanol e centrifugação. O pellet de RNA foi dissolvido em 10 µl de tampão lise. Como controle, fatias de gel ligeiramente acima e abaixo da faixa de 21-23 nt também foram cortados fora e

submetidas aos mesmos procedimentos de eluição e precipitação. Também um dsRNA não incubado carregado no gel a 15% e uma fatia de gel correspondente a fragmentos de 21-23 nt foi cortada fora e eluída. Todos pellets dos experimentos de controle foram dissolvidos em tampão lise de 10 μ l. As perdas de RNA durante a recuperação a partir das fatias de gel por eluição são aproximadamente 50%.

Incubação de fragmentos de 21-23 nt purificados em ensaio de RNAi baseado em translação

[0100] 1 μ l da solução eluída de 21-23 mers ou de RNA de controle foi usado para uma reação de incubação padrão de 10 μ l de RNAi (veja acima). Os 21-23 mers foram pré-incubados na mistura de reação contendo lisado por 10 ou 30 min antes da adição do mRNA alvo e de controle. Durante a pré-incubação, proteínas envolvidas em interferência de RNA podem se re-associar com os 21-23 mers devido a um sinal específico presente nestes RNAs. A incubação foi continuada por uma outra hora para permitir a translação de mRNAs alvo e de controle. A reação foi temperada pela adição de tampão lise passivo (Promega), e a atividade de luciferase foi medida. A interferência de RNA é expressa como a razão da atividade de luciferase alvo em relação a controle normalizada por um controle tampão livre de RNA. A supressão específica do gene alvo foi observada com quer 10 ou 30 minutos de pré-incubação. A supressão foi reproduzível e reduzida a razão relativa de alvo para controle por 2-3 vezes. Nenhum dos fragmentos de RNA isolados como controles mostrou interferência específica. Para comparação, a incubação de dsRNA de 500 bp e 5 nM (pré-incubação de 10 min) afeta a razão relativa de controle para alvo aproximadamente 30

vezes.

Estabilidade de fragmentos de 21-23 nt isolados em uma nova reação de incubação de lisado

[0101] Consistente com a observação de RNAi mediada por fragmento de RNA de 21-23 nt purificado, foi descoberto que 35% do RNA de 21-23 nt persistem por mais que 3 h em tal reação de incubação. Isto sugere que fatores celulares associam-se com os fragmentos de 21-23 nt desproteinizados e reconstituem uma partícula degradadora de mRNA funcional. Sinais conectados com estes fragmentos de 21-23 nt, ou sua possível natureza de fita dupla ou extensões específicas são provavelmente responsáveis por esta observação. Os fragmentos de 21-23 nt têm um grupo terminal 3' hidroxila, como evidenciado por mobilidade alterada em um gel de sequenciamento seguido de tratamento com periodato e beta-eliminação.

Exemplo 4 21-23 mers purificados por métodos não de desnaturação provocaram interferência específica para seqüência quando adicionados a nova reação de RNAi.

[0102] Cinquenta RNA de fita dupla nanomolar (dsRNA de Rr-luc de 501 bp, como descrito no exemplo 1) foram incubados em uma reação *in vitro* de 1 ml com lisado a 25°C (veja exemplo 1). A reação foi então interrompida pela adição de um volume igual de tampão PK 2x (veja exemplo 1) e proteinase K foi adicionada para uma concentração final de 1,9 µg/µl. A reação foi incubada por um adicional de 1 h a 25°C, fenol extraído, e então os RNAs foram precipitados com 3 volumes de etanol. O precipitado de etanol foi coletado por centrifugação, e o pellet foi re-suspenso em 100 µl de tampão lise e aplicado a uma coluna de filtração de gel Superdex HR 200 10/30

(Pharmacia) funcionando em tampão lise a 0,75 ml/min. Frações de 200 μ l foram coletadas da coluna. Vinte μ l de acetato de sódio 3M e 20 μ g de glicogênio foram adicionados a cada fração, e o RNA foi recuperado por precipitação com 3 volumes de etanol. Os precipitados foram re-suspensos em 30 μ l de tampão lise. Os perfis das colunas seguindo o fracionamento de RNA alimentado marcado com ^{32}P são mostrados na figura 13A.

[0103] Um microlitro de cada fração re-suspensa foi testado em reação padrão de RNAi *in vitro* de 10 μ l (veja exemplo 1). Este procedimento produz uma concentração de RNA na reação de RNAi *in vitro* que é aproximadamente igual à concentração daquelas espécies de RNA na reação original antes de carregamento na coluna. As frações foram pré-incubadas na mistura de reação contendo lisado por 30 min antes da adição de alvo de mRNA de Rr-luc a 10 nM e mRNA de controle de Pp-luc a 10 nM. Durante pré-incubação, as proteínas envolvidas em interferência de RNA podem se re-associar com os 21-23 mers devido a um sinal específico presente nestes RNAs. A incubação foi continuada por umas outras três horas para permitir translação dos mRNAs alvo e de controle. A reação foi temperada pela adição de tampão lise (Promega), e atividade de luciferase foi medida. A supressão de expressão de alvo mRNA de Rr-luc pelos fragmentos de 21-23 nt purificados foi reproduzível e reduziu a razão relativa de alvo para controle em >30 vezes, uma quantidade comparável a um controle de dsRNA de 500 bp a 50 nM. A supressão de expressão de mRNA alvo foi específica: pouco ou nenhum efeito na expressão do controle mRNA de Pp-luc foi observado.

[0104] Os dados mostram que ambas as frações contendo dsRNA não clivado (frações 3-5) ou dsRNA parcialmente clivado longo (frações 7-13) e as frações contendo os siRNAs de 21-23 nt totalmente processados (frações 41-50) medeiam interferência de RNA efetiva *in vitro* (figura 13B). A supressão de expressão de mRNA alvo foi específica: pouco ou nenhum efeito na expressão do controle de mRNA de Pp-luc foi observado (figura 13C). Estes dados, juntos com aqueles nos exemplos anteriores, demonstram que os siRNAs de 21-23 nt são (1) intermediários verdadeiros na trajetória de RNAi e (2) mediadores efetivos de interferência de RNA *in vitro*.

Exemplo 5 Duplicatas de siRNA de 21 nucleotídeos medeiam interferência de RNA em culturas de tecido humano

Métodos

Preparação de RNA

[0105] RNAs de 21 nt foram sintetizados quimicamente usando fosforamiditas e timidina fosforamidita de Expedite RNA (Proligo, Alemanha). Oligonucleotídeos sintéticos foram desprotegidos e purificados com gel (Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl. T., *Genes & Dev.* 15, 188-200 (2001)), seguido por purificação com cartucho Sep-Pak C18 (Waters, Milford, MA, USA) (Tuschl, t., e outros, *Biochemistry*, 32:11658-11668 (1993)). As luciferase GL2 (de acordo com X65324) e GL3 (de acordo com U47296) alvejando seqüências de siRNA corresponderam às regiões de codificação 153-173 em relação ao primeiro nucleotídeo do códon de início, RL (de acordo com AF025846) alvejando siRNAs corresponderam à região 119-129 após o códon de início. RNAs mais longos foram transcritos com polimerase de RNA T7 de produtos PCR, seguido por purificação com gel e Sep-Pak. Os dsRNAs GL2 ou GL3 de 49

e 484 bp corresponderam à posição 113-161 e 113-596, respectivamente, em relação ao início de translação; os dsRNAs RL de 50 e 501 bp corresponderam à posição 118-167 e 118-618, respectivamente. Gabaritos de PCR para GFP (hG) humanizado alvejando síntese de dsRNA foram amplificados a partir de pAD3 (Kehlenbach, R. H., e outros, J. Cell Biol., 141:863-874 (1998)), por meio de que dsRNA hG de 50 e 501 bp corresponderam à posição 118-167 e 118-618, respectivamente, do códon de início.

[0106] Para anelamento de siRNAs, fitas simples de 20 μ M foram incubadas em tampão de anelamento (acetato de potássio a 100 mM, HEPES-KOH a 30 mM em pH 7,4, acetato de magnésio a 2 mM) por 1 min a 90°C seguido por 1 h a 37°C. A etapa de incubação a 37°C foi estendida durante a noite para os dsRNAs de 50 e 500 bp, e estas reações de anelamento foram realizadas em concentrações de fita de 8,4 μ M e 0,84 μ M, respectivamente.

Cultura de célula

[0107] Células S2 foram propagadas em meio Drosophila de Schneider (Life Technologies) suplementadas com FBS a 10%, 100 unidades/ml de penicilina, e 100 μ g/ml de estreptomicina a 25°C. Células 293 de NIH/3T3, HeLa S3, COS-7 foram desenvolvidas a 37°C em meio de Eagle modificado de Dulbecco suplementadas com FBS a 10%, 100 unidades/ml de penicilina, e 100 μ g/ml de estreptomicina. As células foram passadas regularmente para manter desenvolvimento exponencial. 24 h antes da transfecção em confluência de aprox. 80%, células de mamífero foram tripsinizadas e diluídas com meio fresco 1:5 sem antibióticos ($1-3 \times 10^5$ células/ml) e transferidas para placas de 24 poços (500 μ l/poço). As células S2 não foram

tripsinizadas antes da divisão. A transfecção foi executada com reagente Lipofectamina 2000 (Life Technologies) como descrito pelo fabricante para linhas de células aderentes. Por poço, 1,0 μ g de Controle pGL \emptyset (Promega) ou Controle pGL3 (Promega), 0,1 μ g TK-pRL (Promega), e 0,28 μ g de duplicata de siRNA ou dsRNA, formulados com liposomas, foram aplicados; o volume final foi 600 μ l por poço. As células foram incubadas 20 h após transfecção e pareceram saudáveis depois. A expressão de luciferase foi subsequentemente monitorada com ensaio de luciferase Dual (Promega). As eficiências de transfecção foram determinadas por microscópio de fluorescência para linhas de células de mamíferos após co-transfecção de 1,1 μ g de pAD3²² codificando hGFP e 0,28 μ g de siRNA invGL2, e foram 70-90%. Plasmídeos repórteres foram amplificados em Azul XL-1 (Stratagene) e purificados usando o kit Qiagen EndoFree Maxi Plasmid.

Resultados

[0108] Interferência de RNA (RNAi) é o processo de silenciamento de gene pós-transcricional, específico para seqüência, em animais e plantas, iniciado por homólogos de RNA de fita dupla (dsRNA) em seqüência ao gene silenciado (Fire, A., Trends Genet., 15:358-363 (1999)); Sharp, P. A. & Zamore, P. D., Science, 287:2431-2433 (2000)); Sijen, T. & Cooter, J. M., Bioessays, 22:520-531 (2000); Bass, B. L. Cell, 101:235-238 (2000); Hammond, S. M., e outros, Nat. Rev. Genet., 2:110-119 (2001)). Os mediadores de degradação de mRNA específica para seqüência são RNAs interferentes pequenos de 21 e 22 nt (siRNAs) gerados por clivagem de RNase III a partir de dsRNAs⁶⁻¹⁰ mais longos (Hamilton, A. J. & Baulcombe, D. C., Science, 286:950-952 (1999); Hammond, S.

M., e outros, *Nature*, 404:293-296 (2000); Zamore, P. D. e outros, *Cell*, 101:25-33 (2000); Bernstein, E. e outros, *Nature*, 409:363-366 (2001); Elbashir, S. M., e outros, *Genes & Dev.*, 15:188-200 (2001)). Como mostrado aqui, duplicatas de siRNA de 21 nt são capazes de suprimir especificamente expressão de gene repórter em culturas de tecido de mamífero múltiplas, incluindo células de rim (293) e HeLa embriônicas humanas. Em contraste com dsRNAs de 50 ou 500 bp, siRNAs não ativam a resposta de interferon. Estes resultados indicam que duplicatas de siRNA são uma ferramenta geral para inativação específica para seqüência de função de gene em células de mamíferos.

[0109] siRNAs de 21 e 22 nt emparelhados base com extremidades 3' projetantes medeiam degradação de mRNA específica para seqüência eficiente em lisados preparados de embriões de *D. melanogaster* (Elbashir, S. M. e outros, *genes & Dev.*, 15:188-200 (2001)). Para testar se siRNAs também são capazes de mediar RNAi em cultura de tecido, duplicatas de siRNA de 21 nt com extremidades 3' projetantes de 2 nt simétricos dirigidas contra codificação de genes reporteres para amor perfeito do mar (*Renilla reniformis*) e duas seqüências variantes de luciferases de vagalume (*Photinus pyralis*, GL2 e GL3) (figuras 14A, 14B) foram construídas. As duplicatas de siRNA foram co-transfectadas com as combinações de plasmídeo repórter pGL2/pRL ou pGL3/pRL, em células S2 de *D. melanogaster Schneider* ou células de mamíferos usando liposomas catiônicos. As atividades de luciferase foram determinadas 20 h após transfecção. Em todas as linhas de células testadas, a redução específica da expressão dos genes reporteres na presença de duplicatas de siRNA cognato foi

observada (figuras 15A-15J). Notadamente, os níveis de expressão de luciferase absolutos não foram afetados por siRNAs não cognatos, indicando a ausência de efeitos laterais prejudiciais por duplicatas de RNA de 21 nt (p. e., figuras 16A-16D, para células HeLa). Em células S2 de *D. melanogaster* (figuras 15A, 15B), a inibição específica de luciferases foi completa, e similar aos resultados obtidos anteriormente para dsRNAs mais longos (Hammond, S. M., e outros, *Nature*, 404:293-296 (2000); Caplen, N. J. e outros, *Gene*, 252:95-105 (2000); Clemens, M & Williams, B., *Cell*, 13:565-572 (1978); Ui-Tei, K., e outros, *FEBS Letters*, 479:79-82 (2000)). Em células de mamíferos, onde os genes reporteres foram 50 a 100 vezes mais fortes expressados, a supressão específica foi menos completa (figuras 15C-15J). A expressão de GL2 foi reduzida de 3 a 12 vezes, a expressão de GL3 de 9 a 25 vezes, e a expressão de RL de 1 a 3 vezes, em resposta aos siRNAs cognatos. Para células 293, o alvejamento de luciferase de RL por siRNAs de RL foi não efetivo, embora alvos GL2 e GL3 respondessem especificamente (figuras 15I, 15J). É provável que a carência de redução de expressão de RL em células 293 seja devido a sua expressão de 5 a 20 vezes mais alta comparada com qualquer outra linha de células de mamífero testada e/ou com acessibilidade limitada da seqüência alvo devido à estrutura secundária de RNA ou proteínas associadas. Contudo, o alvejamento específico de luciferase de GL2 e de GL3 pelas duplicatas de siRNA cognatos indicou que RNAi também funciona em células 293.

[0110] As extremidades 3' projetantes de 2 nt em todas as duplicatas de siRNA, exceto para uGL2, foram compostos de (2'-deoxi)timidina. A substituição de uridina por timidina na

extremidade 3' projetante foi bem tolerada no sistema *in vitro* de *D. melanogaster*, e a sequência do projetante não foi crítica para o reconhecimento de alvo (Elbashir, S. M. e outros, *Genes & Dev.*, 15:188-200 (2001)). O projetante de timidina foi escolhido, porque ele é suposto a reforçar resistência a nuclease de siRNAs no meio de cultura de tecido e dentro de células transfectadas. De fato, o siRNA GL2 modificado com timidina foi ligeiramente mais potente que o siRNA uGL2 não modificado em todas as linhas de células testadas (figuras 15A, 15C, 15E, 15G, 15I). É concebível que modificações adicionais dos nucleotídeos projetantes em 3' proverão benefícios adicionais ao fornecimento e estabilidade de duplicatas de siRNA.

[0111] Em experimentos de co-transfecção, duplicatas de siRNA a 25 nM com relação ao volume final de meio de cultura de tecido foram usadas (figuras 15A-15J, 16A-16F). Aumentar a concentração de siRNA para 100 nM não intensificou os efeitos de silenciamento específico, mas começou a afetar as eficiências de transfecção devido à competição para encapsulação de liposoma entre DNA plasmídeo e siRNA. Diminuir a concentração de siRNA para 1,5 nM não reduziu o efeito de silenciamento específico, mesmo embora os siRNAs fossem agora somente 2 a 20 vezes mais concentrados que os plasmídeos de DNA. Isto indica que siRNAs são reagentes extraordinariamente poderosos para mediar silenciamento de gene, e que siRNAs são efetivos em concentrações que estão várias ordens de magnitude abaixo das concentrações aplicadas em experimentos de alvejamento de gene anti-sentido ou de ribozima convencionais.

[0112] Para monitorar o efeito de dsRNAs mais longos em

células de mamíferos, dsRNAs de 50 e 500 bp cognatos aos genes reporter foram preparados. Como controle não específico, dsRNAs de GFP humanizada (hg) (Kehlenbach, R. H., e outros, *J. Cell Biol.*, 141:863-874 (1998)) foram usados. Quando dsRNAs foram co-transfectados, em quantidades idênticas (não concentrações) às duplicatas de siRNA, a expressão de gene repórter foi fortemente e não especificamente reduzida. Este efeito é ilustrado para células HeLa como um exemplo representativo (figuras 16A-16D). As atividades de luciferase absoluta foram diminuídas não especificamente 10 a 20 vezes para dsRNA de 50 bp, e de 20 a 200 vezes por co-transfecção de dsRNA de 500 bp, respectivamente. Efeitos não específicos similares foram observados para células COS-7 e NIH/3T3. Para células 293, uma redução não específica de 10 a 20 vezes foi observada somente para dsRNAs de 500 bp. Redução não específica em expressão de gene repórter por dsRNA > 3 bp foi esperada como uma parte da resposta de interferon (Matthews, M., interações entre vírus e o maquinário celular para síntese de proteína em *Translational Control* (Hershey, J., Matthews, M. & Soneneberg, N, eds.) 505-548 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY; 1996); Kumar, M & Carmichael, G. G., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62:1415-1434 (1998); Stark, G. R. e outros, *Annu. Rev. Biochem.*, 67:227-264 (1998)). Surpreendentemente, a despeito da forte diminuição não específica em expressão de gene repórter, silenciamentos mediados por dsRNA, específicos para seqüência adicionais, foram reproduzivelmente detectados. Os efeitos de silenciamento específico, entretanto, foram somente aparentes quando as atividades de gene repórter relativas foram

normalizadas para os controles de dsRNA hG (figuras 16E, 16F). Uma redução específica de 2 a 10 vezes em resposta a dsRNA cognato foi observada, também nas outras três linhas de células de mamífero testadas. Os efeitos de silenciamento específico com dsRNAs (356-1662 bp) foram relatados anteriormente em células CHO-K1, mas as quantidades de dsRNA requeridas para detectar uma redução específica de 2 a 4 vezes foram cerca de 20 vezes mais altas que em nossos experimentos (Ui-Tei, K, e outros, FEBS Letters, 479:79-82 (2000)). Também, células CHO-K1 parecem ser deficientes na resposta de interferon. Em um outro relatório, células 293, NIH/3T3, e BHK-21 foram testadas para RNAi usando combinações reporteres de luciferase/lacZ e lacZ específica de 829 bp ou dsRNA GFP não específica de 717 bp (Caplen, N. J., e outros, Gene, 252:95-105 (2000)). A falha em detectar RNAi neste caso é provavelmente devido ao ensaio de reporter de luciferase/lacZ menos sensível e às diferenças de comprimento de dsRNA alvo e de controle. Tomados juntos, os resultados descritos aqui indicam que RNAi é ativa em células de mamífero, mas o efeito de silenciamento é difícil de detectar se o sistema interferon é ativado por dsRNA > 30 bp.

[0113] O mecanismo do processo de interferência mediado por siRNA de 21 nt em células de mamífero resta a ser descoberto, e silenciamento pode ocorrer pós transcricional e/ou transcricional. Em lisado de *D. melanogaster*, duplicatas de siRNA medeiam silenciamento de gene pós-transcricional por reconstituição de um complexo de siRNA-proteína (siRNPs), que estão guiando reconhecimento de mRNA e alvejaram clivagem (Hammond, S. M., e outros, Nature, 404:293-296 (2000); Zamore, P. D. e outros., Cell, 101:25-33 (2000); Elbashir, S.

M., e outros, *Genes & Dev.*, 15:188-200 (2001)). Em plantas, silenciamento pós-transcricional mediado por dsRNA também foi ligado a metilação de DNA dirigida para RNA, que também pode ser dirigida por siRNAs de 21 nt (Wassenegger, M., *Plant Mol. Biol.*, 43:203-220 (2000); Finnegan, E. J., e outros, *Curr. Biol.*, 11:R99-R102 (2000)). A metilação de regiões promotoras pode levar a silenciamento transcricional (Metter, M. F., e outros, *EMBO J.*, 19:5194-5201 (2000)), mas a metilação em seqüências de codificação não deve (Wang, M. -B., *RNA*, 7:16-28 (2001)). A metilação de DNA e silenciamento transcricional em mamíferos são processos bem documentados (Kass, S. U., *Trends Genet.*, 13:444-449 (1997); Razin, A., *EMBO J.*, 17:4905-4908 (1998)), ainda que eles não tenham sido ligados a silenciamento pós-transcricional. A metilação em mamíferos é predominantemente dirigida contra resíduos de CpG. Devido a não existir CpG no siRNA RL, mas siRNA RL medeia silenciamento específico em cultura de tecido de mamífero, é improvável que metilação de DNA seja crítica para nosso processo de silenciamento observado. Em resumo, é descrito aqui, silenciamento de gene mediado por siRNA em células de mamífero. O uso de siRNAs de 21 nt mantém grande promessa para inativação de função de gene em cultura de tecido humano e o desenvolvimento de terapêuticos específicos para gene.

[0114] Embora esta invenção tenha sido particularmente mostrada e descrita com referência a configurações específicas desta, será entendido pelos técnicos no assunto que várias alterações na forma e detalhes podem ser feitas sem se desviar do escopo da invenção abrangido pelas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para avaliar um agente agindo em um produto de gene, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) introduzir RNA de fita dupla de 21 a 23 nucleotídeos o qual visa o mRNA do gene para degradação dentro de uma célula animal *in vitro*;

(b) manter a célula *in vitro* de (a) sob condições nas quais a degradação do mRNA ocorre;

(c) introduzir o agente dentro da célula de (b); e

(d) determinar se o agente tem um efeito na célula, sendo que, se o agente possui um efeito na célula, então o agente age no produto de gene ou em uma rota biológica que envolve o produto de gene, sendo que o gene codifica um mRNA celular ou um mRNA viral.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o RNA de fita dupla de 21 a 23 nucleotídeos ser quimicamente sintetizado ou um análogo de RNA que media a interferência de RNA.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o RNA de fita dupla compreender um grupo hidroxila 3' terminal.

4. Método para avaliar se um produto de gene é um alvo adequado para descoberta de drogas, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) introduzir o RNA de fita dupla de 21 a 23 nucleotídeos que visam o mRNA do gene para degradação dentro de uma célula animal *in vitro*;

(b) manter a célula *in vitro* de (a) sob condições nas quais a degradação do mRNA ocorre, resultando na expressão diminuída do gene; e

(c) determinar o efeito da expressão diminuída do gene na célula, sendo que se a expressão diminuída tiver um efeito, então o produto de gene é um alvo para descoberta de drogas, sendo que o gene codifica um mRNA celular ou um mRNA viral.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de o RNA de fita dupla de 21 a 23 nucleotídeos ser um RNA sintético ou um análogo de RNA que media a interferência de RNA.

6. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de o RNA compreender um grupo hidroxila 3' terminal.

7. Método para avaliar se um produto de gene é um alvo adequado para avaliar a habilidade de um agente agir no produto de gene, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) introduzir o RNA de 21 a 23 nucleotídeos que visam o mRNA do gene para degradação dentro de uma célula *in vitro*;

(b) manter a célula de (a) sob condições nas quais a degradação do mRNA ocorre, resultando na expressão diminuída do gene; e

(c) determinar o efeito da expressão diminuída do gene na célula, sendo que se a expressão diminuída tiver um efeito, então o produto do gene é um alvo para avaliar a habilidade de um agente agir no produto de gene.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de o RNA de fita dupla de 21 a 23 nucleotídeos ser RNA quimicamente sintetizado ou RNA que inclui nucleotídeos de ocorrência não natural ou desoxirribonucleotídeos.

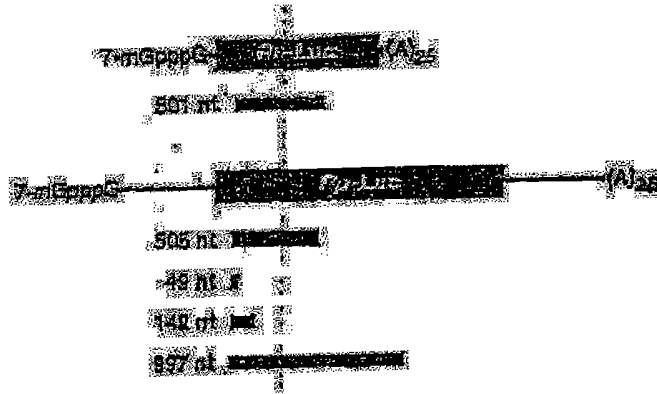


FIG.1

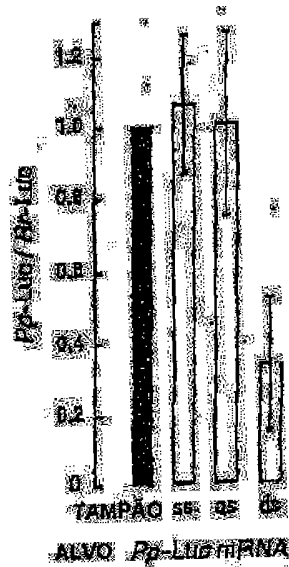


FIG.2A



FIG.2B

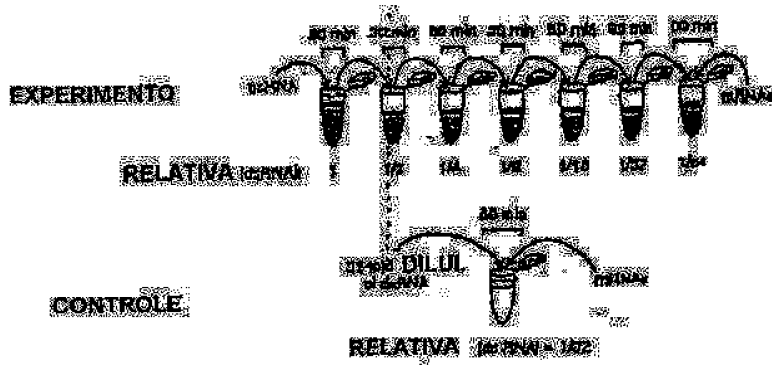


FIG.3A



FIG.3B

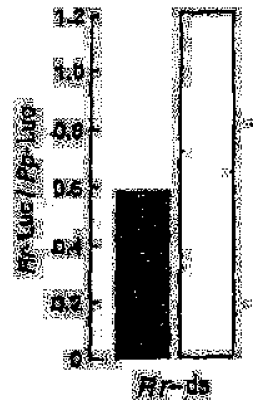


FIG.3C

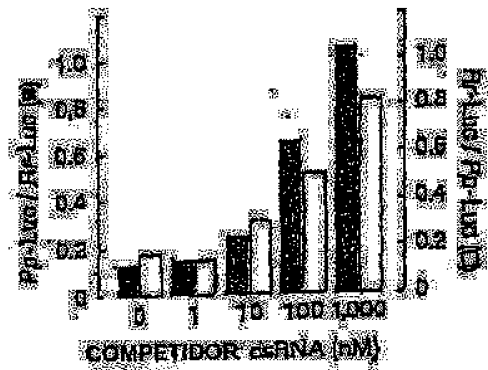


FIG.4

3/11

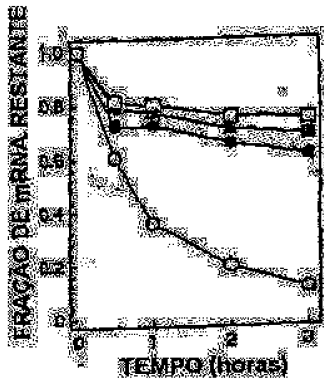


FIG. 5A

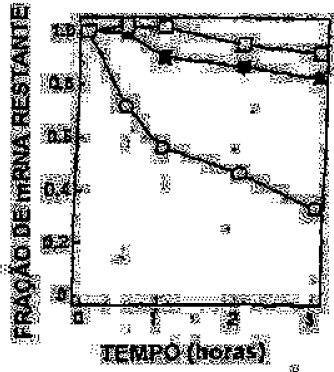


FIG. 5B

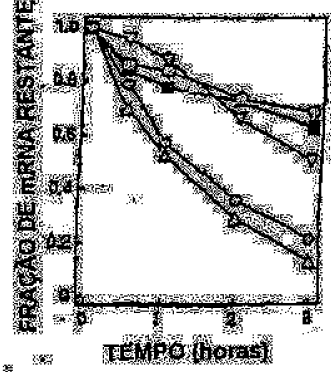


FIG. 5C

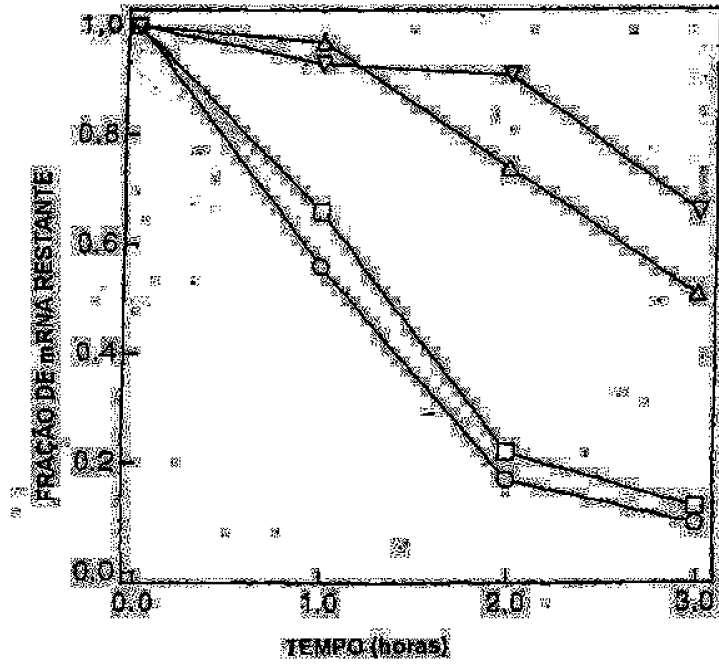


FIG. 6

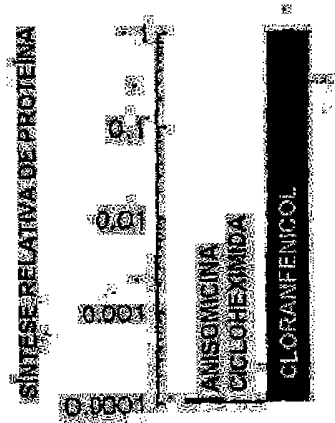


FIG.7A

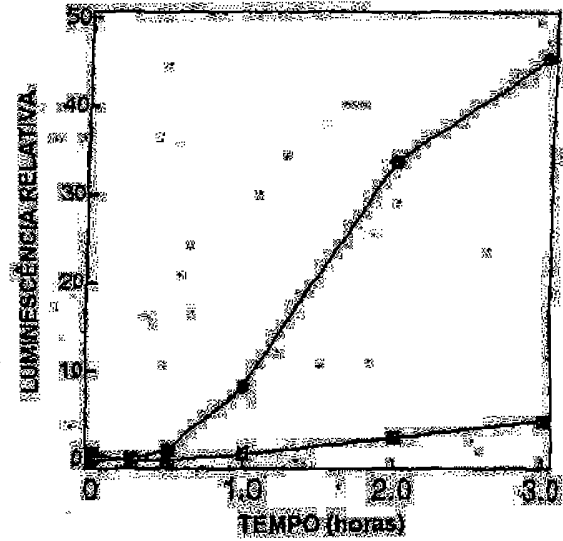


FIG.7B

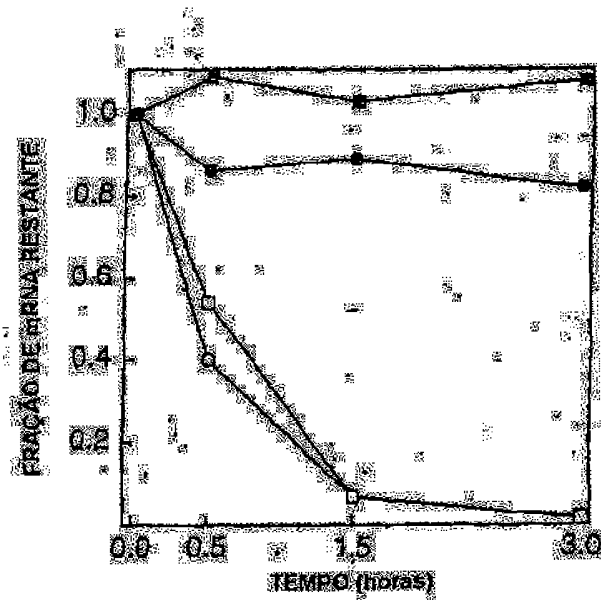


FIG.7C

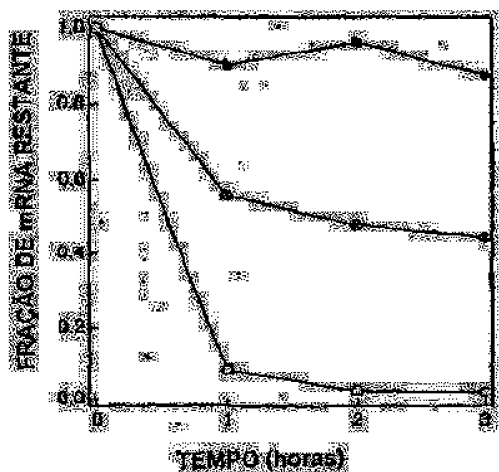


FIG. 8A

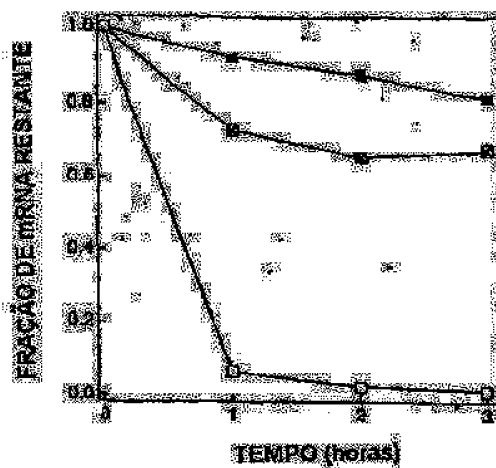


FIG. 8B

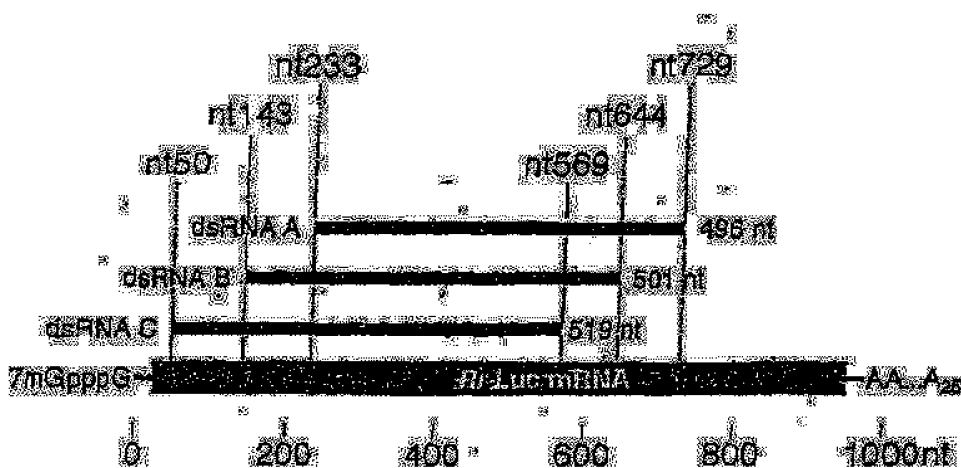


FIG. 9

```

7mGpppGAAUACAAGCCUUGGGCCUAGCCACCAUGACUUUGAAAGUUAUGAUGG
AGAAAGAAAGGAAACCGCAUGAUACUUGGUCCGGAGUGGUGGCGCCAGAAUG
UAAAGAAAUGA AUGUUCUUGAUUCAUUUAUUAUUAUUAUGAUUCAGAAA
AACAUUCAGAAAUGGUGUUAUUUUUUUAUAUGSUAAACGGCGCCUUCUU
UUUAUUUAUGGGGACALIGUUGUUCACAUUAUUGAGCCAGUAGCGCGGU
GUUUUAUACCAGACCUUAUUGSUUU...
    
```

FIG.10

SILENCIAMENTO DE GENE ESPECIFICO PARA SEQUENCIA POR FRAGMENTOS DE 21-23 nt

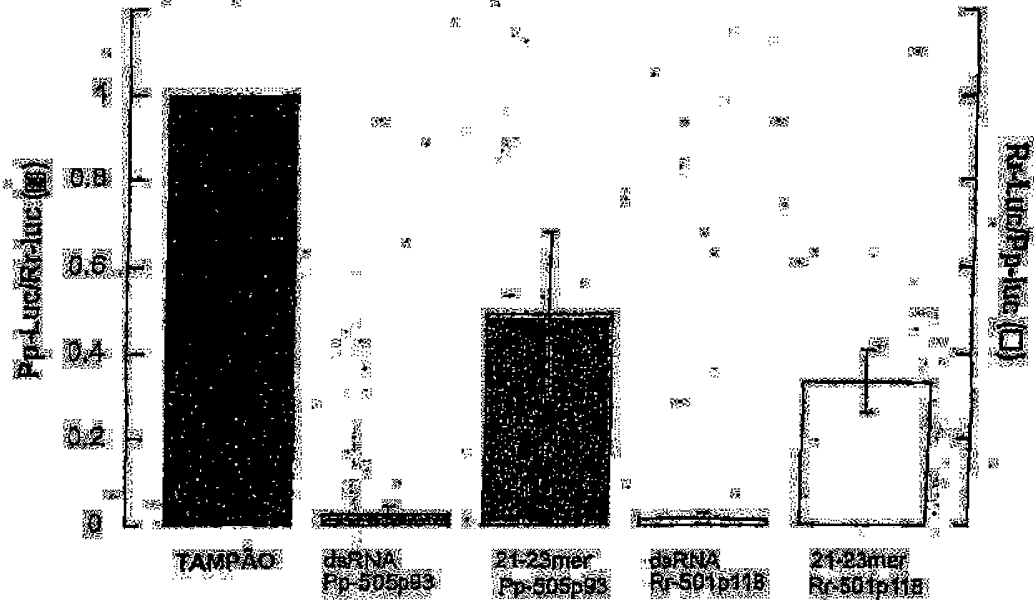


FIG.12

7/11

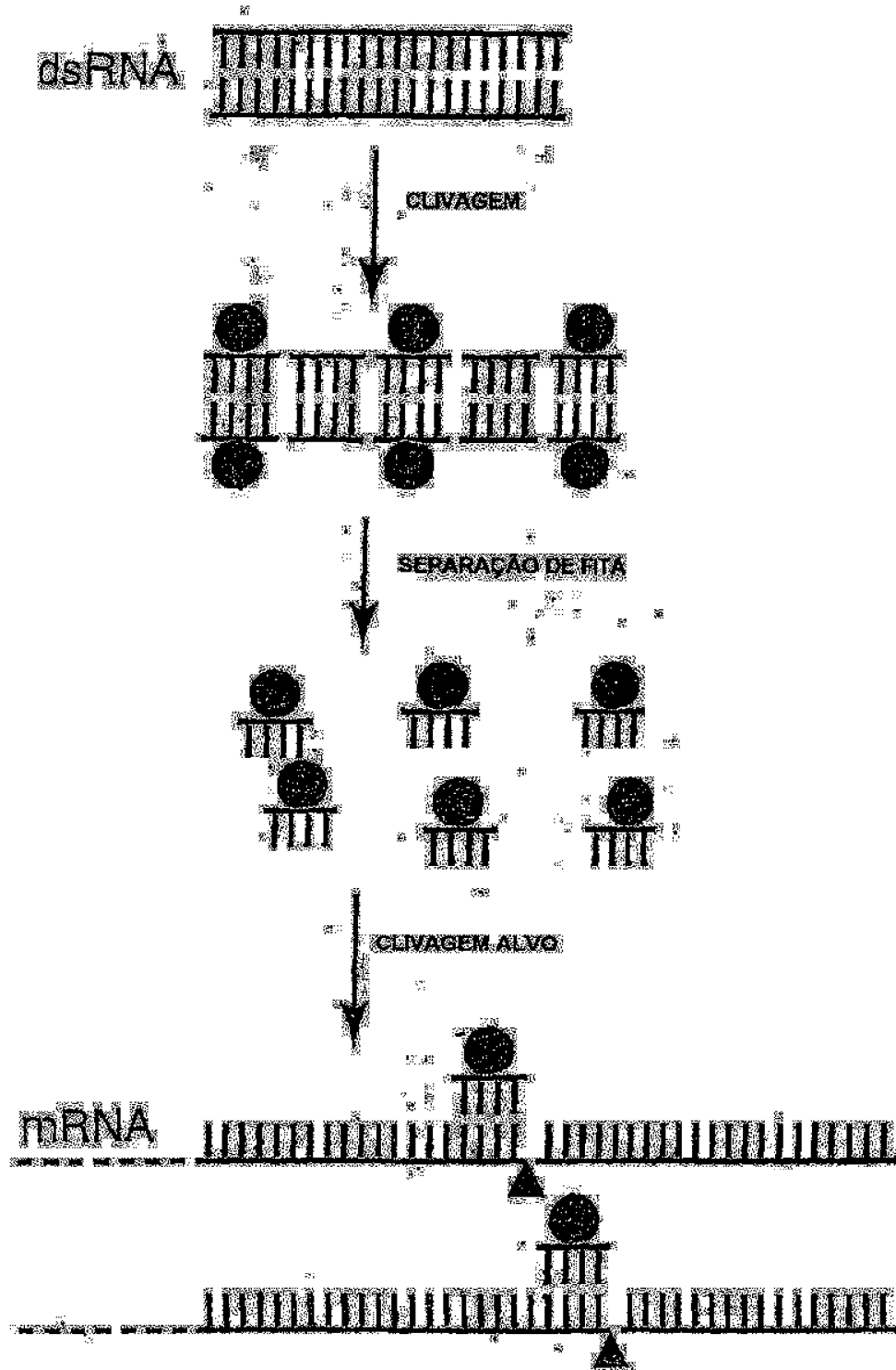


FIG. 11

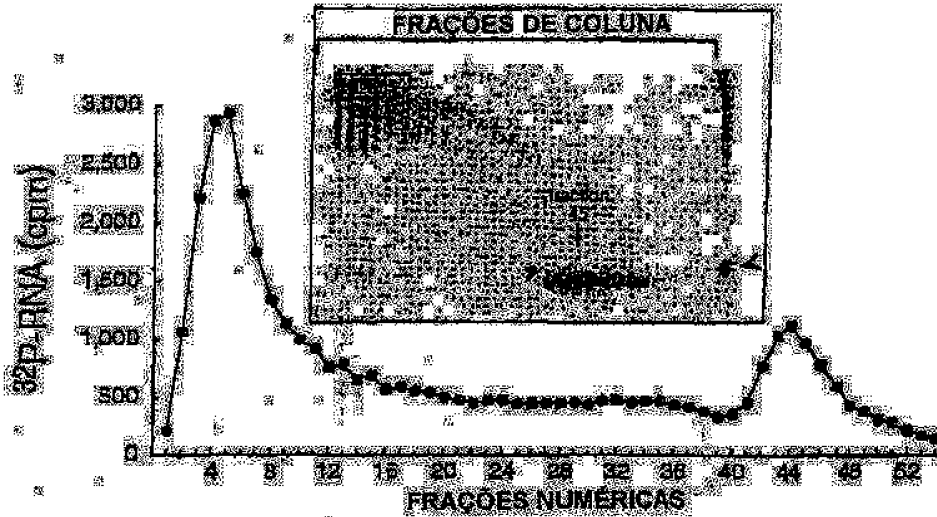


FIG.13A

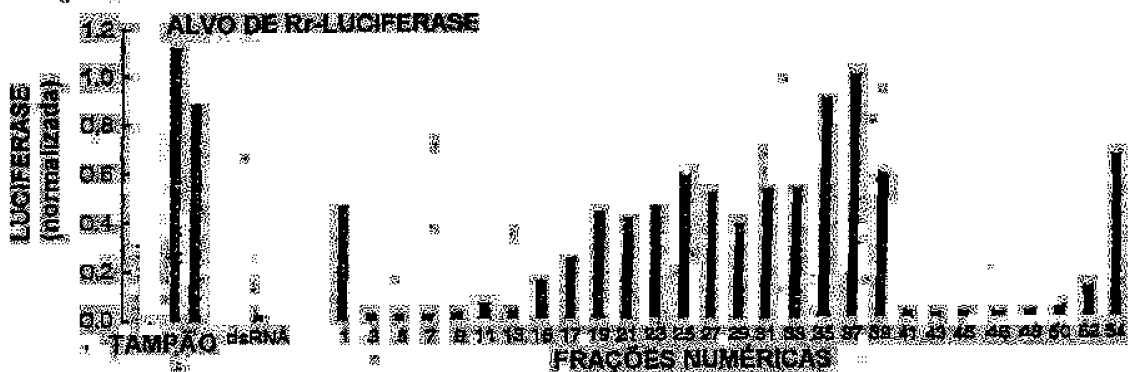


FIG.13C

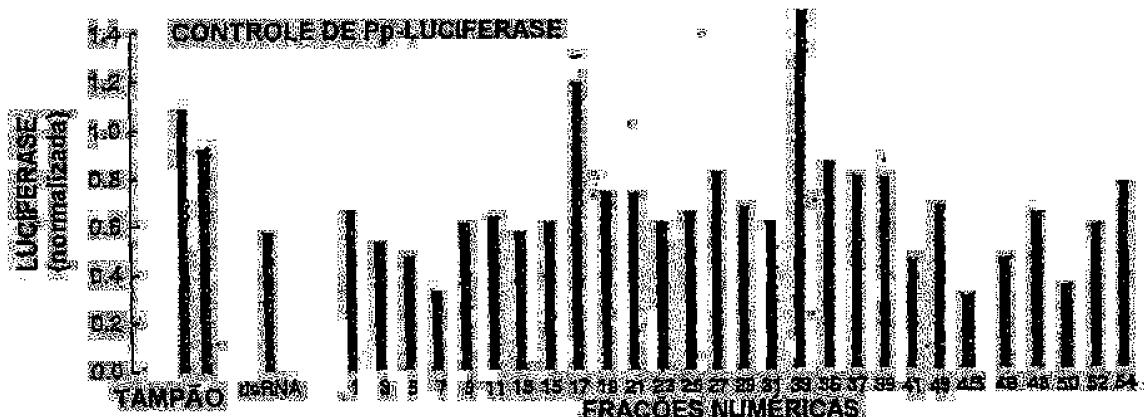


FIG.13C

9/11

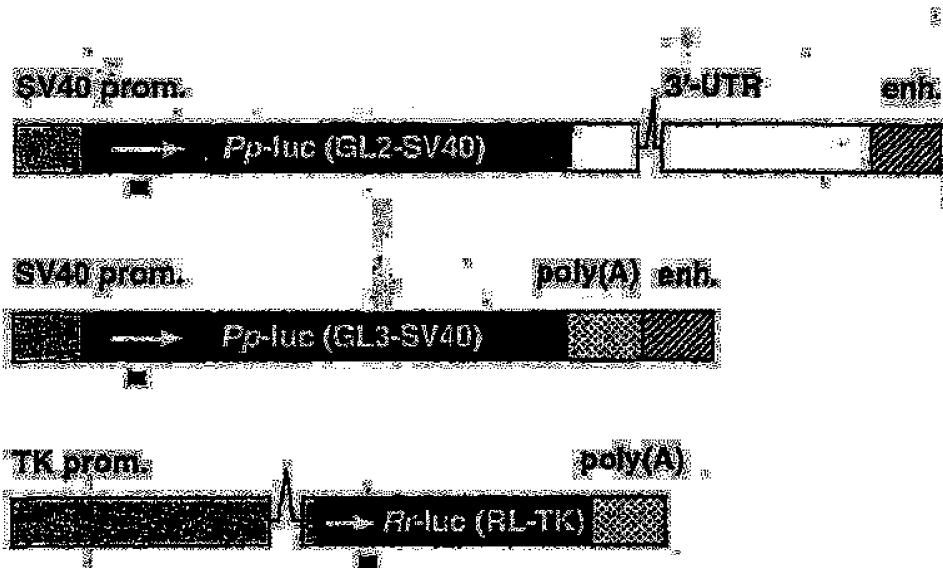


FIG.14A

sRNA
duplex

UGL2

5' GGUACCGCGAGACUUCGATU
DUGGAUGCGCCUAGAGACCU 3'

GL2

5' GGUACCGCGAGACUUCGATU
DUGGAUGCGCCUAGAGACCU 3'

GL3

5' GGUACCGCGAGACUUCGATU
DUGGAUGCGCCUAGAGACCU 3'

invGL2

5' AGCUCGCAAGGCGCAGGCTT
TUGGCAAGUAGUCCGCGACG 3'

RL

5' AAACAGCCAGAAAGCCGCTT
TUUUGGACCGCUGUAGACGAC 3'

FIG.14B

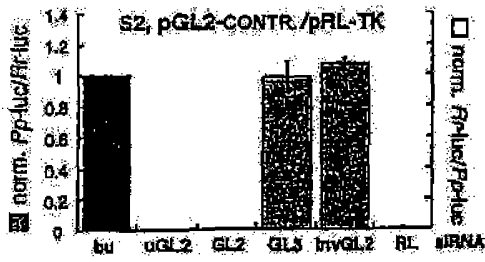


FIG. 15A

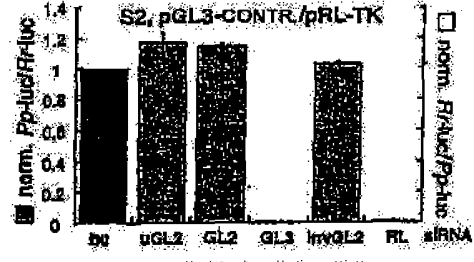


FIG. 15B

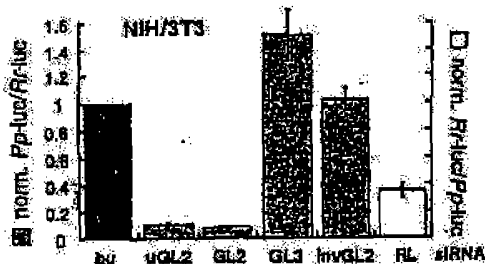


FIG. 15C

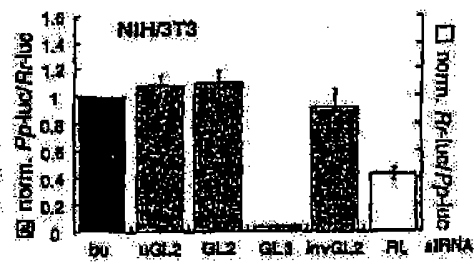


FIG. 15D

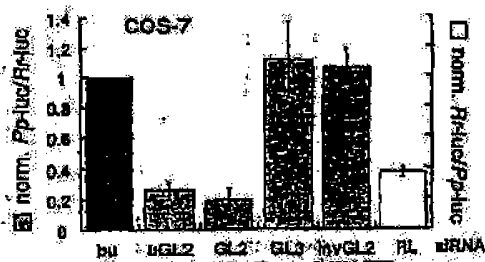


FIG. 15E

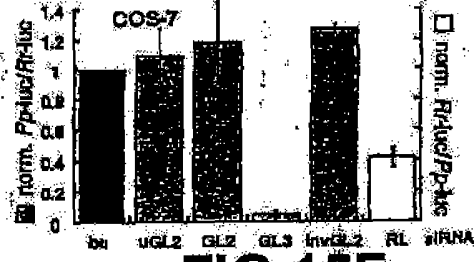


FIG. 15F

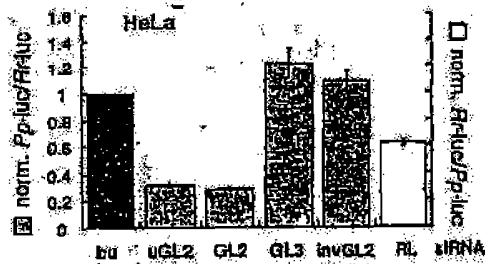


FIG. 15G

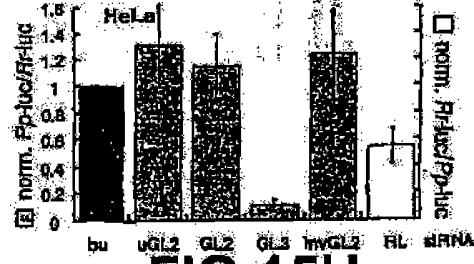


FIG. 15H

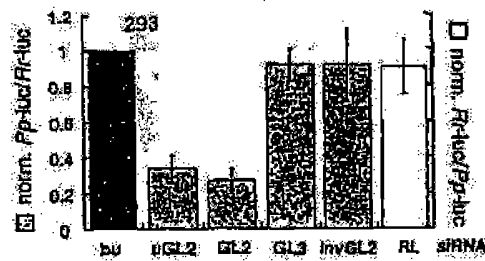


FIG. 15I

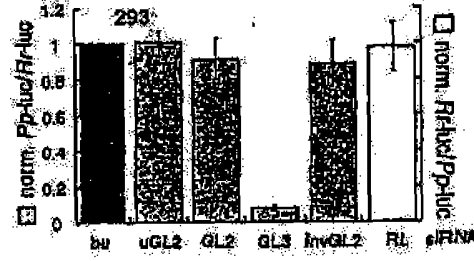


FIG. 15J

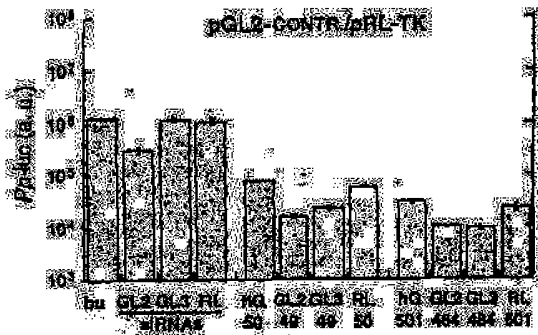


FIG. 16A

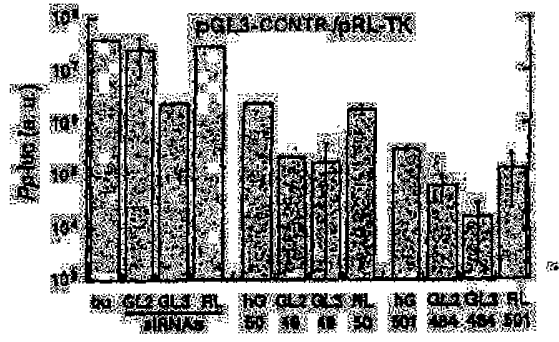


FIG. 16B

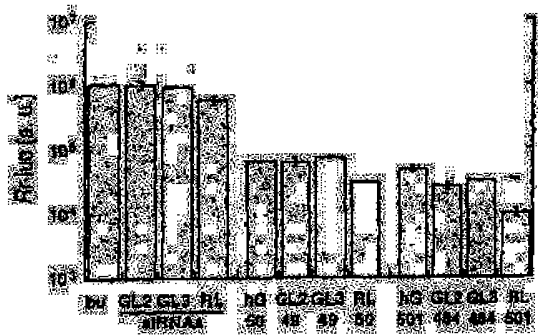


FIG. 16C

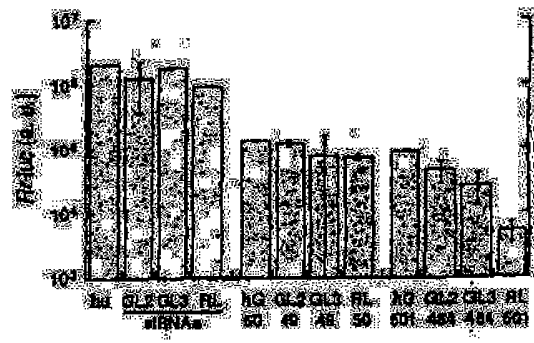


FIG. 16D

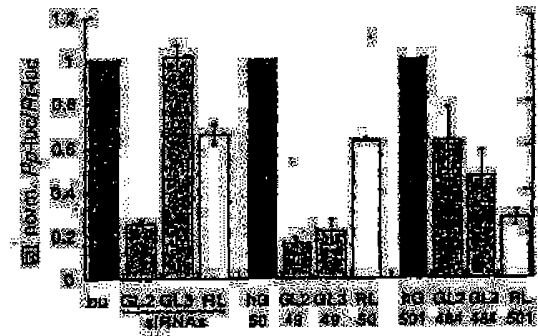


FIG. 16E

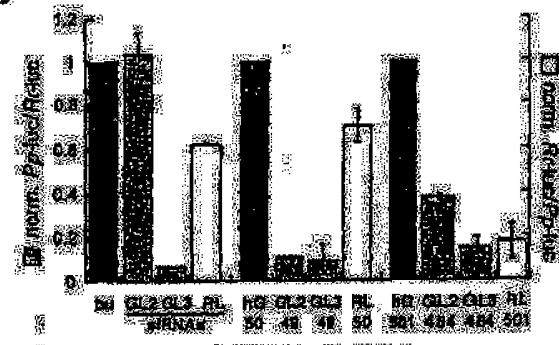


FIG. 16F

RESUMO

“MÉTODO PARA AVALIAR UM AGENTE AGINDO EM UM PRODUTO DE GENE, MÉTODO PARA AVALIAR SE UM PRODUTO DE GENE É UM ALVO ADEQUADO PARA DESCOBERTA DE DROGAS E MÉTODO PARA AVALIAR SE UM PRODUTO DE GENE É UM ALVO ADEQUADO PARA AVALIAR A HABILIDADE DE UM AGENTE AGIR NO PRODUTO DE GENE”

A presente invenção relaciona-se com um sistema *in vitro* de *Drosophila* que foi usado para demonstrar que dsRNA é processado para segmentos de RNA de 21-23 nucleotídeos de comprimento. Além disso, quando estes fragmentos de 21-23 nt são purificados e adicionados de volta aos extratos de *Drosophila*, eles medeiam interferência de RNA na ausência de dsRNA longo. Portanto, estes fragmentos de 21-23 nt são os mediadores específicos para seqüência de degradação de RNA. Um sinal molecular, que pode ser seu comprimento específico, deve estar presente nestes fragmentos de 21-23 nt para recrutar fatores celulares envolvidos em RNAi. Esta presente invenção abrange estes fragmentos de 21-23 nt e seu uso para inativar especificamente função de gene. O uso destes fragmentos (ou oligonucleotídeos sintetizados quimicamente de natureza igual ou similar) habilita o alvejamento de mRNAs específicos para degradação em células de mamíferos, onde o uso de dsRNAs longos para produzir função de gene é útil em aplicações genômicas e terapêuticas funcionais.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



9FBF6F848677754B

Campo 2



EA4C98FD44D154D3

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: WHITE003B.txt
- Data de Geração do Código: 01-04-2016
- Hora de Geração do Código: 13:02:04
- Código de Controle:
 - Campo 1: 9FBF6F848677754B
 - Campo 2: EA4C98FD44D154D3