



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

(21) PI 0809130-7 A2



* B R P I 0 8 0 9 1 3 0 A 2 *

(22) Data de Depósito: 20/03/2008
(43) Data da Publicação: 26/08/2014
(RPI 2277)

(51) Int.Cl.:
C07H 21/04

(54) Título: COMPOSIÇÕES COMBINADAS HAIRPIN-
ANTISENSE E MÉTODOS PARA MODULAÇÃO DA
EXPRESSÃO **(57) Resumo:**

(30) Prioridade Unionista: 21/03/2007 US 60/896,212

(73) Titular(es): Brookhaven Science Associates, LLC

(72) Inventor(es): John Shanklin, Tam Nguyen

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2008057704 de
20/03/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/116094de
25/09/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COMPOSIÇÕES COMBINADAS HAIRPIN-ANTISSENSE E MÉTODOS PARA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO"**.

5 A presente invenção foi feita com apoio governamental sob a Subvenção Nº DE-AC02-98CH10886 concedida pelo "U.S. Department of Energy". O Governo dos Estados Unidos possui certos direitos na invenção.

REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE

10 Este pedido reivindica o benefício da data de depósito do Pedido Provisório de Patente U.S. Número de Série 60/896.212, depositado em 21 de março de 2007, para "COMBINED HAIRPIN-ANTISENSE COMPOSITIONS AND METHODS FOR MODULATING EXPRESSION".

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

15 A supressão antissenso refere-se à ligação de uma fita "antissenso" de um ácido nucleico a um gene ou mRNA, evitando, dessa forma, a expressão do gene ou tradução do mRNA. Tipicamente, para supressão antissenso, um cassete de expressão é projetado para expressar uma molécula de RNA complementar a todo ou parte de um mRNA que codifica um alvo. A superexpressão da molécula de RNA antissenso pode resultar na expressão reduzida do gene nativo.

20 O polinucleotídeo para uso na supressão antissenso pode corresponder a todo ou parte do complemento da sequência que codifica o alvo, todo ou parte do complemento da região não traduzida 5' e/ou 3' do transcrito-alvo, e/ou todo ou parte do complemento tanto da sequência codificadora quanto das regiões não traduzidas de um transcrito que codifica o alvo. Além disso, o polinucleotídeo antissenso pode ser totalmente complementar (ou seja, 100% idêntico ao complemento da sequência-alvo) ou parcialmente complementar (ou seja, menos de 100% idêntico ao complemento da sequência-alvo) à sequência-alvo. A supressão antissenso pode ser usada para inibir a expressão de múltiplas proteínas na mesma célula ou organismo, como descrito, por exemplo, na Patente U.S. Nº 5.952.657. Além disso, porções dos nucleotídeos antissenso podem ser usadas para romper a expressão do gene-alvo. Geralmente, sequências de pelo menos 50, 100, 200, 300,

500 ou 550 nucleotídeos podem ser usadas. Métodos para a utilização de supressão antissenso para inibir a expressão de genes endógenos em plantas são descritos, por exemplo, em Liu e outros (2002) *Plant Physiol.* 129: 1.732-1.753 e Patentes U.S. N^{os} 5.759.829 e 5.952.657. A eficiência da supressão antissenso pode ser aumentada por inclusão de uma região poli-dT no cassete de expressão em uma posição 3' em relação à sequência antissenso e 5' do sinal de poliadenilação. Veja Publicação de Patente U.S. N^o 20020058815.

Interferência de RNA refere-se ao processo de silenciamento gênico pós-transcricional sequência-específico em animais mediado por RNAs de interferência (siRNAs) curtos (Fire e outros, 1998, *Nature*, 391, 806; Hamilton e outros, 1999, *Science*, 286, 950-951). O processo correspondente em plantas é comumente denominado silenciamento gênico pós-transcricional ou silenciamento de RNA, e também é denominado repressão (*quelling*) em fungos. Acredita-se que o processo de silenciamento gênico pós-transcricional seja um mecanismo de defesa celular evolucionariamente conservado usado para evitar a expressão de genes estranhos e é comumente compartilhado por flora e filos diversos (Fire e outros, 1999, *Trends Genet.*, 15, 358). Essa proteção da expressão de gene estranho pode ter evoluído em resposta à expressão de RNAs de fita dupla (dsRNAs) derivados de infecção viral ou da integração aleatória de elementos de transposon no genoma de um hospedeiro por meio de uma resposta celular que destrói especificamente RNA de fita simples homólogo ou RNA genômico viral. A presença de dsRNA nas células desencadeia a resposta de RNAi por meio de um mecanismo que ainda não foi plenamente caracterizado. Esse mecanismo parece ser diferente da resposta de interferon que resulta da ativação mediada por dsRNA de proteína quinase PKR e 2',5'-oligoadenilato sintetase resultando na clivagem não específica de mRNA por ribonuclease L.

A presença de dsRNAs longos em células estimula a atividade de uma enzima ribonuclease denominada *dicer*. *Dicer* está envolvida no processamento do dsRNA em pedaços curtos de dsRNA conhecidos como RNAs de interferência curtos (siRNAs) (Hamilton e outros, supra; Berstein e

outros, 2001, *Nature*, 409, 363). RNAs de interferência curtos derivados da atividade de *dicer* possuem tipicamente comprimento de cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos e compreendem cerca de 19 cópias de pares de bases (Hamilton e *outros*, supra; Elbashir e *outros*, 2001, *Genes Dev.*, 15, 188).

5 *Dicer* também foi implicada na excisão de pequenos RNAs temporais (stRNAs) de 21 e 22 nucleotídeos do RNA precursor de estrutura conservada que estão implicados no controle da tradução (Hutvagner e *outros*, 2001, *Science*, 293, 834). A resposta de RNAi também apresenta um complexo de endonuclease, comumente denominado complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que medeia a clivagem de RNA de fita simples que possui

10 sequência complementar à fita antissenso do dúplice de siRNA. A clivagem do RNA-alvo ocorre no meio da região complementar à fita antissenso do dúplice de siRNA (Elbashir e *outros*, 2001, *Genes Dev.*, 15, 188).

RNAi foi estudado em vários sistemas. Fire e *outros*, 1998, *Nature*, 391, 806, foram os primeiros a observar RNAi em *C. elegans*. Bahramian e Zarbl, 1999, *Molecular and Cellular Biology*, 19, 274-283 e Wianny e Goetz, 1999, *Nature Cell Biol.*, 2, 70, descrevem RNAi mediado por dsRNA em sistemas de mamíferos. Hammond e *outros*, 2000, *Nature*, 404, 293, descrevem RNAi em células de *Drosophila* transfectadas com dsRNA. Elbashir e

15 *outros*, 2001, *Nature*, 411, 494, descrevem RNAi induzido por introdução de cópias de RNAs sintéticos de 21 nucleotídeos em células de mamíferos cultivadas, incluindo células renais embrionárias humanas e células HeLa. Métodos para a utilização de interferência dsRNA para inibir a expressão de genes de planta endógenos são descritos em Waterhouse e *outros* (1998)

20 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13.959-13.965, Liu e *outros* (2002) *Plant Physiol.* 129: 1.732-1.753 e WO 99/59029, WO 99/53050, WO 99/61631 e WO 00/59035.

Foram descritos métodos de RNAi adicionais relacionados à inibição da expressão de um ou mais alvos obtidos por interferência de RNA

30 *hairpin* (hpRNA) ou interferência de RNA *hairpin* contendo íntron (ihpRNA). Esses métodos são altamente eficientes na inibição da expressão de genes endógenos. Veja Waterhouse e Helliwell (2003) *Nat. Rev. Genet.* 5: 29-38 e

as referências nele citadas.

Para interferência de hpRNA, o cassete de expressão é projetado para expressar uma molécula de RNA que hibridiza com ela própria para formar uma estrutura de *hairpin* que compreende uma região da alça de fita
5 simples e uma haste com bases pareadas. A região da haste com bases pareadas compreende uma sequência sentido que corresponde a todo ou parte do RNA mensageiro endógeno que codifica o gene cuja expressão se deseja inibir, e uma sequência antissenso que é total ou parcialmente complementar à sequência sentido. Dessa forma, a região da haste com bases
10 pareadas da molécula geralmente determina a especificidade da interferência de RNA. Moléculas de hpRNA são altamente eficientes na inibição da expressão de genes endógenos, e a interferência de RNA que induzem é herdada por gerações subsequentes. Veja, por exemplo, Chuang e Meyerowitz (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 5.985- 5.990; Stoutjesdijk e outros
15 (2002) *Plant Physiol.* 129: 1.723-1.731; e Waterhouse e Helliwell (2003) *Nat. Rev. Genet.* 5: 29-38. Métodos para a utilização de interferência de hpRNA para inibir ou silenciar a expressão de genes são descritos, por exemplo, em Chuang e Meyerowitz (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 5.985-5990; Stoutjesdijk e outros (2002) *Plant Physiol.* 129: 1.723-1.731; Waterhouse e
20 Helliwell (2003) *Nat. Rev. Genet.* 5: 29-38; Pandolfini e outros *BMC Biotechnology* 3: 7 e Publicação de Patente U.S. Nº 20030175965. Um ensaio transitório para a eficiência de construções de hpRNA para silenciar a expressão gênica *in vivo* foi descrito por Panstruga e outros (2003) *Mol. Biol. Rep.* 30: 135-150.

25 Para ihpRNA, as moléculas de interferência possuem a mesma estrutura geral que hpRNA, mas a molécula de RNA adicionalmente compreende um íntron que é capaz de ser unido na célula na qual o ihpRNA é expresso. O uso de um íntron minimiza o tamanho da alça na molécula de RNA *hairpin* após splicing, o que aumenta a eficiência de interferência. Veja,
30 por exemplo, Smith e outros (2000) *Nature* 507: 319-320. Na verdade, Smith e outros mostram 100% de supressão da expressão do gene endógeno usando interferência mediada por ihpRNA. Métodos para a utilização de inter-

ferência de ihpRNA para inibir a expressão de genes são descritos, por exemplo, em Smith e outros (2000) *Nature* 507: 319-320; Wesley e outros (2001) *Plant J.* 27:581-590; Wang e Waterhouse (2001) *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 156-150; Waterhouse e Helliwell (2003) *Nat. Rev. Genet.* 5: 29-38; Helliwell e Waterhouse (2003) *Methods* 30: 289-295 e Publicação de Patente U.S. Nº 20030180955.

Outros relataram em vários RNAi e sistemas de silenciamento gênico. Por exemplo, Parrish e outros, 2000, *Molecular Cell*, 6, 1.077-1.087, descrevem constructos de siRNA específicas modificadas quimicamente direcionadas ao gene *unc-22* de *C. elegans*. Grossniklaus, Publicação Internacional PCT Nº WO 01/38551, descreve certos métodos para a regulação da expressão gênica *polycomb* em plantas usando certos dsRNAs. Churikov e outros, Publicação Internacional PCT Nº WO 01/42443, descrevem certos métodos para a modificação de características genéticas de um organismo usando certos dsRNAs. Cogoni e outros, Publicação Internacional PCT Nº WO 01/53475, descrevem certos métodos para o isolamento de um gene de silenciamento de *Neurospora* e usos deste. Reed e outros, Publicação Internacional PCT Nº WO 01/68836, descrevem certos métodos para o silenciamento gênico em plantas. Honer e outros, Publicação Internacional PCT Nº WO 01/70944, descrevem certos métodos de avaliação de fármacos usando nematódeos transgênicos como modelos da doença de Parkinson usando certos dsRNAs. Deak e outros, Publicação Internacional PCT Nº WO 01/72774, descrevem certos produtos gênicos derivados de *Drosophila* que podem estar relacionados ao RNAi em *Drosophila*. Arndt e outros, Publicação Internacional PCT Nº WO 01/92513 descrevem certos métodos para a mediação de supressão gênica pela utilização de fatores que aumentam RNAi. Tuschl e outros, Publicação Internacional PCT Nº WO 02/44321, descrevem certas construções sintéticas de siRNA. Pachuk e outros, Publicação Internacional PCT Nº WO 00/63364, e Satishchandran e outros, Publicação Internacional PCT Nº WO 01/04313, descrevem certos métodos e composições para a inibição da função de certas sequências de polinucleotídeos com a utilização de certos dsRNAs. Echeverri e outros, Publicação Interna-

cional PCT N° WO 02/38805, descrevem certos genes de *C. elegans* identificados por meio de RNAi. Kreutzer e outros, Publicações Internacionais PCT N°s WO 02/055692, WO 02/055693 e EP 1144623 B1 descrevem certos métodos para a inibição de expressão gênica com o uso de RNAi. Graham e outros, Publicações Internacionais PCT N°s WO 99/49029 e WO 01/70949 e AU 4037501 descrevem certas moléculas de siRNA expressas por vetor. Fire e outros, Patente U.S. N° 6.506.559, descrevem certos métodos para a inibição de expressão gênica *in vitro* usando certas construções de dsRNA longo (acima de 25 nucleotídeo) que medeiam RNAi.

10 Embora muitos trabalhos tenham sido feitos na área do silenciamento gênico usando tecnologia de RNAi e antissenso, aperfeiçoamentos que permitissem a modulação aumentada da expressão gênica sobre tecnologia de RNAi ou antissenso seriam um aprimoramento na técnica.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

15 Uma modalidade de exemplo da presente invenção fornece um constructo de nucleotídeos, que compreende: uma sequência de nucleotídeos que forma uma haste e uma alça; em que a alça compreende uma primeira sequência de nucleotídeos que modula a expressão de um alvo; em que a haste compreende uma segunda sequência de nucleotídeos que modula a expressão de um alvo; e em que o alvo modulado pela primeira sequência de nucleotídeos e o alvo modulado pela segunda sequência de nucleotídeos podem ser iguais ou diferentes.

20 Em uma modalidade de exemplo adicional, a primeira sequência de nucleotídeos que modula a expressão de um alvo modula a expressão do alvo por meio da via de RNAi. Em uma modalidade de exemplo adicional, a primeira sequência de nucleotídeos que modula a expressão de um alvo modula a expressão do alvo por meio da modulação antissenso da expressão.

25 Uma modalidade particular da presente invenção fornece um constructo de nucleotídeos, que compreende: uma sequência de nucleotídeos que forma uma haste e uma alça; e um gene de interesse ligado operacionalmente a um promotor, em que a haste compreende uma segunda

sequência de nucleotídeos que modula a expressão de um alvo; e em que a alça compreende uma primeira sequência de nucleotídeos que pode ou não modular a expressão de um alvo. Em uma modalidade de exemplo adicional, o gene de interesse ligado operacionalmente a um promotor está localizado na alça.

Outra modalidade da presente invenção fornece um vetor que compreende as sequências que codificam as sequências de nucleotídeos, como descrito previamente. Uma modalidade alternativa fornece um vetor que compreende um promotor ligado operacionalmente a uma sequência que codifica uma sequência de nucleotídeos que forma uma haste e uma alça; em que a alça compreende uma primeira sequência de nucleotídeos que modula a expressão de um alvo; e em que a haste compreende uma segunda sequência de nucleotídeos que modula a expressão de um alvo.

Uma modalidade de exemplo da presente invenção fornece um método de regulação da expressão de um alvo, o método compreendendo: fornecimento a uma célula de uma sequência que compreende uma sequência de nucleotídeos que forma uma haste e uma alça; em que a alça compreende uma primeira sequência de nucleotídeos que modula a expressão do alvo; e em que a haste compreende uma segunda sequência de nucleotídeos que modula a expressão do alvo; e o cultivo da referida célula.

Uma modalidade de exemplo da presente invenção fornece um método de regulação da expressão de um alvo, o método compreendendo o fornecimento a uma célula de um vetor que compreende um promotor ligado operacionalmente a uma sequência que codifica uma sequência de nucleotídeos que forma uma haste e uma alça; em que a alça compreende uma primeira sequência de nucleotídeos que modula a expressão do alvo; e em que a haste compreende uma segunda sequência de nucleotídeos que modula a expressão do alvo; e a expressão da sequência de nucleotídeos pelo referido vetor na referida célula.

Outra modalidade da presente invenção fornece um método de tratamento de uma condição em um indivíduo que compreende a administração ao indivíduo da sequência descrita previamente que compreende a

sequência de nucleotídeos que forma uma haste e uma alça. Uma modalidade particular compreende a administração ao indivíduo de um vetor que compreende um promotor ligado operacionalmente a uma sequência que codifica uma sequência de nucleotídeos que forma uma haste e uma alça.

5 Uma modalidade particular da presente invenção fornece um medicamento, que compreende: uma sequência que compreende uma sequência de nucleotídeos que forma uma haste e uma alça; em que a alça compreende uma primeira sequência de nucleotídeos que modula a expressão de um alvo; e em que a haste compreende uma segunda sequência de nucleotídeos que modula a expressão de um alvo, e um veículo, diluente
10 e/ou adjuvante farmacêuticamente aceitável. Uma modalidade alternativa da presente invenção fornece um medicamento que compreende uma sequência que compreende um vetor que inclui um promotor ligado operacionalmente a uma sequência que codifica uma sequência de nucleotídeos que
15 forma uma haste e uma alça.

 Uma modalidade de exemplo da presente invenção fornece uma célula que compreende a sequência de nucleotídeos descrita previamente que forma uma haste e uma alça. Uma modalidade alternativa compreende o fornecimento de uma célula que compreende um vetor que inclui um pro-
20 motor ligado operacionalmente a uma sequência que codifica uma sequência de nucleotídeos que forma uma haste e uma alça.

 Uma modalidade de exemplo da presente invenção fornece um método de produção de um constructo para a regulação de um alvo, o método compreendendo: a combinação em uma única sequência nucléica de
25 uma primeira e de uma segunda sequências capazes de pareamento de bases para formar uma estrutura de haste-alça no constructo; e uma terceira sequência, disposta entre a primeira e a segunda sequências; em que a referida primeira e a segunda sequências, quando submetidas ao pareamento de bases, são capazes de gerar um siRNA; em que a referida terceira se-
30 quência é de comprimento suficiente para permitir que a primeira e a segunda sequências sejam pareadas de forma estável entre elas; e em que a referida terceira sequência compreende uma sequência capaz de modular um

alvo por meio de supressão antissenso.

Uma modalidade de exemplo da presente invenção fornece um método de produção de um constructo para a regulação de um alvo, o método compreendendo: a combinação em uma única sequência nucléica de uma primeira e de uma segunda sequências capazes de pareamento de bases para formar uma estrutura de haste-alça no constructo; uma terceira sequência disposta entre a primeira e a segunda sequências; e uma quarta sequência que compreende um gene de interesse ligado operacionalmente a um promotor; em que a referida primeira e a segunda sequências, quando submetidas ao pareamento de bases, são capazes de gerar um siRNA; em que a referida terceira sequência é de comprimento suficiente para permitir que a primeira e a segunda sequências sejam pareadas de forma estável entre elas; e em que a referida terceira sequência pode ou não compreender uma sequência capaz de modular um alvo por meio de supressão antissenso.

Outra modalidade da invenção fornece um método de produção de uma planta com níveis modificados de ácidos graxos do componente endógeno. O método inclui a modulação dos níveis de um gene heterólogo, por exemplo, um gene da síntese de ácido graxo ou do metabolismo de lipídeos.

A presente invenção pode ainda ser utilizada em combinação com várias metodologias de silenciamento gênico usando tecnologias de RNAi e antissenso que são conhecidas na técnica para fornecer modulação aumentada da expressão gênica adaptada a um ou mais genes e/ou vias genéticas específicas.

25 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A FIG. 1 é uma representação gráfica dos constructos pPHAS-Fab1-AS, pPHAS-Fab1-HP e pPHAS-Fab1-HPAS.

A FIG. 2 é uma representação gráfica dos constructos pPHAS-Fad2-AS, pPHAS-Fad2-HP, pPHAS-Fad2-HPAS e pPHAS-Fad2-HP-GUS.

30 A FIG. 3 é uma representação gráfica dos constructos pPHAS-Fad3-AS, pPHAS-Fad3-HP e pPHAS-Fad3-HPAS.

A FIG. 4 é um diagrama que mostra como o constructo pPHAS-

Fab1-HPAS pode ser processado em uma célula para modular a expressão de Fab1.

A FIG. 5 é um diagrama esquemático da produção de ácido graxo em *Arabidopsis*.

5 A FIG. 6 mostra traçados de cromatografia a gás que indicam os níveis de vários ácidos graxos em sementes que contêm pPHAS-Fab1-HP e pPHAS-Fab1-HPAS, comparadas com a cepa de base.

A FIG. 7 é um resumo gráfico que indica os níveis de vários ácidos graxos em sementes que contêm pPHAS-Fab1-HP e pPHAS-Fab1-HPAS, comparadas com a cepa de base.

A FIG. 8 mostra traçados de cromatografia a gás que indicam os níveis de vários ácidos graxos em sementes que contêm pPHAS-Fad2-AS, comparadas com as do tipo selvagem.

15 A FIG. 9 mostra traçados de cromatografia a gás que indicam os níveis de vários ácidos graxos em sementes que contêm pPHAS-Fad2-HP e pPHAS-Fad2-HPAS, comparadas com a mutante Fad2-MT.

A FIG. 10 é um resumo gráfico que indica os níveis de vários ácidos graxos em sementes que contêm pPHAS-Fad2-AS, pPHAS-Fad2-HP e pPHAS-Fad2-HPAS, comparadas com a mutante Fad2-MT e a cepa de base.

A FIG. 11 mostra traçados de cromatografia a gás que indicam os níveis de vários ácidos graxos em sementes que contêm pPHAS-Fad2-HP-GUS, comparadas com a cepa de base.

25 A FIG. 12 mostra uma fotografia que contém sementes do tipo selvagem (sementes mais claras) e sementes que expressam GUS por pPHAS-Fad2-HP-GUS (sementes mais escuras).

A FIG. 13 mostra traçados de cromatografia a gás que indicam os níveis de vários ácidos graxos em sementes que contêm pPHAS-Fad3-AS, comparadas com as do tipo selvagem.

30 A FIG. 14 mostra traçados de cromatografia a gás que indicam os níveis de vários ácidos graxos em sementes que contêm pPHAS-Fad3-HP e pPHAS-Fad3-HPAS, comparadas com a mutante Fad3-MT.

A FIG. 15 é um resumo gráfico que indica os níveis de vários ácidos graxos em sementes que contêm pPHAS-Fad3-AS, pPHAS-Fad3-HP e pPHAS-Fad3-HPAS, comparadas com a mutante Fad3-MT e com a cepa de base.

5 MODOS PARA A PRÁTICA DA INVENÇÃO

Um aspecto da presente invenção refere-se aos compostos, composições e métodos úteis para a modulação da expressão de um alvo em uma célula. Especificamente, aspectos da presente invenção estão relacionados às sequências de nucleotídeos capazes de modular a expressão de um alvo como, por exemplo, um gene, uma sequência de oligonucleotídeos e/ou uma proteína, por interferência de RNA (RNAi) e/ou supressão antissenso. Geralmente, as moléculas de sequência de nucleotídeos moduladora (mNS) da presente invenção podem incluir uma estrutura de haste-alça, em que a haste fornece um substrato para *dicer* e pode atuar para suprimir um alvo por meio da via de RNAi, e em que a porção em alça da estrutura pode compreender uma primeira sequência que pode atuar para suprimir um gene por meio de supressão antissenso. As moléculas de mNS da invenção podem ser, no todo ou em parte, modificadas quimicamente e/ou criadas sinteticamente. O uso de mNS modificada quimicamente pode melhorar várias propriedades das moléculas de mNS, por exemplo, por meio de resistência aumentada à degradação por nuclease *in vivo* e/ou captação celular aumentada. As moléculas de mNS modificadas quimicamente da presente invenção fornecem reagentes e métodos úteis para várias aplicações terapêuticas, diagnósticas, agrícolas, de validação de alvo, de descoberta genômica, de engenharia genética e farmacogenômicas.

Em uma modalidade particular, as moléculas de mNS da presente invenção compreendem uma estrutura em haste-alça (*hairpin*), em que a haste contém uma sequência de ácidos nucleicos (dsNA) de fita dupla capaz de ser clivada por *dicer* e liberar pelo menos um ácido nucleico de interferência pequeno (siNA) que é capaz de suprimir um mRNA por meio da via de RNAi. Além disso, a alça da molécula de mNS contém pelo menos um ácido nucleico antissenso (asNA). Geralmente, essas moléculas serão aqui

denominadas ácidos nucleicos formadores de *hairpin* com alça antissenso ou "hpNAas".

O siNA e o asNA dos hpNAas podem ter como alvo a mesma localização no mesmo gene e/ou mRNA. Em uma modalidade de exemplo
5 adicional, o siNA e o asNA dos hpNAas podem ter como alvo uma localização diferente no mesmo gene e/ou mRNA. O siNA e o asNA dos hpNAas também podem ter como alvo genes e/ou mRNAs diferentes.

A porção em haste dos hpNAas pode conter mais de uma sequência capaz de gerar um siNA. Caso haja mais de um siNA gerado pela
10 haste dos hpNAas, esses siNAs podem ter como alvo o mesmo sítio no mesmo mRNA. Os siNAs podem ter como alvo sítios diferentes no mesmo mRNA. Os siNAs também podem ter como alvo mRNAs diferentes.

A porção em alça dos hpNAas pode conter mais de uma sequência de asNA. Caso haja mais de um asNA na alça dos hpNAas, esses
15 asNAs podem ter como alvo o mesmo sítio no mesmo gene e/ou mRNA. Os asNAs podem ter como alvo sítios diferentes no mesmo gene e/ou mRNA. Os asNAs também podem ter como alvo genes e/ou mRNAs diferentes.

Em uma modalidade de exemplo adicional da presente invenção, a porção em haste dos hpNAas pode conter mais de uma sequência
20 capaz de gerar um siNA, e a porção em alça dos hpNAas pode conter mais de uma sequência de asNA. Esses siNAs e asNAs podem ter como alvo o mesmo sítio no mesmo mRNA, sítios diferentes no mesmo mRNA, mRNAs diferentes, ou qualquer combinação destes.

Em uma modalidade em particular, um único siNA e/ou asNA de
25 um hpNAas da presente invenção pode ter como alvo mais de um gene, sequência de nucleotídeos e/ou proteína. Como muitos genes podem compartilhar algum grau de homologia de sequências entre eles, podem ser projetadas moléculas de siNA e/ou asNA para ter como alvo uma classe de genes (e genes do receptor ou ligante associados) ou, alternativamente, genes
30 específicos por seleção de sequências que são compartilhadas entre diferentes alvos gênicos ou, alternativamente, que são únicas para um alvo gênico. Em uma modalidade de exemplo, a molécula de siNA e/ou asNA pode ser proje-

tada para ter como alvo regiões conservadas de, por exemplo, uma sequência de RNA que possua homologia entre vários genes, de modo a ter como alvo vários genes ou famílias de genes (por exemplo, diferentes isoformas do gene, variantes de emenda (*splice*), genes mutantes etc.) com uma molécula de siNA e/ou asNA. Em outra modalidade de exemplo, a molécula de siNA e/ou asNA pode ser projetada para ter como alvo uma sequência que é única para um gene, sequência de nucleotídeos e/ou proteínas específicas em função do grau elevado de especificidade que a molécula de siNA e/ou asNA exige para mediar uma atividade de modulação.

10 Em uma modalidade de exemplo adicional da presente invenção, as moléculas de hpNAAs podem conter um ou mais splici sites. Esses splici sites podem ser operacionalmente colocados e orientados de modo a permitir a clivagem da porção em alça dos hpNAAs da porção em haste dos hpNAAs como se ela fosse um íntron. hpNAAs que contêm esses splici sites operacionalmente orientados serão denominados daqui por diante "hpNAAs que contêm íntron" ou "ihpNAAs".

15 Em outra modalidade, a mNS pode conter um gene de interesse ligado operacionalmente a um promotor. Quando a mNS contiver um *hairpin* ou uma alça, modalidades particulares da presente invenção fornecem a presença do promotor e gene de interesse dentro da alça. Em outras modalidades, o asNA pode estar presente ou ausente na alça que contém o promotor e o gene de interesse.

20 O gene de interesse pode ser qualquer gene que um usuário deseje expressar. O gene pode ser o mesmo ou relacionado ao alvo da mNS. Como forma de exemplo não limitante, a mNS poderia ter como alvo uma forma mutada de um gene de interesse, enquanto, ao mesmo tempo, forneça uma cópia normal ou criada por engenharia genética como substituição. Em uma modalidade de exemplo adicional, o promotor e o gene de interesse podem ser colocados perto ou dentro de uma ou mais sequências que

25 promoverão a integração em um genoma. Exemplos de promotores úteis na presente invenção incluem, sem limitação, promotores virais, retrovirais, de mamíferos, de plantas, bacterianos, constitutivos, reguláveis, fúngicos, de

30

leveduras, de algas e de insetos. Promotores de plantas úteis na presente invenção incluem, por exemplo, aqueles identificados em *Arabidopsis*, girasol, algodão, colza (incluindo canola), milho, trigo, mamona, palma, tabaco, amendoim, sorgo, cana-de-açúcar ou soja. Promotores adequados úteis na
5 presente invenção incluem, por exemplo, promotores semente-específicos, promotores indutíveis, promotores constitutivos, incluindo, sem limitação, proteína de armazenamento 2S, faseolina, CaMV 35S, napina, cruciferina, ubiquitina, oleosina, vírus do mosaico das nervuras da mandioca, prunina, legumina e octopina sintase.

10 A introdução de nucleotídeos e/ou açúcares modificados quimicamente ou sintéticos em moléculas de mNS pode fornecer uma ferramenta poderosa na superação de limitações potenciais de estabilidade e biodisponibilidade *in vivo* inerentes às moléculas de RNA nativo que são liberadas exogenamente. Por exemplo, o uso de mNS modificada quimicamente ou
15 nucleotídeos sintéticos que contêm mNS pode permitir uma dose menor de uma mNS em particular para certo efeito terapêutico, na medida em que essas moléculas tendem a ter uma meia-vida mais longa no soro. Além disso, certas modificações químicas podem aumentar a biodisponibilidade de moléculas de ácido nucleico por direcionamento a células ou tecidos em parti-
20 cular e/ou por aumento da captação celular da molécula de ácido nucleico. Portanto, mesmo se a atividade de uma molécula de ácido nucleico modificada quimicamente ou sintética for reduzida comparada com uma molécula de ácido nucleico nativa (por exemplo, quando comparada com uma molécula inteira de ácido nucleico de RNA), a atividade global da molécula de ácido
25 nucleico modificada ou sintética poderá ser maior do que a da molécula nativa em função da estabilidade e/ou liberação aumentadas da molécula. Indiferentemente do siRNA nativo não modificado, o siNA modificado quimicamente também pode minimizar a possibilidade de ativação da atividade de interferon em seres humanos.

30 Em uma modalidade representativa, uma mNS poderia compreender uma ou mais modificações e/ou bases sintéticas. Exemplos de modificações e/ou bases sintéticas incluem, sem limitação, 2'-amino, 2'-O-metila,

2'-desóxi-2'-flúor, 2'-desóxi, 2'-metoxietila, 4'-tio, 5-C-metila, "base universal", ácido nucleico *locked* (LNA), morfolino e "nucleotídeos acíclicos", além de nucleotídeos que contêm as pontes de 2'-O ou 4'-C metileno, gliceril terminal e/ou incorporação de resíduo abásico desóxi invertido, ligações fosforotiotato internucleotídeos e nucleotídeos que possuem uma conformação *Northern* (por exemplo, ciclo de pseudo-rotação *Northern*; veja, por exemplo, Saenger, "Principles of Nucleic Acid Structure", Springer-Verlag ed., 1984). A mNS pode ainda compreender um ou mais desoxirribonucleotídeos e/ou didesoxirribonucleotídeos.

10 O termo "base universal", como aqui usado, refere-se aos análogos de bases nucleotídicas que formam pares de bases com cada uma das bases naturais de DNA/RNA com pouca discriminação entre elas. Exemplos não limitantes de bases universais incluem C-fenila, C-naftila e outros derivados aromáticos, inosina, azol carboxamidas e derivados de nitroazol como, por exemplo, 3-nitropirrol, 4-nitroindol, 5-nitroindol e 6-nitroindol, como conhecido na técnica (veja, por exemplo, Loakes, 2001, *Nucleic Acids Research*, 29, 2.437-2.447). O termo "nucleotídeo acíclico", como aqui usado, refere-se a qualquer nucleotídeo que possui um açúcar de ribose acíclico, por exemplo, quando qualquer um dos carbonos da ribose (C1, C2, C3, 15 C4, ou C5) estiver independentemente ou em combinação ausente do nucleotídeo.

25 As bases em uma mNS podem ser modificadas, por exemplo, pela adição de substituintes, ou modificação de uma ou mais posições, por exemplo, nas pirimidinas e purinas. A adição de substituintes pode ou não saturar uma ligação dupla, por exemplo, das pirimidinas e purinas. Exemplos de substituintes incluem, sem limitação, grupos alquila, grupos nitro, halogênios e/ou hidrogênios. Os grupos alquila podem ser de qualquer comprimento, de preferência, de um a seis carbonos. Os grupos alquila podem ser saturados ou insaturados; e podem ser de cadeia linear, ramificada ou cíclica. Os 30 halogênios pode ser qualquer um dos halogênios incluindo, sem limitação, bromo, iodo, flúor e/ou cloro.

A modificação adicional das bases pode ser obtida pela troca

e/ou substituição dos átomos nas bases. Exemplos não limitantes incluem: troca das posições de um átomo de nitrogênio e um átomo de carbono nas bases, substituição de um átomo de carbono por um átomo de nitrogênio e/ou um átomo de silício, substituição de um átomo de enxofre por um átomo de oxigênio e/ou substituição de um átomo de oxigênio por um átomo de nitrogênio. Outras modificações das bases incluem, sem limitação, a fusão de um anel adicional às bases, por exemplo, um anel com cinco ou seis membros adicionais. O anel fundido pode carregar vários grupos adicionais.

Exemplos específicos de bases modificadas incluem, sem limitação, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, pseudoisocitosina, E-base, tiouracila, ribotimidina, diidrouridina, pseudouridina, 4-tiouridina, 3-metilcitidina, 5-metilcitidina, N⁶-metiladenosina, N⁶-isopenteniladenosina, -metilguanosina, queuosina, wiosina, eteno-adenina, eteno-citosina, 5-metilcitosina, bromotimina, azaadenina, azaguanina, 2'-flúor-uridina e 2'-flúor-citidina.

A mNS pode compreender nucleotídeos modificados e/ou sintéticos como uma porcentagem do número total de nucleotídeos presentes na molécula de mNS. Dessa forma, uma molécula de mNS da invenção pode geralmente compreender nucleotídeos modificados e/ou sintéticos de cerca de 5 a cerca de 100% das posições de nucleotídeos (por exemplo, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% das posições de nucleotídeos). A porcentagem real de nucleotídeos modificados presentes em certa molécula de mNS depende do número total de nucleotídeos presentes na mNS.

Em uma modalidade em particular, a mNS da presente invenção compreende uma estrutura principal molecular que anexa os vários nucleotídeos na sequência. Modalidades de exemplo de mNS podem ter estruturas principais moleculares que incluem, sem limitação, ribose, 2'-O-alkil ribose, 2'-O-metil ribose, 2'-O-alil ribose, desoxirribose, 2-desoxirribose, morfolino e/ou estruturas principais peptídicas. A estrutura principal pode compreender unidades de açúcar e/ou não-açúcar. Essas unidades podem ser unidas em conjunto por qualquer meio conhecido na técnica. Os nucleotídeos podem ser unidos por grupos de ligação. Alguns exemplos de grupos de ligação

incluem, sem limitação, grupos fosfato, tiofosfato, ditiofosfato, metilfosfato, amidato, fosforotiotato, metilfosfonato, fosforoditiotato e/ou fosforodiamidato. Alternativamente, os nucleotídeos podem ser unidos em conjunto diretamente.

5 Uma estrutura principal de açúcar pode compreender qualquer açúcar de ocorrência natural. Exemplos de açúcares de ocorrência natural incluem, sem limitação, ribose, desoxirribose e/ou 2-desoxirribose. Unidades de açúcar de uma estrutura principal podem ser modificadas de tal forma que a estrutura principal de açúcar modificado seja resistente à clivagem. Os
10 açúcares de uma estrutura principal podem ser modificados por métodos conhecidos na técnica, por exemplo, para se obter resistência à clivagem por nuclease. Exemplos de açúcares modificados incluem, sem limitação, 2'-O-alquil riboses como, por exemplo, 2'-O-metil ribose e 2'-O-alil ribose. As unidades de açúcar podem ser unidas por vinculadores de fosfato. Unidades de
15 açúcar da invenção típicas podem ser ligadas umas às outras por ligações 3'-5', 3'-3' ou 5'-5'. Adicionalmente, ligações 2'-5' também são possíveis se o OH 2' não for modificado de algum outro modo.

 Uma estrutura principal não-açúcar pode compreender qualquer molécula não-açúcar à qual as bases possam ser anexadas. Estruturas prin-
20 cipais não-açúcar são conhecidas na técnica. Exemplos incluem, sem limitação, morfolino e ácidos nucleicos peptídicos (PNAs). Uma estrutura principal de morfolino é constituída por anéis morfolino (tetrahydro-1,4-oxazina) que podem ser unidos por grupos fosforodiamidato não-iônicos. Morfolinos modificados conhecidos na técnica podem ser usados na presente invenção.

25 Os PNAs se formam quando bases são anexadas a uma estrutura principal de aminoácidos por ligações moleculares. Exemplos dessas ligações incluem, sem limitação, ligações metileno carbonila, etileno carbonila e etila. Os aminoácidos podem ser qualquer aminoácido, natural ou não-natural, modificado ou não modificado, e são preferivelmente aminoácidos
30 alfa. Os aminoácidos podem ser idênticos ou diferentes entre eles. Um exemplo não limitante de um aminoácido adequado inclui um amino alquil-aminoácido, por exemplo, (2-aminoetil)-aminoácido.

Exemplos de PNAs incluem, sem limitação, N-(2-aminoetil)-glicina, ciclohexil PNA, retro-inverso, fosfona, propinila e aminoprolina-PNA. Os PNAs podem ser sintetizados quimicamente por métodos conhecidos na técnica. Exemplos incluem, sem limitação, protocolos de síntese de peptídeo
5 modificado por Fmoc e/ou tBoc.

Além dos oligonucleotídeos antissenso uniformes mencionados acima, fica evidente para aqueles versados na técnica que vários tipos de estruturas principais podem ser misturados em uma única molécula de mNS. Por exemplo, uma única molécula de mNS pode conter um ou mais 2'-O-
10 metil nucleotídeos, um ou mais morfolinos, um ou mais nucleotídeos de RNA e um ou mais PNAs.

Nas modalidades de exemplo nas quais a mNS da presente invenção inclui um hpANas, o comprimento do siNA e/ou asNA em um hpANas não é crítico, desde que o comprimento seja suficiente para hibridizar especificamente para o alvo. Por exemplo, o segmento de pareamento de
15 bases pode ter de cerca de duas a cerca de 100 bases, de cerca de 10 a 50 bases, de cerca de 25 bases, ou qualquer número individual entre cerca de 10 e cerca de 75 bases.

Vários fatores podem ser considerados quando se determina o comprimento dos segmentos de siNA e/ou asNA, tais como especificidade de alvo, estabilidade de ligação, transporte celular e/ou liberação *in vivo*. Os segmentos de siNA e/ou asNA devem ser suficientemente longos para se ligar estavelmente ao alvo de interesse. Além disso, os segmentos de siNA e/ou asNA devem ser suficientemente longos para permitir uma especificidade de ligação razoável, na medida em que uma sequência mais curta possui uma probabilidade maior de ocorrer em outros lugares no genoma do que uma sequência mais longa. Considerações adicionais relacionadas ao comprimento de segmentos de siNA e/ou asNA incluem a eficiência de liberação *in vivo* ou *ex vivo*, estabilidade dos segmentos de siNA e/ou asNA *in vivo* ou *in vitro*, e/ou a estabilidade do alvo de interesse ligado ou não ligado por um segmento de siNA e/ou asNA.
20
25
30

Em uma modalidade de exemplo adicional, uma molécula de

mNS pode ser modificada para otimizar seu uso em várias aplicações. A otimização pode incluir, sem limitação, uma ou mais modificações para aumentar a liberação, captação celular, localização intracelular e/ou farmacocinética. Uma forma pela qual uma molécula de mNS pode ser modificada é pela adição de sequências sinalizadoras específicas. Exemplos incluem, sem limitação, sinais de retenção nuclear, sinais de localização nuclear e/ou sequências que promovem transporte através das membranas celulares, da barreira hematencefálica e/ou da barreira placentária. Exemplos específicos incluem, sem limitação, polilisina, poli(E-K), o sinal de localização nuclear de antígeno T de SV40, o terminal N da proteína HIV-TAT, peptídeos derivados da proteína de *Drosophila antennapedia*, um peptídeo de liberação transdérmica como, por exemplo, aqueles descritos por Chen e outros, *Nature Biotechnology*, 24:4 455-460 e/ou o peptídeo de Dowdy Tat. As sequências que localizam oligonucleotídeos antissenso em tipos de células específicos também são contempladas. Em uma modalidade, a invenção apresenta um ingrediente ativo que compreende uma molécula de mNS da invenção.

Em uma modalidade de exemplo adicional, uma mNS pode ser combinada com um ou mais veículos, adjuvantes e/ou diluentes para formar um tratamento medicamentoso ou químico para um organismo vivo. Exemplos desses veículos, adjuvantes e/ou diluentes incluem, sem limitação, água, solução salina, solução de Ringer, colesterol e/ou derivados de colesterol, lipossomos, lipofectina, lipofectamina, polietileno glicol ancorado por lipídeo, copolímero em bloco F108 e/ou fosfatidas como, por exemplo, dioleooxifosfatidiletanolamina, fosfatidil colina, fosfatidilglicerol, alfa-tocoferol e/ou ciclosporina. Em muitos casos, as moléculas de mNS podem ser misturadas com um ou mais veículos, adjuvantes e/ou diluentes para formar uma composição ou medicamento disperso que pode ser usado para tratar uma doença, infecção ou condição. Veja, por exemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences"; "Goodman e Gilman's The Pharmacologic Basis of Therapeutics"; "Current Protocols in Molecular Biology". Ficaria evidente para aqueles versados na técnica que essa composição dispersa também pode ser usada para romper a expressão adequada de genes, sequências de nucleotídeos

e/ou proteínas envolvidas em processos de doença ou infecciosos, ou na produção de produtos animais ou de plantas. Por exemplo, a composição pode ser usada para a produção de uma planta com níveis aumentados de um produto de um gene da síntese de ácido graxo ou do metabolismo de lipídeos.

As moléculas de mNS, com ou sem um adjuvante e/ou um veículo, podem ser administradas a um organismo ou indivíduo por qualquer forma que permita que as moléculas de mNS modulem a expressão de um alvo. Exemplos incluem, sem limitação, injeção sítio-específica, injeção sistêmica e/ou administração intravenosa, oral e/ou tópica. Organismos e indivíduos contemplados pela invenção incluem, sem limitação, bactérias, células, sistemas de cultura de células, plantas, fungos, animais, nematódeos, insetos e/ou mamíferos, por exemplo, seres humanos. As plantas contempladas pela invenção incluem, por exemplo, *Arabidopsis*, girassol, algodão, colza (incluindo canola), milho, trigo, mamona, palma, tabaco, amendoim, sorgo, cana-de-açúcar e soja.

O alvo pode ser, por exemplo, um ácido nucleico que pode ser um gene endógeno, um gene exógeno, um ácido nucleico viral ou RNA, por exemplo, um gene de mamífero, um gene de planta, um gene viral, um gene fúngico, um gene bacteriano, um gene viral de planta ou um gene viral de mamífero.

Exemplos de vírus de mamíferos incluem, sem limitação, vírus da hepatite C, vírus da imunodeficiência humana, vírus da hepatite B, vírus do herpes simples, citomegalovírus, vírus do papiloma humano, vírus sincicial respiratório, vírus influenza e síndrome vírus do sofrimento respiratório agudo grave (SARS).

Como ficará evidente para aqueles versados na técnica, um alvo também pode ser uma sequência de nucleotídeos ou de proteínas. Como também será subentendido, as moléculas de mNS da invenção não tendem a alterar a própria proteína, mas sim ter como as moléculas que controlam a geração daquela proteína. Exemplos de proteínas incluem, sem limitação, uma proteína endógena, uma proteína exógena, uma proteína de mamífero,

uma proteína de planta, uma proteína viral, uma proteína fúngica, uma proteína bacteriana, uma proteína viral de planta ou uma proteína viral de mamífero. Exemplos de sequências de nucleotídeos incluem, sem limitação, sequências de DNA, RNA e PNA.

5 Em uma modalidade de exemplo, uma molécula de mNS da invenção compreende uma região sentido e uma região antissenso, em que a região sentido inclui uma porção terminal *cap* na extremidade 5', na extremidade 3' ou tanto na extremidade 5' quanto na extremidade 3'. A porção *cap* pode ser uma porção abásica desóxi invertida, uma porção desóxi timidina
10 invertida ou uma porção timidina.

 Uma modalidade particular da invenção fornece um vetor que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica pelo menos uma molécula de mNS da invenção de uma forma que permita a expressão da molécula de ácido nucleico. Exemplos de vetores incluem, sem limitação,
15 plasmídeos, cosmídeos, vetores retrovirais, agrobactérias, vetores virais, vetores bacterianos, vetores de levedura, vetores eucarióticos, vetores de plantas e vetores de mamíferos. Outras modalidades da invenção fornecem células de mamíferos, células de plantas ou agrobactérias que compreendem este vetor. A célula pode ter natureza mamífera como, por exemplo,
20 uma célula humana. A molécula de mNS do vetor pode compreender uma região sentido, uma região antissenso, uma sequência antissenso e/ou um gene.

 Em uma modalidade, as moléculas de mNS da presente invenção apresentam uma molécula de ácido nucleico de interferência curto modificada quimicamente (siNA) capaz de mediar a interferência de RNA (RNAi)
25 dentro de uma célula ou de um sistema reconstituído *in vitro*, em que a modificação química compreende um conjugado anexado à molécula de siNA modificada quimicamente. O conjugado pode ser anexado à molécula de siNA modificada quimicamente por meio de uma adesão covalente. Em uma
30 modalidade específica, o conjugado é anexado à molécula de siNA modificada quimicamente por meio de um vinculador biodegradável. A molécula conjugada pode ser anexada à extremidade 3' da fita sentido, da fita antis-

senso ou de ambas as fitas da molécula de siNA modificada quimicamente. A molécula conjugada pode ser anexada na extremidade 5' da fita sentido, da fita antissenso ou de ambas as fitas da molécula de siNA modificada quimicamente. A molécula conjugada também pode ser anexada tanto na
5 extremidade 3' quanto na extremidade 5' da fita sentido, da fita antissenso ou de ambas as fitas da molécula de siNA modificada quimicamente, ou qualquer combinação destes. A molécula conjugada da invenção pode compreender uma molécula que facilita a liberação de uma molécula de siNA modificada quimicamente em um sistema biológico como, por exemplo, uma
10 célula. Em uma modalidade em particular, a molécula conjugada anexada à molécula de siNA modificada quimicamente é um polietileno glicol, albumina sérica humana ou um ligante para um receptor celular que pode mediar a captação celular. Exemplos de moléculas conjugadas específicas contempladas pela presente invenção que podem ser anexadas às moléculas de
15 siNA modificadas quimicamente são descritos em *Vargeese e outros*, U.S. Nº de Série 10/201.394. O tipo de conjugados usados e a extensão da conjugação de moléculas de siNA da invenção podem ser avaliados quanto a perfis farmacocinéticos, biodisponibilidade e/ou estabilidade de constructos de siNA aprimorados mantendo, ao mesmo tempo, a habilidade do siNA para
20 mediar a atividade de RNAi. Dessa forma, aqueles versados na técnica podem avaliar constructos de siNA que são modificadas com vários conjugados para determinar se o complexo de conjugado de siNA possui propriedades aprimoradas, mantendo, ao mesmo tempo, a habilidade para mediar RNAi como, por exemplo, em modelos animais que são geralmente conhecidos na técnica.
25

Em outra modalidade, a invenção apresenta um método para modulação da expressão de um gene dentro de uma célula. O método inclui a síntese de uma molécula de mNS da invenção, que pode ser modificada quimicamente, em que a molécula de mNS compreende uma sequência
30 complementar ao RNA do gene. A molécula de mNS pode incluir uma sequência substancialmente similar à sequência do RNA-alvo. A molécula de mNS pode então ser introduzida em uma célula sob condições adequadas

para modular a expressão do gene na célula.

Em outra modalidade de exemplo, a invenção apresenta um método para a modulação da expressão de mais de um gene dentro de uma célula. O método inclui a síntese de uma molécula de mNS da invenção, que
5 pode ser modificada quimicamente, em que a molécula de mNS compreende uma sequência complementar ao RNA dos genes. A molécula de mNS pode então ser introduzida em uma célula sob condições adequadas para modular a expressão dos genes na célula.

Em outra modalidade de exemplo, a invenção apresenta um método
10 para a modulação da expressão de mais de um gene dentro de uma célula. O método inclui a síntese de uma molécula de mNS da invenção, que pode ser modificada quimicamente, em que a molécula de mNS compreende uma sequência complementar ao RNA do gene e em que a molécula de mNS compreende uma sequência substancialmente similar à sequência do
15 RNA-alvo. A molécula de mNS pode então ser introduzida em uma célula sob condições adequadas para modular a expressão dos genes na célula.

Em uma modalidade em particular, moléculas de mNS da invenção são usadas como reagentes em aplicações *ex vivo*. Por exemplo, as moléculas de mNS podem ser introduzidas em tecido ou células que são
20 transplantadas em um organismo ou indivíduo para efeito terapêutico. As células e/ou o tecido podem ser derivados de um organismo ou indivíduo que mais tarde recebe o explante. Alternativamente, as células e/ou o tecido podem ser derivados de outro organismo ou indivíduo, antes do transplante. As moléculas de mNS podem ser usadas para modular a expressão de um
25 ou mais genes nas células ou tecido, de tal forma que as células ou o tecido obtenham um fenótipo desejado, e são capazes de efetuar uma função quando transplantadas *in vivo*. Em uma modalidade de exemplo, certas células-alvo de um organismo ou indivíduo são extraídas. Essas células extraídas são colocadas em contato com moléculas de mNS que visam uma sequência de nucleotídeos específica dentro das células sob condições adequadas à captação das moléculas de mNS por essas células (por exemplo,
30 com a utilização de reagentes de liberação como, por exemplo, lipídeos cati-

ônicos, lipossomos, e semelhantes, ou com a utilização de técnicas como, por exemplo, eletroporação, para facilitar a liberação de moléculas de mNS nas células). As células são então reintroduzidas de volta no mesmo organismo ou em outros organismos. Exemplos não limitantes de aplicações *ex vivo* incluem o uso em um transplante de órgão/tecido, enxerto de tecido ou no tratamento de doença pulmonar (por exemplo, re-estenose), ou para evitar hiperplasia da neointima e aterosclerose em enxertos venosos. Essas aplicações *ex vivo* também podem ser usadas para tratar condições associadas ao insucesso do enxerto de *desvio* coronário e periférico; por exemplo, esses métodos podem ser usados em conjunto com cirurgia de enxerto de *desvio* vascular periférico e cirurgia de enxerto de *desvio* da artéria coronária. Aplicações adicionais incluem o uso em transplantes para o tratamento de lesões ou trauma do sistema nervoso central (SNC), incluindo o uso no tratamento de condições neurodegenerativas como, por exemplo, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, epilepsia, demência, doença de Huntington ou esclerose lateral amiotrófica (ALS).

Ainda em outra modalidade, a invenção apresenta um método de modulação da expressão de um gene em um organismo. O método inclui a síntese de uma molécula de mNS da invenção, em que a molécula de mNS compreende uma sequência complementar ao RNA do gene. A molécula de mNS pode então ser introduzida no organismo sob condições adequadas para modular a expressão do gene no organismo.

Em outra modalidade de exemplo, a invenção apresenta um método de modulação da expressão de mais de um gene em um organismo. O método inclui a síntese de uma molécula de mNS da invenção, em que a molécula de mNS compreende uma sequência complementar ao RNA dos genes. A molécula de mNS pode então ser introduzida no organismo sob condições adequadas para modular a expressão dos genes no organismo. Em uma modalidade alternativa, a invenção apresenta um método para a modulação da expressão de um gene dentro de uma célula pela síntese de uma molécula de mNS da invenção, em que a molécula de mNS compreende uma sequência que possui complementaridade para o RNA do gene. A

molécula de mNS pode então ser introduzida em uma célula sob condições adequadas para modular a expressão do gene na célula.

Em outras modalidades, a invenção apresenta um método para a modulação da expressão de mais de um gene dentro de uma célula, que
5 inclui a síntese de moléculas de mNS da invenção, em que a molécula de mNS compreende uma sequência que possui complementaridade para o RNA dos genes. A molécula de mNS pode então ser colocada em contato com uma célula *in vitro* ou *in vivo* sob condições adequadas para modular a expressão dos genes na célula. Em outra modalidade, a invenção inclui um
10 método de modulação da expressão de um gene em um organismo. Uma molécula de mNS que possui complementaridade para o RNA do gene pode ser sintetizada, e a molécula de mNS pode ser introduzida no organismo sob condições adequadas para modular a expressão do gene no organismo. Outra modalidade apresenta um método de modulação da expressão de mais
15 de um gene em um organismo por síntese de moléculas de mNS que incluem uma sequência que possui complementaridade para o RNA dos genes, e a introdução das moléculas de mNS no organismo sob condições adequadas para modular a expressão dos genes no organismo. Outra modalidade inclui um método de modulação da expressão de um gene em um organismo
20 por contato do organismo com a molécula de mNS da invenção sob condições adequadas para modular a expressão do gene no organismo. Ainda outra modalidade alternativa apresenta um método de modulação da expressão de mais de um gene em um organismo por contato do organismo com uma ou mais moléculas de mNS da invenção sob condições adequadas
25 para modular a expressão dos genes no organismo.

As moléculas de mNS da invenção podem ser projetadas para inibir a expressão de um gene-alvo por meio do direcionamento de RNAi de diversas moléculas de RNA. Em uma modalidade, as moléculas de mNS da invenção podem ser usadas para visar vários RNAs que correspondem a um
30 gene-alvo. Exemplos não limitantes desses RNAs incluem RNA mensageiro (mRNA), variantes de emenda (*splice*) de RNA alternativas do(s) gene(s)-alvo, RNA modificado pós-transcrição do(s) gene(s)-alvo, pré-mRNA de ge-

ne(s)-alvo e/ou modelos de RNA. Se a emenda alternativa produzir uma família de transcritos que são distinguidos por utilização de éxons apropriados, a presente invenção pode ser usada para inibir a expressão gênica por meio dos éxons apropriados para inibir especificamente ou para distinguir entre as

5 funções de membros da família do gene. Por exemplo, uma proteína que contém um domínio transmembrana emendado alternativamente pode ser expressa tanto na forma ligada à membrana quanto na forma secretada. O uso da invenção para direcionar o éxon que contém o domínio transmembrana pode ser utilizado para determinar as consequências funcionais do

10 direcionamento farmacêutico da forma ligada à membrana, ao contrário da forma secretada da proteína. Exemplos não limitantes de aplicações da invenção relacionados ao direcionamento dessas moléculas de RNA incluem aplicações farmacêuticas terapêuticas, aplicações em descobertas moleculares e farmacêuticas, modificação de produtos/moléculas de animais e de

15 plantas, aplicações em diagnóstico molecular e função gênica e mapeamento gênico, por exemplo, a utilização de mapeamento de polimorfismo de nucleotídeo único com as moléculas de siNA da invenção. Essas aplicações podem ser implementadas com o uso de sequências gênicas conhecidas ou a partir de sequências parciais disponíveis por um *character/marcador* de uma

20 sequência expressa (EST). Em uma modalidade da invenção, a modificação envolve um gene da síntese de ácido graxo ou um gene do metabolismo de lipídeos em uma planta.

Em outra modalidade, as moléculas de mNS da invenção podem ser usadas para visar sequências conservadas que correspondem à família

25 de um gene ou a famílias de genes. Dessa forma, moléculas de mNS que visam múltiplos alvos gênicos podem fornecer um efeito biológico aumentado ou um efeito modificado (por exemplo, na produção de síntese de ácido graxo em uma planta ou uma semente). Além disso, as moléculas de mNS podem ser usadas para caracterizar as vias da função gênica em diversas

30 aplicações. Por exemplo, a presente invenção pode ser usada para inibir a atividade do(s) gene(s)-alvo em uma via para determinar a função de genes não caracterizados em análise da função gênica, análise da função de mR-

NA ou análise da tradução. A invenção pode ser usada para determinar vias alternativas do gene-alvo envolvidas em várias doenças e condições em direção ao desenvolvimento de produtos, moléculas ou substâncias farmacêuticas. A invenção pode ser usada para compreender as vias de expressão gênica envolvidas, por exemplo, no desenvolvimento, como o desenvolvimento 5 pré-natal e o desenvolvimento pós-natal e/ou a progressão e/ou manutenção de câncer, doença infecciosa, autoimunidade, inflamação, distúrbios endócrinos, doença renal, doença pulmonar, doença cardiovascular, defeitos do parto, envelhecimento, ou qualquer outra doença ou condição relacionada à expressão gênica. A invenção pode ser usada para modificar a expressão de genes em plantas ou animais, ou pode ser usada para modificar a síntese de produtos animais ou de plantas como, por exemplo, modificação da síntese de ácido graxo em plantas e sementes de plantas. 10

Em outra modalidade, a invenção apresenta um método para a validação de um gene-alvo. O método inclui a síntese de uma molécula de mNS da invenção, que pode ser modificada quimicamente e ainda incluir uma sequência complementar ao RNA de um gene-alvo. A molécula de mNS pode então ser introduzida em um sistema biológico sob condições adequadas para a modulação da expressão do gene-alvo no sistema biológico. A função do gene pode então ser determinada por avaliação de qualquer alteração fenotípica no sistema biológico. 15 20

O termo "sistema biológico" significa material, em uma forma purificada ou não purificada, de fontes biológicas, incluindo, sem limitação, fontes humanas, animais, de plantas, de insetos, bacterianas, virais ou outras fontes, em que o sistema compreende os componentes necessários à atividade de RNAi. O termo "sistema biológico" inclui, por exemplo, uma célula, um tecido ou um organismo, ou extrato destes. O termo "sistema biológico" também inclui sistemas de RNAi reconstituído que podem ser usados em um ambiente *in vitro*. 25

O termo "alteração fenotípica" significa qualquer alteração detectável a uma célula que ocorra em resposta ao contato ou tratamento com uma molécula de ácido nucleico da invenção (por exemplo, mNS). Essas 30

alterações detectáveis incluem, sem limitação, alterações no formato, tamanho, proliferação, motilidade, expressão de proteína ou expressão de RNA ou outras alterações físicas ou químicas que possam ser avaliadas por métodos conhecidos na técnica. A alteração detectável também pode incluir a
5 expressão de genes/moléculas repórteres como, por exemplo, proteína fluorescente verde (GFP) ou vários caracteres/marcadores que são usados para identificar uma proteína expressa ou qualquer outro componente celular que possa ser avaliado.

Em uma modalidade em particular, a invenção apresenta um kit
10 que contém uma molécula de mNS da invenção que pode ser usada para modular a expressão de um alvo em uma célula, tecido ou organismo. Em outra modalidade, a invenção apresenta um kit que contém mais de uma molécula de mNS da invenção, que pode ser modificada quimicamente, que pode ser usada para modular a expressão de mais de um gene-alvo em uma
15 célula, tecido ou organismo. Ainda em outra modalidade, a invenção apresenta um kit que contém um vetor que codifica uma molécula de mNS da invenção que pode ser usada para modular a expressão de um gene em um sistema biológico. Em outra modalidade, a invenção apresenta um kit que contém um vetor que codifica mais de uma molécula de mNS da invenção
20 que pode ser usada para modular a expressão de mais de um gene-alvo em um sistema biológico.

Outra modalidade da invenção apresenta uma célula que contém uma ou mais moléculas de mNS da invenção. Em uma modalidade em particular, é fornecida uma célula que contém um vetor que codifica uma ou
25 mais moléculas de mNS da invenção. A célula que contém uma molécula de mNS da invenção pode ser uma célula de mamífero ou uma célula de planta. Por exemplo, células que contêm uma molécula de mNS podem ser de *Arabidopsis*, girassol, algodão, colza (incluindo canola), milho, trigo, mamona, palma, tabaco, amendoim, sorgo, cana-de-açúcar ou soja.

30 A invenção também inclui moléculas de mNS que medeiam RNAi em uma célula ou sistema reconstituído, em que a molécula de mNS compreende uma ou mais modificações químicas aqui descritas que modu-

lam a atividade de polimerase de uma polimerase celular capaz de gerar moléculas de siRNA endógeno adicionais que possuem homologia de sequências para a molécula de mNS modificada quimicamente.

A invenção também inclui uma molécula de mNS que medeia
5 RNAi em uma célula ou sistema reconstituído, em que a molécula de mNS compreende uma ou mais modificações químicas aqui descritas que modulam a captação celular da molécula de mNS. Em uma modalidade específica, a invenção apresenta moléculas de mNS que medeiam a expressão de um alvo, em que a molécula de mNS compreende uma ou mais modificações químicas aqui descritas que aumentam a biodisponibilidade da molécula de mNS, por exemplo, por adesão de conjugados poliméricos como, por exemplo, polietilenoglicol, ou conjugados equivalentes, que aprimoram a farmacocinética da molécula de mNS, ou por adesão de conjugados que visam tipos específicos de tecido-alvo ou de tipo de célula *in vivo*. Exemplos
10 não limitantes desses conjugados são descritos em Vargeese e *outros*, U.S. Nº de Série 10/201.394.

Em uma modalidade de exemplo, a invenção apresenta um método para a geração de molécula de mNS da invenção com biodisponibilidade aumentada, que compreende: (a) a introdução de um conjugado na estrutura de uma molécula de mNS, e (b) a avaliação da molécula de mNS da etapa (a) sob condições adequadas para o isolamento de molécula de mNS que possui biodisponibilidade aumentada. Esses conjugados podem incluir ligantes para receptores celulares como, por exemplo, peptídeos derivados de ligantes de proteína de ocorrência natural; sequências de localização de proteína, incluindo sequência celular do código ZIP; anticorpos; aptâmeros de ácido nucleico; vitaminas e outros co-fatores, tais como, folato e N-acetilgalactosamina; polímeros como, por exemplo, polietilenoglicol (PEG); fosfolipídeos; colesterol; poliaminas como, por exemplo, espermina ou espermidina; e outros. Em outra modalidade, polietileno glicol (PEG) pode ser
25 anexado de forma covalente à molécula de mNS da presente invenção. O PEG anexado pode ser de qualquer peso molecular, de preferência de cerca de 2.000 a cerca de 50.000 dáltons (Da).
30

A presente invenção pode ser usada isoladamente ou como um componente de um kit que possui pelo menos um dos reagentes necessários para realizar a introdução *in vitro* ou *in vivo* de RNA para o teste de amostras e/ou indivíduos. Por exemplo, componentes adequados dos kits podem incluir uma molécula de mNS da invenção e um veículo que promova a introdução da molécula de mNS em células de interesse, como aqui descrito (por exemplo, com utilização de lipídeos e de outros métodos de transfecção conhecidos na técnica; veja, por exemplo, Beigelman *e outros*, Patente U.S. Nº 6.395.713). O kit pode ser usado para validação de alvo, por exemplo, na determinação de função e/ou atividade gênica, ou na otimização de fármacos, e na descoberta de fármacos (veja, por exemplo, Usman *e outros*, U.S. Nº de Série 60/402.996). Um kit desse tipo também pode incluir instruções que permitam que um usuário do kit pratique a invenção.

Os termos "ácido nucleico de interferência curta", "siNA", "RNA de interferência curta", "siRNA", "molécula de ácido nucleico de interferência curta", "molécula de oligonucleotídeo de interferência curto" ou "molécula de ácido nucleico de interferência curto modificada quimicamente", como aqui usados, referem-se a qualquer molécula de ácido nucleico capaz de inibir ou infra-regular a expressão gênica ou replicação viral, por exemplo, por mediação da interferência de RNA "RNAi" ou silenciamento gênico de uma forma sequência-específica; veja, por exemplo, Bass, 2001, *Nature*, 411, 428-429; Elbashir *e outros*, 2001, *Nature*, 411, 494-498; e Kreutzer *e outros*, Publicação Internacional PCT Nº WO 00/44895; Zernicka-Goetz *e outros*, Publicação Internacional PCT Nº WO 01/36646; Fire, Publicação Internacional PCT Nº WO 99/32619; Plaetinck *e outros*, Publicação Internacional PCT Nº WO 00/01846; Mello e Fire, Publicação Internacional PCT Nº WO 01/29058; Deschamps-Depaillette, Publicação Internacional PCT Nº WO 99/07409; e Li *e outros*, Publicação Internacional PCT Nº WO 00/44914; Allshire, 2002, *Science*, 297, 1.818-1.819; Volpe *e outros*, 2002, *Science*, 297, 1.833-1.837; Jenuwein, 2002, *Science*, 297, 2.215-2.218; e Hall *e outros*, 2002, *Science*, 297, 2.232-2.237; Hutvagner e Zamore, 2002, *Science*, 297, 2.056-60; McManus *e outros*, 2002, *RNA*, 8, 842-850; Reinhart *e outros*, 20.02, *Gene &*

Dev., 16, 1.616-1.626; e Reinhart & Bartel, 2002, *Science*, 297, 1.831). Por exemplo, o siNA pode ser uma molécula de polinucleotídeo de fita dupla que compreende regiões sentido e antissenso complementares, em que a região antissenso compreende uma sequência de nucleotídeos que é complementar à sequência de nucleotídeos em uma molécula de ácido nucleico-alvo, ou uma porção desta, e a região sentido possui uma sequência de nucleotídeos que corresponde à sequência de ácidos nucleicos-alvo ou uma porção desta.

O siNA pode ser montado a partir de dois oligonucleotídeos separados, em que uma fita é a fita sentido e a outra é a fita antissenso, e em que as fitas antissenso e sentido são complementares (ou seja, cada fita compreende uma sequência de nucleotídeos que é complementar à sequência de nucleotídeos na outra fita; de tal forma que a fita antissenso e a fita sentido formem um dúplex ou uma estrutura de fita dupla, por exemplo, em que a região de fita dupla tem cerca de 19 pares de bases). A fita antissenso compreende uma sequência de nucleotídeos que é complementar à sequência de nucleotídeos em uma molécula de ácido nucleico-alvo ou uma porção desta, e a fita sentido compreende uma sequência de nucleotídeos que corresponde à sequência de ácidos nucleicos-alvo ou uma porção desta. Alternativamente, o siNA pode ser montado a partir de um único oligonucleotídeo, em que as regiões sentido e antissenso complementares do siNA estão ligadas por meio de um vinculador (ou vinculadores) baseado em ácido nucleico ou não baseado em ácido nucleico. O siNA pode ser um polinucleotídeo com uma estrutura em dúplex, em dúplex assimétrico, em *hairpin* ou em *hairpin* secundário assimétrico, que possui regiões sentido e antissenso complementares, em que a região antissenso compreende uma sequência de nucleotídeos que é complementar à sequência de nucleotídeos em uma molécula de ácido nucleico-alvo separada, ou uma porção desta, e a região sentido possuindo uma sequência de nucleotídeos que corresponde à sequência de ácidos nucleicos-alvo ou uma porção desta. O siNA pode ser um polinucleotídeo circular de fita simples que possui duas ou mais estruturas em alça e uma haste que compreende regiões sentido e antissenso complemen-

tares, em que a região antissenso compreende uma sequência de nucleotídeos que é complementar a uma sequência de nucleotídeos em uma molécula de ácido nucleico-alvo ou uma porção desta, e a região sentido possuindo uma sequência de nucleotídeos que corresponde à sequência de ácidos nucleicos-alvo ou uma porção desta. O polinucleotídeo circular pode ser processado *in vivo* ou *in vitro* para gerar uma molécula de siNA ativa capaz de mediar RNAi. O siNA também pode compreender um polinucleotídeo de fita simples que possui uma sequência de nucleotídeos complementar à sequência de nucleotídeos em uma molécula de ácido nucleico-alvo ou uma porção desta (por exemplo, em que essa molécula de siNA não necessita da presença dentro da molécula de siNA da sequência de nucleotídeos que corresponde à sequência de ácidos nucleicos-alvo ou uma porção desta). O polinucleotídeo de fita simples pode ainda compreender um grupo fosfato terminal, por exemplo, um 5'-fosfato (veja, por exemplo, Martinez e outros, 2002, *Cell.*, 110, 563-574 e Schwarz e outros, 2002, *Molecular Cell*, 10, 537-568), ou 5',3'-difosfato.

Em certas modalidades, a molécula de siNA da invenção pode incluir sequências ou regiões sentido e antissenso separadas, em que as regiões sentido e antissenso são ligadas de forma covalente por moléculas vinculadoras nucleotídicas ou não-nucleotídicas, como são conhecidas na técnica. Alternativamente, as regiões sentido e antissenso podem ser ligadas de forma não covalente por interações iônicas, ligações de hidrogênio, interações de van der Waals, interações hidrofóbicas e/ou interações de empilhamento. Em certas modalidades, as moléculas de siNA da invenção compreendem uma sequência de nucleotídeos que é complementar à sequência de nucleotídeos de um gene-alvo. A molécula de siNA da invenção pode interagir com a sequência de nucleotídeos de um gene-alvo de uma forma que cause inibição da expressão do gene-alvo. As moléculas de siNA da presente invenção não se limitam àquelas moléculas que contêm apenas RNA, mas podem ainda englobar nucleotídeos e não-nucleotídeos modificados quimicamente. Em certas modalidades, as moléculas de ácido nucleico de interferência curto da invenção são desprovidas de nucleotídeos que con-

têm 2'-hidróxi (2'-OH). Modalidades particulares incluem ácidos nucleicos de interferência curtos que não necessitam da presença de nucleotídeos que possuem um grupo 2'-hidróxi para mediar RNAi e, dessa forma, as moléculas de ácido nucleico de interferência curto da invenção opcionalmente não incluem nenhum ribonucleotídeo (ou seja, nucleotídeos que possuem a 2'-OH grupo). Essas moléculas de siNA que não necessitam da presença de ribonucleotídeos dentro da molécula de siNA para apoiar o RNAi podem ter, no entanto, um ou mais vinculadores anexados ou outros grupos, porções ou cadeias anexadas ou associadas contendo um ou mais nucleotídeos com grupos 2'-OH. Opcionalmente, as moléculas de siNA podem compreender ribonucleotídeos em cerca de 5, 10, 20, 30, 40 ou 50% das posições de nucleotídeos.

As moléculas modificadas de ácido nucleico de interferência curto da invenção também podem ser denominadas oligonucleotídeos de interferência modificados curtos "siMON". Como aqui usado, o termo "siNA" é equivalente a outros termos usados para descrever moléculas de ácido nucleico que são capazes de mediar RNAi sequência-específico como, por exemplo, RNA de interferência curto (siRNA), RNA de fita dupla (dsRNA), micro-RNA (miRNA), RNA *hairpin* curto (shRNA), oligonucleotídeo de interferência curto, ácido nucleico de interferência curto, oligonucleotídeo de interferência modificado curto, siRNA modificado quimicamente, RNA de silenciamento gênico pós-transcrição (ptgsRNA). Além disso, como aqui usado, o termo "RNAi" é equivalente a outros termos usados para descrever interferência de RNA sequência-específica como, por exemplo, silenciamento gênico pós-transcrição, inibição da tradução ou epigenética. Por exemplo, as moléculas de siNA da invenção podem ser usadas para silenciar genes de forma epigenética tanto no nível pós-transcrição quanto no nível pré-transcrição. Como forma de exemplo não limitante, a regulação epigenética da expressão gênica por moléculas de siNA da invenção pode resultar da modificação mediada por siNA da estrutura cromatina para alterar a expressão gênica (veja, por exemplo, Allshire, 2002, *Science*, 297, 1.818-1.819; Volpe e outros, 2002, *Science*, 297, 1.833-1.837; Jenuwein, 2002, *Science*,

297, 2.215-2.218; e Hall e outros, 2002, *Science*, 297, 2.232-2.237).

O termo "*hairpin* assimétrico" significa uma molécula de siNA linear que compreende uma região antissenso, uma porção em alça que pode compreender nucleotídeos ou não nucleotídeos, e uma região sentido
5 que compreende menos nucleotídeos do que a região antissenso (na medida em que a região sentido possui nucleotídeos complementares suficientes ao par de bases com a região antissenso e forma um dúplex com alça). Por exemplo, uma molécula de siNA de *hairpin* assimétrico da invenção pode compreender uma região antissenso que possui um comprimento suficiente
10 para mediar RNAi em uma célula ou em um sistema *in vitro* (por exemplo, cerca de 19 a cerca de 22 nucleotídeos) e uma região da alça que compreende cerca de 4 a cerca de 8 nucleotídeos, e uma região sentido que possui de cerca de 3 a cerca de 18 nucleotídeos que são complementares à região antissenso. A molécula de siNA de *hairpin* assimétrico também pode compreender um grupo fosfato no terminal 5' que pode ser modificado quimicamente.
15 A porção em alça da molécula de siNA de *hairpin* assimétrico pode compreender nucleotídeos, não nucleotídeos, moléculas vinculadoras ou moléculas conjugadas, como aqui descrito.

O termo "modular" significa que a expressão do gene, ou o nível
20 da molécula de RNA ou de moléculas de RNA equivalentes que codificam uma ou mais proteínas ou subunidades de proteína, ou atividade ou nível de uma ou mais proteínas ou subunidades de proteína, é supra-regulado ou infra-regulado, de tal forma que a expressão, o nível ou a atividade é maior ou menor do que aquele observado na ausência do modulador. Por exemplo, o termo "modular" pode significar "inibir", mas não se limita a essa definição.
25

Os termos "inibir", "infra-regular" ou "reduzir" significam que a expressão do gene, ou o nível de moléculas de RNA ou de moléculas de RNA equivalentes que codificam uma ou mais proteínas ou subunidades de
30 proteína, ou a atividade de uma ou mais proteínas ou subunidades de proteína, está reduzido abaixo daquele observado na ausência das moléculas de mNS da invenção. Em uma modalidade em particular, a inibição, infra-

regulação ou redução com uma molécula de mNS resulta em um nível que está abaixo do nível observado na presença de uma molécula inativa ou atenuada. Da mesma forma, a inibição, infra-regulação ou redução com moléculas de mNS resulta em um nível que está abaixo do nível observado na presença de, por exemplo, uma molécula de mNS com sequência embaralhada ou com não combinações. Em outro exemplo, a inibição, infra-regulação ou redução da expressão gênica com uma molécula de ácido nucleico da presente invenção é maior na presença da molécula de ácido nucleico do que em sua ausência.

O termo "gene" ou "gene-alvo" significa um ácido nucleico que codifica um RNA, por exemplo, sequências de ácidos nucleicos que incluem, sem limitação, genes estruturais que codificam um polipeptídeo. O gene-alvo pode ser um gene derivado de uma célula, um gene endógeno, um transgene, ou genes exógenos, tais como genes de um patógeno (por exemplo, um vírus), que está presente na célula após infecção. A célula que contém o gene-alvo pode ser derivada de ou contida em qualquer organismo, por exemplo, uma planta, animal, protozoário, vírus, bactéria, ou fungo. Exemplos não limitantes de plantas incluem monocotiledôneas, dicotiledôneas ou gimnospermas e, mais especificamente, *Arabidopsis*, girassol, algodão, canola, milho, palma, tabaco, amendoim ou soja. Exemplos não limitantes de animais incluem vertebrados ou invertebrados. Exemplos não limitantes de fungos incluem bolores ou leveduras.

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

"Região sentido" significa uma sequência de nucleotídeos de uma molécula de siNA que possui complementaridade para uma região antissenso da molécula de siNA. A região sentido de uma molécula de siNA pode compreender uma sequência de ácidos nucleicos que possui homologia (ou seja, identidade de sequências ou identidade parcial) com uma sequência de ácidos nucleicos-alvo.

"Região antissenso" significa uma sequência de nucleotídeos de uma molécula de siNA que possui complementaridade para uma sequência de ácidos nucleicos-alvo. Além disso, a região antissenso de uma molécula de siNA pode opcionalmente compreender uma sequência ácidos de nucleicos que possui complementaridade para uma região sentido da molécula de siNA.

"Ácido nucleico-alvo" significa qualquer sequência de ácidos nucleicos cuja expressão ou atividade se deseja modular. O ácido nucleico-alvo pode ser DNA ou RNA, por exemplo, DNA ou RNA endógeno, DNA viral ou RNA viral, ou outro RNA codificado por um gene de um vírus, bactéria, fungo, animal ou planta.

Como usado neste pedido, o termo "que trata" ou "tratamento" não exige uma alteração completa de um fenótipo. Isso significa que os sintomas da condição subjacente são pelo menos reduzidos e/ou que uma ou mais das causas ou mecanismos celulares, fisiológicos ou bioquímicos subjacentes que causam os sintomas são reduzidos e/ou eliminados. Deve-se entender que "reduzido", quando usado nesse contexto, significa em relação ao estado da condição, incluindo o estado molecular da condição, não apenas ao estado fisiológico da condição.

O termo "condição" significa qualquer estado em um indivíduo ou organismo que se deseja alterar. Esse estado deve ser atribuível à expressão ou à ausência de expressão de um gene, uma sequência de nucleotídeos e/ou de proteínas. Exemplos de condições incluem, sem limitação, doenças, anormalidades genéticas, infecções, cânceres, mutações e condições cosméticas que incluem, sem limitação, alopecia, obesidade e enrugamento cutâneo. Um exemplo não limitante adicional de uma condição é o estado normal em um indivíduo. Por exemplo, a produção normal de ácido graxo em uma planta (por exemplo, *Arabidopsis*, girassol, algodão, canola, milho, palma, tabaco, amendoim ou soja) é uma condição que pode ser alterada com o uso das composições e dos métodos da presente invenção. Dessa forma, o termo condição inclui qualquer estado que possa ser alterado por razões científicas, agrícolas, médicas e/ou pessoais.

O termo "complementaridade" significa que um ácido nucleico pode formar ligação (ou ligações) de hidrogênio com outra sequência de ácidos nucleicos por pareamento de bases de Watson-Crick tradicional, pareamento de bases de Hoogstein e/ou pareamento de bases de Hoogstein reverso, ou outros tipos não tradicionais. Em referência às moléculas de ácidos nucleicos da presente invenção, a energia de ligação livre para uma molécula de ácido nucleico com sua sequência complementar é suficiente para permitir que a função relevante do ácido nucleico proceda (por exemplo, atividade de RNAi). A determinação das energias de ligação livres para moléculas de ácido nucleico é bem-conhecida na técnica (veja, por exemplo, Turner e outros, 1987, *CSH Symp. Quant. Biol. LII* páginas 123-133; Frier e outros, 1986, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 9.373-9.377; Turner e outros, 1987, *J. Am. Chem. Soc.* 109: 3.783-3.785).

Um percentual de complementaridade indica a percentagem de resíduos contíguos em uma molécula de ácido nucleico que pode formar ligações de hidrogênio (por exemplo, pareamento de bases de Watson-Crick) com uma segunda sequência de ácidos nucleicos (por exemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10 de 10 sendo 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100% de complementaridade). "Complementaridade perfeita" significa que todos os resíduos contíguos de uma sequência de ácidos nucleicos se ligarão por hidrogênio com o mesmo número de resíduos contíguos em uma segunda sequência de ácidos nucleicos.

As moléculas de siNA da invenção representam uma nova abordagem terapêutica para um amplo espectro de doenças e condições, incluindo câncer ou doença cancerosa, doença infecciosa, doença cardiovascular, doença neurológica, doença de príon, doença inflamatória, doença autoimune, doença pulmonar, doença renal, doença hepática, doença mitocondrial, doença endócrina, doenças e condições relacionadas à reprodução, síntese de produto animal ou de planta e quaisquer outras indicações que possam responder ao nível de um produto gênico expresso em uma célula ou em um organismo.

Como aqui usado, o termo "célula" é usado em seu sentido bio-

lógico usual, e não se refere a um organismo multicelular inteiro. A célula pode estar presente em um organismo (por exemplo, plantas e animais, incluindo mamíferos). A célula pode ser procariótica (por exemplo, células bacterianas) ou eucariótica (por exemplo, célula de mamíferos ou de plantas). A
5 célula pode ser originada de linhagem somática ou germinativa, totipotente ou pluripotente, em divisão ou não divisão. A célula também pode ser derivada de ou pode compreender um gameta ou embrião, uma célula-tronco ou uma célula totalmente diferenciada como, por exemplo, de um animal, uma bactéria, uma planta ou semente.

10 As moléculas de mNS da invenção podem ser adicionadas diretamente ou podem formar complexos com lipídeos catiônicos, embaladas dentro de lipossomos, ou de algum outro modo liberadas às células-alvo ou aos tecidos. O ácido nucleico ou os complexos de ácido nucleico podem ser administrados localmente aos tecidos relevantes *ex vivo* ou *in vivo* por meio
15 de, por exemplo, injeção, liberação por bombardeamento de partículas (*gene gun*), bomba de infusão ou endoprótese, com ou sem sua incorporação em biopolímeros.

Em outro aspecto, a invenção fornece células que contêm uma ou mais moléculas de mNS desta invenção. Uma ou mais moléculas de
20 mNS podem ser direcionadas independentemente ao mesmo local ou a locais diferentes.

"RNA" significa uma molécula que compreende pelo menos um resíduo de ribonucleotídeo. O termo "ribonucleotídeo" significa um nucleotídeo com um grupo hidroxila na posição 2' de uma porção β -D-ribo-furanose.
25 Os termos incluem RNA de fita dupla, RNA de fita simples, RNA isolado como, por exemplo, RNA parcialmente purificado, RNA essencialmente puro, RNA sintético, RNA produzido de forma recombinante, bem como RNA alterado que difere do RNA de ocorrência natural pela adição, eliminação, substituição e/ou alteração de um ou mais nucleotídeos. Essas alterações podem
30 incluir a adição de material não nucleotídico, por exemplo, à(s) extremidade(s) do siNA ou internamente (por exemplo, em um ou mais nucleotídeos do RNA). Os nucleotídeos nas moléculas de RNA da presente invenção

também podem compreender nucleotídeos não padronizados, tais como nucleotídeos de ocorrência não-natural ou nucleotídeos ou desoxinucleotídeos sintetizados quimicamente. Esses RNAs alterados podem ser denominados análogos ou como análogos de RNA de ocorrência natural.

5 O termo "indivíduo" significa um organismo, que é um doador ou receptor de células explantadas ou as próprias células. "Indivíduo" também se refere a um organismo ao qual as moléculas de ácido nucleico da invenção podem ser administradas. Um indivíduo pode ser uma planta, células de plantas, um mamífero ou células de mamíferos, incluindo células humanas.

10 Outra modalidade da invenção fornece um método de produção de uma planta com níveis modificados de ácidos graxos do componente endógeno. O método inclui a modulação dos níveis de um gene heterólogo, por exemplo, um gene da síntese de ácido graxo ou do metabolismo de lipídeos. A produção de ácido graxo em plantas e sementes pode ser modificada.

15 Plantas representativas que podem ser modificadas por meio da presente invenção incluem, por exemplo, *Arabidopsis*, girassol, algodão, colza (incluindo canola), milho, trigo, mamona, palma, tabaco, amendoim, sorgo, cana-de-açúcar e soja.

A mNS da presente invenção, individualmente, em combinação

20 com outros compostos ou em conjunto com outros compostos (por exemplo, fármacos), pode ser usada para o tratamento de doenças ou condições aqui discutidas (por exemplo, cânceres e outras condições proliferativas, infecção viral, doença inflamatória, autoimunidade, doença pulmonar, doença renal, doença ocular etc.). Por exemplo, para tratar uma doença ou condição em

25 particular, as moléculas de mNS podem ser administradas a um indivíduo ou podem ser administradas a outras células apropriadas evidentes àqueles versados na técnica, individualmente ou em combinação com um ou mais fármacos sob condições adequadas ao tratamento.

Em uma modalidade de exemplo adicional, as moléculas de

30 mNS podem ser usadas em combinação com outros tratamentos conhecidos para tratar condições ou doenças discutidas acima. Por exemplo, as moléculas descritas poderiam ser usadas em combinação com um ou mais agentes

terapêuticos conhecidos para o tratamento de uma doença ou condição. Exemplos não limitantes de outros agentes terapêuticos que podem ser facilmente combinados com uma molécula de mNS da invenção são moléculas enzimáticas de ácido nucleico, moléculas alostéricas de ácido nucleico, moléculas de ácido nucleico antissenso, de "isca" (*decoy*) ou de aptâmero, anticorpos (por exemplo, anticorpos monoclonais), pequenas moléculas e outros compostos orgânicos e/ou inorgânicos, incluindo metais, sais e íons.

Técnicas computacionais de modelagem para uso na previsão /avaliação de derivados da presente invenção incluem, sem limitação: MFold versão 3.1 disponível por "Genetics Corporation Group", Madison, WI (see Zucker e outros, "Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide". Em: "RNA Biochemistry and Biotechnology", 11-43, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, eds., "NATO ASI Series", Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, (1999); Zucker e outros, "Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure". *J. Mol. Biol.* 288, 911-940 (1999); Zucker e outros, "RNA Secondary Structure Prediction". Em: "Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry" S. Beaucage, D.E. Bergstrom, G.D. Glick, e R.A. Jones eds., John Wiley & Sons, Nova York, 11.2.1-11.2.10, (2000)), "COVE (RNA structure analysis using covariance models (stochastic context free grammar methods))" v. 2.4.2 (Eddy & Durbin, *Nucl. Acids Res.* 1994, 22: 2.079-2.088) que é distribuído livremente como código-fonte e que pode ser baixado por acesso à página da Internet <http://www.genetics.wusth.edu/Jeddy/software/>, e FOLDALIGN, também distribuído livremente e que pode ser baixado em <http://www.bioinf.au.dk/FOLDALIGN/> (veja "Finding the most significant common sequence and structure motifs in a set of RNA sequences". J. Gorodkin, L. J. Heyer e G. D. Stormo. *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, Nº 18 páginas 3.724-3.732, 1997; "Finding Common Sequence and Structure Motifs in a set of RNA Sequences". J. Gorodkin, L. J. Heyer e G. D. Stormo. *ISMB* 5; 120-123, 1997).

A presente invenção é ainda descrita nos exemplos seguintes,

que são oferecidos como forma de ilustração e não têm a intenção de limitar a invenção de forma alguma.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Construção de plasmídeo

5 pPHAS-Fab1-HP: RNAi *hairpin* foi empregado para diminuir os níveis de KASII (também conhecido frequentemente denominado neste pedido "Fab1"). Os fragmentos sentido, antissenso e de íntron foram montados no vetor de plasmídeo pGEM-T-Easy (Promega), antes da clonagem no vetor binário pDsRed-PHAS como fragmento de *PacI*-*XhoI*. Um fragmento de
10 178 bp de UTR 5' do éxon 1 de At1g74960 (*FAB1*), que não é homólogo a qualquer outra sequência de *Arabidopsis* que codifica as enzimas KASI ou KASIII, foi amplificado pelo DNA genômico de *Arabidopsis* usando os oligonucleotídeos TTAATTAACGCATCGAAGCTCTCTGCACGC (ID. DE SEQ. Nº: 1) e GCTAGCGGCTTTGAGAAGAACCCAG (ID. DE SEQ. Nº: 2) e sub-
15 sequentemente clonado em pGEM-T-Easy (Promega), de tal forma que o sítio de *NheI* do inserto estivesse adjacente ao sítio de *PstI* de pGEM-T-Easy para criar pGEM-T-Easy-HTML1.

O primeiro íntron de *FAD2* foi então amplificado usando os oligonucleotídeos GCTAGCGTCAGCTCCATCTCCAGGTCC (ID. DE SEQ. Nº: 3) e GCTAGCGTTTCTGCAGAAAACCAAAGC (ID. DE SEQ. Nº: 4), de tal modo que esse fragmento contivesse 17 bp do éxon 1 e 4 bp do éxon 2 para assegurar a inclusão do *splice site* 5' e 3'. Esse fragmento foi então clonado no sítio de *PstI*/*NheI* de pGEM-T-Easy-HTML1 para criar pGEM-T-Easy-HTML2. Para completar a repetição invertida para *hairpin* de *Fab1*, o fragmento de UTR 5' original de 178 bp foi amplificado usando os iniciadores CTG-CAGAAACCCGGGCATCGAAGCTCTCTGCACGC (ID. DE SEQ. Nº: 5) e GAGCTCCTCGAGGGCTTTGAGAAGAACCCAG (ID. DE SEQ. Nº: 6), e clonado no sítio de *SacI*/*PstI* de pGEM-T-Easy-HTML2, para gerar pGEM-T-Easy-HTML3. A sequência de *hairpin* de *Fab1* resultante foi removida de
25 pGEM-T-Easy-HTML3 e inserida em pDs-red-PHAS como um fragmento de *PacI*/*XhoI* para produzir pPHAS-FAB1-HP (FIG. 1).

pPHAS-Fab1-HPAS: o primeiro éxon de 107 bp do gene de

Fab1 foi amplificado pelo DNA genômico usando os iniciadores KasII-éxon 5'-BglIII (GGGAGATCTGGCGCGCCGGCTATCTCCTCCACCGTGA (ID. DE SEQ. Nº: 7) e KasII-éxon 3'-SpeI (GGGACTAGTTCTTCCTTTTTATGC-CATGG (ID. DE SEQ. Nº: 8)). O fragmento foi substituído com uma parte de
 5 Fad2-Íntron em SpeI-BglIII em pGEM-T-Easy-HTM3, e depois um cassete contendo *hairpin* de FAB1, introns e Fab1 antissenso foi substituído com *hairpin* de pPHAS-Fab1-HP-íntron inteiro, como representado na FIG. 1.

pPHAS-Fab1-AS: o UTR 5' de 178 bp do gene de FAB1 acima foi amplificado usando os iniciadores KasII-UTR 5'-NheI/XhoI (GGCTC-GAGCTAGCCGCATCGAAGCTCTCTGCACGC (ID. DE SEQ. Nº: 9)) e KasII-UTR 3'-PacI (GGTTAATTAAGGCTTTGAGAAGAACCCAG (ID. DE SEQ. Nº: 10)). Um fragmento foi substituído com *hairpin* de Fab1-íntron inteiro em pPHAS-Fab1-HP a PacI-XhoI, como representado na FIG. 1.

pPHAS-Fad2-HP: os 118 bp do UTR 5' sentido e antissenso de seqüências não codificadas de Fad2 foram amplificados por DNA genômico e substituídos com UTR 5' sentido e antissenso de KasII em pPHAS-Fab1-HP, como representado na FIG. 2.

pPHAS-Fad2-HPAS: 1.152 bp do gene Fad2 foram amplificados com os iniciadores FAD2-5' SphI (CGCATGCATGGGTGCAGGTGGAAGA-AT (ID. DE SEQ. Nº: 11)) e FAD2-3' SpeI (CCACTAGTTCATAACT-TATTGTTGTACCA (ID. DE SEQ. Nº: 12)); o fragmento foi substituído com a parte do íntron de Fad2 em SpeI-SphI na direção antissenso, como representado na FIG. 2.

pPHAS-Fad2-AS: o gene Fad2 foi amplificado com os iniciadores FAD2-5' XhoI (CCCTCGAGATGGGTGCAGGTGGAAGAAT (ID. DE SEQ. Nº: 13)) e FAD2-3' PacI (CCTTAATTAATCATAACTTATTGTTGTACCA (ID. DE SEQ. Nº: 14)), e depois substituído com cassete de Fad2-HP em pPHAS-Fad2-HP em PacI-XhoI na direção antissenso, como representado na FIG. 3.

pPHAS-Fad3-HP: 138 bp de UTR 3' sentido e antissenso do gene de Fad3 foram amplificados por DNA genômico. Os fragmentos foram substituídos com UTR 5' sentido e antissenso de Fab1 em pPHAS-Fab1-HP,

como representado na FIG. 3.

pPHAS-Fad3-HPAS: o primeiro éxon de 301 bp do gene de Fad3 foi amplificado com os iniciadores Fad3-anti-5' BglII (GGA-GATCTGGCGCGCCCGTGGCCGAGAACAAGATG (ID. DE SEQ. Nº: 15)) e Fad3-anti-3' SpeI (GGGACTAGTGTGTTGCTATGGACCAACGC (ID. DE SEQ. Nº: 16)), e depois substituído com uma parte de Fad2-íntron em BglII-SpeI na direção antissenso, como representado na FIG. 3.

pPHAS-Fad3-AS: o primeiro éxon de 301 bp do gene de Fad3 foi amplificado por DNA genômico usando os iniciadores Fad3-anti-5' PacI (GGGTTAATTAACGTGGCCGAGAACAAGATG (ID. DE SEQ. Nº: 17)) e Fad3-anti-3' XhoI (CCCTCGAGAGTTGTTGCTATGGACCAACGC (ID. DE SEQ. Nº: 18)). O fragmento foi substituído com o cassete de Fad3-HP em PacI-XhoI, como representado na FIG. 3.

Exemplo 2

15 Cultivo e transformação de *Arabidopsis*

Arabidopsis foi cultivada sob aproximadamente 250 μ E de luz com um fotoperíodo de 16/8 h (claro/escuro) a 20°C. Os vetores foram introduzidos em *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 pMP90 por eletroporação, e usados para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* pelo método de imersão floral (Bechtold, N., Ellis, J. e Pelletier, G. (1993) *C. R. Acad. Sci. Paris* 316, 1.194-1.198). A transformação foi realizada aproximadamente 5 dias após a florescência inicial.

Exemplo 3

Determinação do teor de ácido graxo em sementes de *Arabidopsis*

25 *Análise de ácido graxo*: as sementes foram metiladas (1 ml de HCl 1 N, metanol (Supelco), 80°C por 1 h), extraídas com hexano e trimetilsililadas (100 μ l de BSTFA-TMCS (bis(trimetilsilil) trifluoracetamidatrimetilsilano) (Supelco), 90°C por 45 min). O BSTFA-TMCS foi removido por evaporação e a amostra foi ressuspensa em hexano. As amostras foram analisadas em um cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 6890 equipado com um detector de massa seletivo 5973 (GC/MS) e uma coluna capilar ciano SP-2340 (Supelco) (60 m x 250 μ m x 025 μ m). O injetor foi mantido a 225°C, a tempera-

tura do forno foi variada (100-240°C a 15°C/min, seguido por 240°C por 5 min), e o fluxo de Hélio foi de 1,1 ml/min. A definição das identidades de pico foi realizada com base no tempo de eluição versus padrões autênticos, e validada com base em seus espectros de massa. A quantificação foi realizada com o uso de um software "Hewlett-Packard chemstation".

Exemplo 4

Modulação da síntese de ácido graxo em *Arabidopsis*

Foram comparados, três métodos de supressão gênica (antisense, RNAi *hairpin*, e RNAi *hairpin* com antisense) do gene no íntron. Embora sem se prender a uma teoria, mNAs contendo RNAi *hairpin* e sequências antisense podem ser mais potentes no silenciamento gênico por meio de um modelo como, por exemplo, aquele apresentado na FIG. 4. No modelo da FIG. 4, mediante emenda (*splicing*) do íntron para criar o siRNA, um fragmento de DNA contendo uma porção antisense do gene seria criado, fornecendo, dessa forma, um método potencial adicional de redução da expressão gênica, além do RNAi, substrato de *dicer*, que é gerado.

Foram escolhidos três genes para a comparação dos três métodos de supressão gênica (as 12 dessaturases FAB2 e as 15 dessaturase FAD3, pois elas são facilmente pontuadas; e a FAD2, pois foi usada anteriormente para avaliação da redução da expressão gênica), bem como β -cetoacil-ACP sintase (KAS) II. O relacionamento entre essas enzimas e a síntese de ácido graxo em *Arabidopsis* é apresentado na FIG. 5.

Além de ser o tecido-alvo para modificação do teor de ácido graxo de cultivo de oleaginosas, as sementes fornecem uma fonte confiável de material para se analisar de forma reprodutível os resultados das transformações realizadas com o uso dos constructos criados no Exemplo 1. Dessa forma, o teor de ácido graxo de sementes das plantas transformadas foi analisado por cromatografia a gás e análise espectrométrica de massa para confirmar qualitativamente as definições de picos como sendo específicos de ácidos graxos. O Teste t de Student foi usado para atribuir significância às diferenças entre as médias (com base em 10 ou mais amostras por média). Os resultados para os constructos criados no Exemplo 1 são representados

nos Exemplos 5-8 abaixo.

Exemplo 5

Modulação da Expressão de FAB1

FAB1 alonga os ácidos graxos de 16 átomos de carbono (C16) para 18 átomos de carbono (C18) no plastídeo. Para FAB1, os níveis de ácidos graxos 16:0 mais 16:1 (os substratos para FAB1) foram comparados com os níveis de seu produto 18:0 e 18:1 mais metabólitos 18:2 e 18:3. *Arabidopsis* do tipo selvagem foi comparada com a linhagem mutante *fab1 fae1* e com a linhagem mutante *fab1. fae1* transformada com o FAB1 *hairpin* (Fab1-HP) ou com o FAB1 que inclui o *hairpin* e antissenso combinados (fab1-HPAS). Os resultados são apresentados na FIG. 6 e resumidos graficamente na FIG. 7. A linhagem *fab1 fae1* mostrou um aumento significativo em ácidos graxos C18 em consequência da mutação *fae1* que bloqueia o alongamento adicional no nível 20C. A introdução do fab1-HP no nível de fundo do mutante *fab1 fae1* diminuiu os ácidos graxos C18 de 74,2% para 53,4%, enquanto a introdução do constructo de fab1-HPAS resultou em uma diminuição até 41,6% de ácidos graxos 18C.

Exemplo 6

Modulação da Expressão de FAD2

Para FAD2, os níveis de ácidos graxos 18:1 (o substrato para FAD2) foram comparados com os níveis de seu produto 18:2 e do metabólito 18:3. Para análise, 18:2 foi somado com 18:3 para estimar a proporção total de ácido graxo que foi dessaturada por FAD2. *Arabidopsis* do tipo selvagem foi comparada com FAD2-antissenso (Fad2-AS), FAD2 RNAi *hairpin* (Fad2-HP), e FAD2 foi comparada com o *hairpin* e antissenso combinados (Fad2-HPAS). Cada um desses foi comparado como o mutante mais severo de FAD2, FAD2-2 (Fad2-MT). Os resultados são apresentados nas FIGs. 8 e 9 e são resumidos graficamente na FIG. 10.

Os níveis do tipo selvagem de 18:2+18:3 foram de 43%, que declinaram até 18,9% no Fad2-AS, e até 9,4% na linhagem Fad2-HP. Ambas as alterações foram significantes no nível de $P < 0,01$. O declínio de 9,4% na linhagem Fad2-HP até 7,2% na linhagem Fad2-HPAS foi significativa no ní-

vel de $P < 0,05$. O nível de 7,2% na linhagem Fad2-HPAS não foi significativamente diferente daquele da fad2-MT a 7,5%.

Exemplo 7

Modulação da expressão de FAD2 com a introdução da Expressão de GUS

5 Para FAD2, os níveis de ácidos graxos 18:1 (o substrato para FAD2) foram comparados com os níveis de seu produto 18:2 e do metabólito 18:3. Para análise, 18:2 foi somado com 18:3 para se obter a proporção total de ácido graxo que foi dessaturada por FAD2. *Arabidopsis* do tipo selvagem foi comparada com FAD2 RNAi *hairpin* contendo o gene de GUS no íntron
10 (Fad2-HP-GUS). Os resultados são apresentados nas FIGs. 11 e 12.

Os níveis do tipo selvagem de 18:2+18:3 foram de 49%, que declinou até 12,3% no Fad2-HP-GUS. A alteração foi significativa no nível de $P < 0,01$. Além disso, a coloração azul para GUS era aparente nas sementes transformadas, indicando expressão de GUS naquelas sementes.

15 Exemplo 8

Modulação da expressão de FAD3

Para FAD3, os níveis de ácidos graxos 18:1 mais 18:2 (18:2 sendo o substrato para FAD3) foram comparados com os níveis de seu produto 18:3. *Arabidopsis* do tipo selvagem foi comparada com FAD3-
20 antissenso (Fad3-AS), com FAD3 *hairpin* (RNAi Fad3-HP) e com FAD3 com o *hairpin* e antissenso combinados (Fad3-HPAS). Os resultados são apresentados nas FIGs. 13 e 14 e resumidos graficamente na FIG. 15.

Os níveis do tipo selvagem de 18:3 foram de 17,0%, e declinaram até 10,7% no Fad3-AS, 4,5% na linhagem Fad3-HP e 3,0% na linhagem
25 Fad3-HPAS. Todos os tratamentos foram significativamente diferentes de todos os outros tratamentos no nível de $P < 0,01$. A linhagem Fad3-HPAS a 3,0% não foi significativamente diferente do mais forte alelo do mutante Fad3, Fad3-3, a 2,8%.

Embora a invenção tenha sido descrita em certas modalidades
30 de exemplo, a presente invenção pode ainda ser modificada dentro do espírito e do escopo dessa descrição. Esse pedido visa, portanto, cobrir quaisquer variações, usos ou adaptações da invenção com o uso de seus princí-

pios gerais. Além disso, esse pedido visa cobrir essas modificações da presente revelação na medida em que estejam incluídas na prática conhecida ou habitual na técnica à qual essa invenção pertence e que se incluem nos limites das reivindicações em anexo.

5 Todas as referências, incluindo publicações, patentes e pedidos de patentes aqui citados são aqui incorporados por referência no mesmo grau como se cada referência fosse individual e especificamente indicada para ser incorporada por referência e fosse aqui apresentada em sua totalidade. As referências aqui discutidas são fornecidas unicamente quanto à
10 sua revelação antes da data de depósito do presente pedido. Nada aqui apresentado deve ser considerado como uma admissão de que os inventores não são elegíveis para antedatar esta descrição em virtude da invenção anterior.

REIVINDICAÇÕES

1. Constructo de nucleotídeos que compreende:

- uma sequência de nucleotídeos que forma uma haste e uma alça;

5 - em que a alça compreende uma primeira sequência de nucleotídeos que modula a expressão de um alvo;

- em que a haste compreende uma segunda sequência de nucleotídeos que modula a expressão de um alvo; e

10 - em que o alvo modulado pela primeira sequência de nucleotídeos e o alvo modulado pela segunda sequência de nucleotídeos podem ser iguais ou diferentes.

2. Constructo de nucleotídeos de acordo com a reivindicação 1, em que a segunda sequência de nucleotídeos que modula a expressão de um alvo modula a expressão do alvo por meio de uma via de RNAi.

15 3. Constructo de nucleotídeos de acordo com a reivindicação 1, em que a primeira sequência de nucleotídeos que modula a expressão de um alvo modula a expressão do alvo por meio da modulação antissenso da expressão.

20 4. Constructo de nucleotídeos da reivindicação 1, que compreende ainda um gene de interesse ligado operacionalmente a um promotor, e em que a alça pode ou não compreender uma sequência de nucleotídeos que modula a expressão de um alvo.

5. Constructo de nucleotídeos da reivindicação 4, em que o gene de interesse ligado operacionalmente a um promotor está localizado na alça.

25 6. Constructo de nucleotídeos da reivindicação 1, que compreende ainda um ou mais splici sites na alça.

7. Constructo de nucleotídeos da reivindicação 1, em que a alça contém mais de uma sequência de nucleotídeos que modula a expressão de um alvo.

30 8. Constructo de nucleotídeos da reivindicação 7, em que cada sequência de nucleotídeos que modula a expressão de um alvo pode regular a expressão do mesmo alvo ou de um alvo diferente.

9. Constructo de nucleotídeos da reivindicação 1, em que a haste contém mais de uma sequência de nucleotídeos que modula a expressão de um alvo.

5 10. Constructo de nucleotídeos da reivindicação 9, em que cada sequência de nucleotídeos que modula a expressão de um alvo pode regular a expressão do mesmo alvo ou de um alvo diferente.

10 11. Constructo de nucleotídeos da reivindicação 1, em que a haste contém uma ou mais sequências de nucleotídeos que regulam a expressão de um ou mais alvos e em que a alça contém uma ou mais sequências de nucleotídeos que regulam a expressão de um ou mais alvos.

12. Constructo de nucleotídeos da reivindicação 1, em que a sequência de nucleotídeos compreende um PNA.

15 13. Constructo de nucleotídeos da reivindicação 12, em que os PNAs são selecionados do grupo que consiste em PNAs de N-(2-aminoetil)glicina, PNAs de ciclohexila, PNAs retro-inversos, PNAs de fosfona, PNAs de propinila, e PNAs de aminoprolina.

14. Constructo de nucleotídeos da reivindicação 12, em que a sequência de nucleotídeos é sintetizada por um processo de Fmoc e/ou de tBoc.

20 15. Constructo de nucleotídeos da reivindicação 1, em que a sequência de nucleotídeos compreende uma base sintética.

16. Constructo de nucleotídeos da reivindicação 15, em que a base sintética é selecionada do grupo que consiste em 2'-O-metila, morfolino, fosforotioato e bases *locked-in*.

25 17. Constructo de nucleotídeos da reivindicação 1, em que a sequência de nucleotídeos compreende um açúcar modificador.

18. Constructo de nucleotídeos da reivindicação 17, em que o açúcar modificador é selecionado do grupo que consiste em 2'-O-metil ribose, 2'-O-alquil ribose, e 2'-O-alil ribose.

30 19. Constructo de nucleotídeos da reivindicação 1, em que o alvo é um gene, uma sequência de oligonucleotídeos e/ou uma proteína.

20. Vetor que compreende o constructo de nucleotídeos como

definido na reivindicação 1, ligada operacionalmente a um promotor.

21. Vetor da reivindicação 20, em que o promotor é selecionado do grupo que consiste em promotores virais, retrovirais, de mamíferos, de planta, bacterianos, constitutivos, reguláveis, fúngicos, de levedura e de inseto.

22. Vetor da reivindicação 21, em que o promotor de planta é selecionado do grupo que consiste em promotores identificados em *Arabidopsis*, girassol, algodão, canola, milho, trigo, mamona, palma, tabaco, amendoim, sorgo, cana-de-açúcar e soja.

23. Vetor da reivindicação 20, em que o vetor é selecionado do grupo que consiste em plasmídeos, cosmídeos, vetores retrovirais, agrobactérias, vetores virais, vetores bacterianos, vetores de levedura, vetores eucarióticos, vetores de plantas e vetores de mamíferos.

24. Vetor da reivindicação 20, que compreende ainda sequências que promovem a integração em um genoma do constructo de nucleotídeos como definido na reivindicação 1 ligada operacionalmente a um promotor.

25. Método de regulação da expressão de um alvo, o método compreendendo:

- fornecimento a uma célula do constructo de nucleotídeos como definido na reivindicação 1; e

- o cultivo da referida célula.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, em que a célula é selecionada do grupo que consiste em células procarióticas, eucarióticas, bacterianas, de agrobactérias, de leveduras, de plantas, de mamíferos, e humanas.

27. Método de acordo com a reivindicação 26, em que a célula de planta é selecionada do grupo que consiste em promotores identificados em células de *Arabidopsis*, girassol, algodão, canola, milho, trigo, mamona, palma, tabaco, amendoim, sorgo, cana-de-açúcar e soja.

28. Método de acordo com a reivindicação 25, em que o alvo é um gene, uma sequência de oligonucleotídeos e/ou uma proteína.

29. Método de regulação da expressão de um alvo, o método compreendendo:

- o fornecimento a uma célula de um vetor que compreende o vetor como definido na reivindicação 20; e

5 - a expressão do constructo de nucleotídeos como definido na reivindicação 1, pelo referido vetor na referida célula.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, em que o alvo é um gene, uma sequência de oligonucleotídeos e/ou uma proteína.

31. Método de acordo com a reivindicação 29, em que a célula é
10 selecionada do grupo que consiste em células procarióticas, eucarióticas, bacterianas, de agrobactérias, de leveduras, de plantas, de mamíferos, e humanas.

32. Método de acordo com a reivindicação 31, em que a célula de planta é selecionada do grupo que consiste em células de *Arabidopsis*,
15 girassol, algodão, canola, milho, trigo, mamona, palma, tabaco, amendoim, sorgo, cana-de-açúcar e soja.

33. Método de tratamento de uma condição em um indivíduo, o método compreendendo:

20 - a administração ao indivíduo do constructo de nucleotídeos como definido na reivindicação 1.

34. Método de tratamento de uma condição em um indivíduo, o método compreendendo a administração do vetor como definido na reivindicação 20 ao indivíduo.

25 35. Medicamento que compreende o constructo de nucleotídeos como definido na reivindicação 1 e um veículo, diluente e/ou adjuvante farmacologicamente aceitável.

36. Composição de medicamento que compreende o vetor de acordo com a reivindicação 20 e um veículo, diluente e/ou adjuvante farmacologicamente aceitável.

30 37. Célula que compreende o constructo de nucleotídeos como definido na reivindicação 1.

38. Célula de acordo com a reivindicação 37, em que a célula é

selecionada do grupo que consiste em células procarióticas, eucarióticas, bacterianas, de agrobactérias, de leveduras, de plantas, de mamíferos, e humanas.

5 39. Célula de acordo com a reivindicação 38, em que a planta é selecionada do grupo que consiste em *Arabidopsis*, girassol, algodão, canola, milho, trigo, mamona, palma, tabaco, amendoim, sorgo, cana-de-açúcar e soja.

40. Método de produção de um constructo para a regulação de um alvo, o método compreendendo:

10 - a combinação em uma única sequência nucléica de uma primeira e uma segunda sequências capazes de pareamento de bases para formar uma estrutura de haste-alça no constructo, e uma terceira sequência, disposta entre a primeira e a segunda sequências;

15 - em que as referidas primeira e segunda sequências, quando submetidas ao pareamento de bases, são capazes de gerar um siRNA;

- em que a referida terceira sequência é de comprimento suficiente para permitir que a primeira e a segunda sequências sejam pareadas de forma estável entre elas; e

20 - em que a referida terceira sequência compreende uma sequência capaz de modular um alvo por meio de supressão antissenso.

41. Método de acordo com a reivindicação 40, que compreende ainda a combinação, com a primeira e a segunda sequências, de uma quarta sequência que compreende um gene de interesse ligado operacionalmente a um promotor; em que a terceira sequência pode ou não estar presente.

25 42. Método de acordo com a reivindicação 40, em que a quarta sequência está disposta entre a primeira e a segunda sequências.

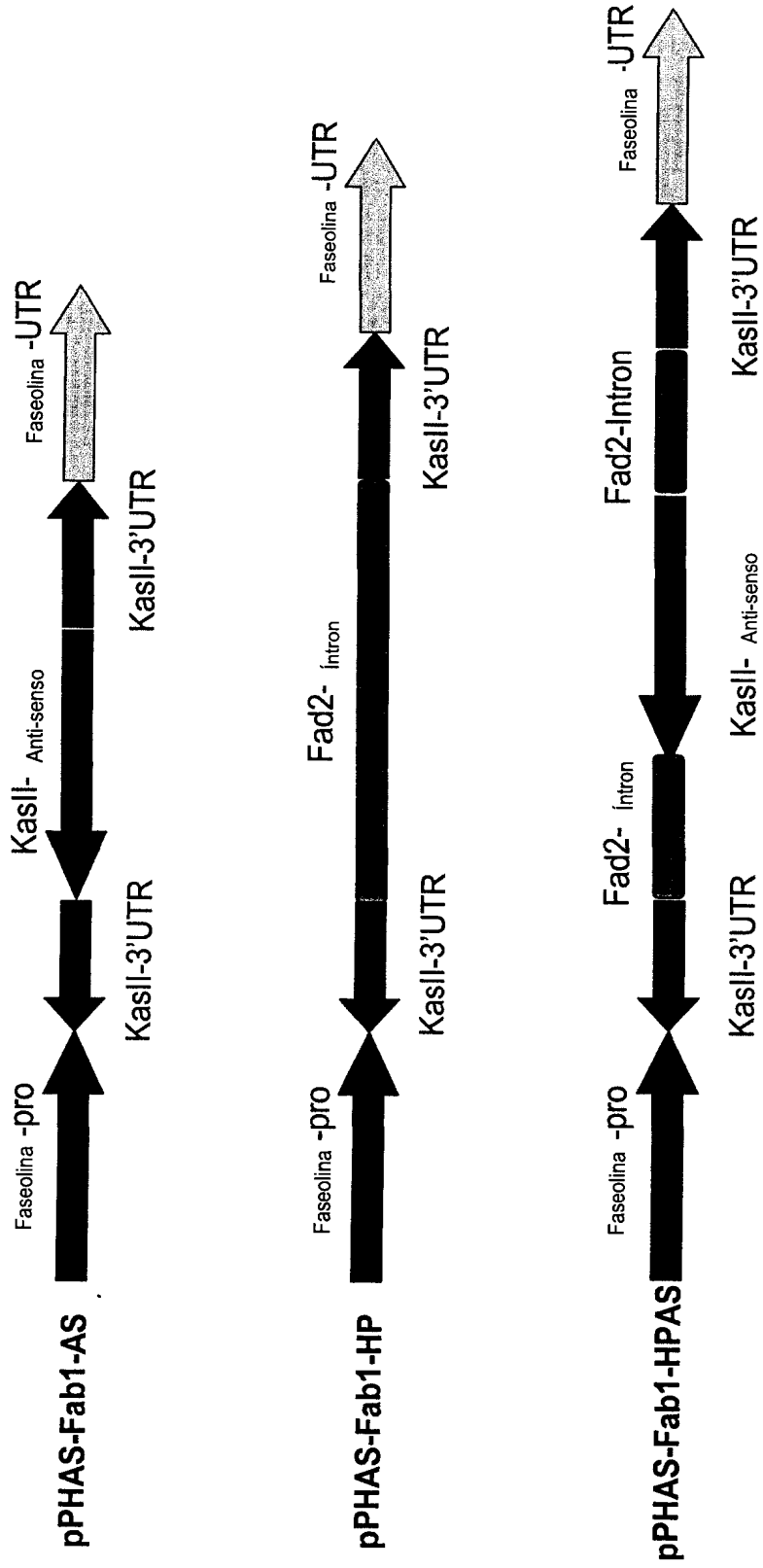


FIG. 1

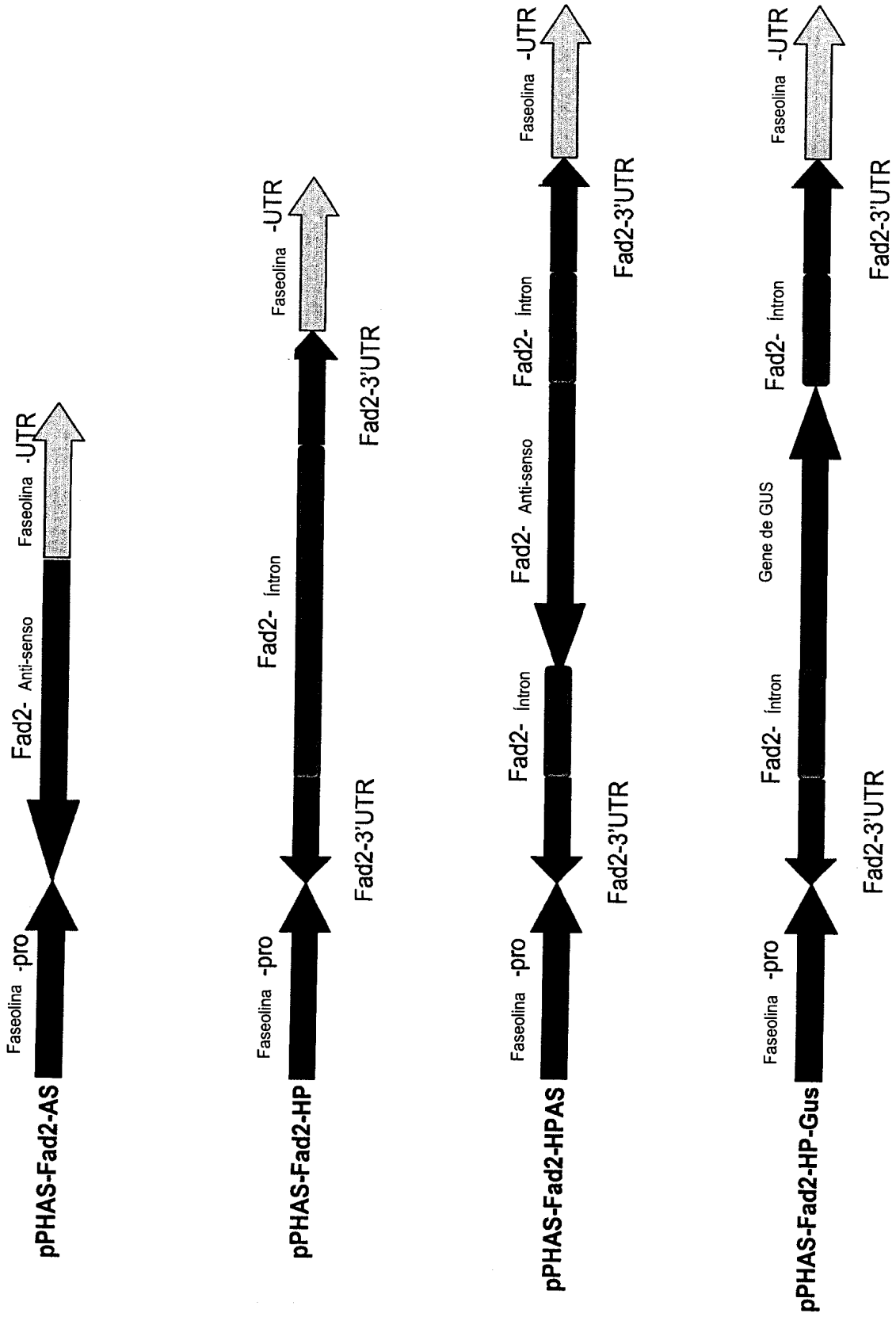


FIG. 2

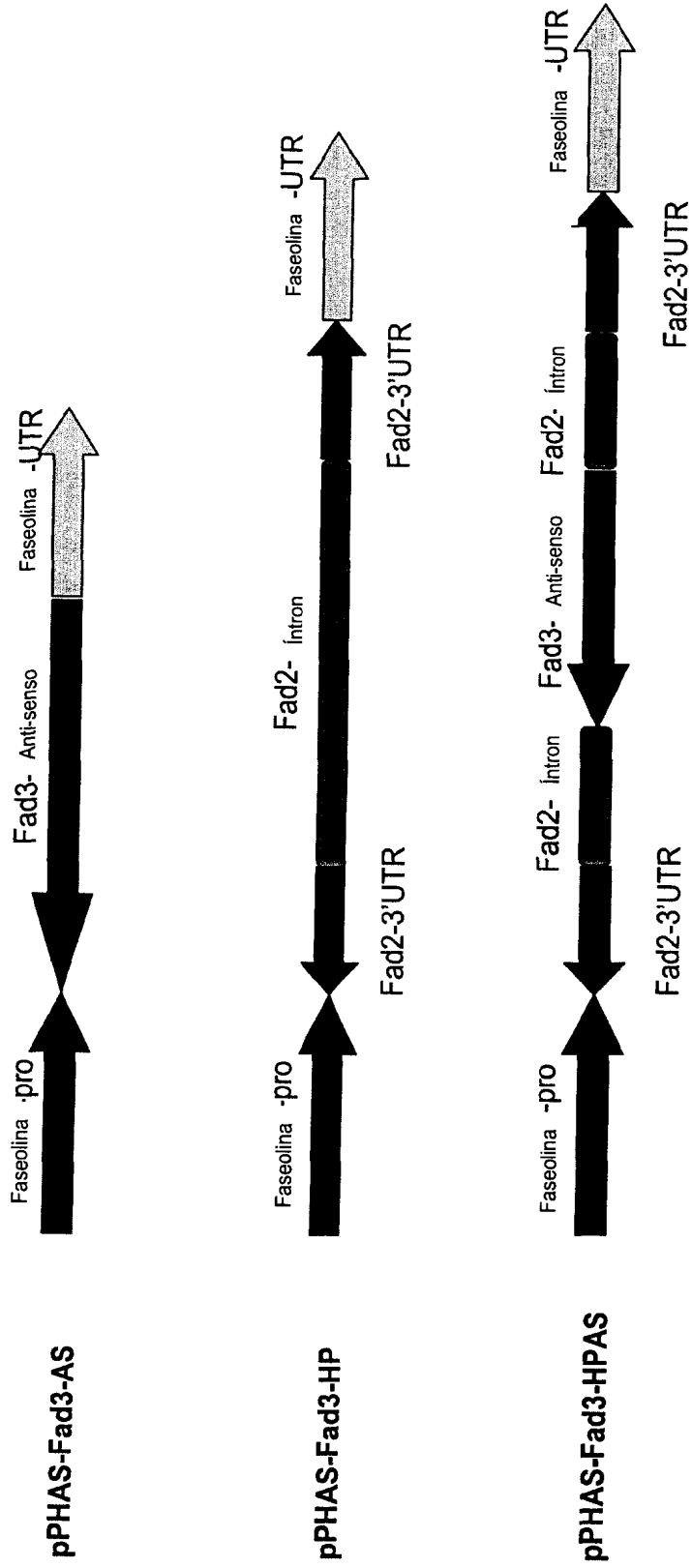


FIG. 3

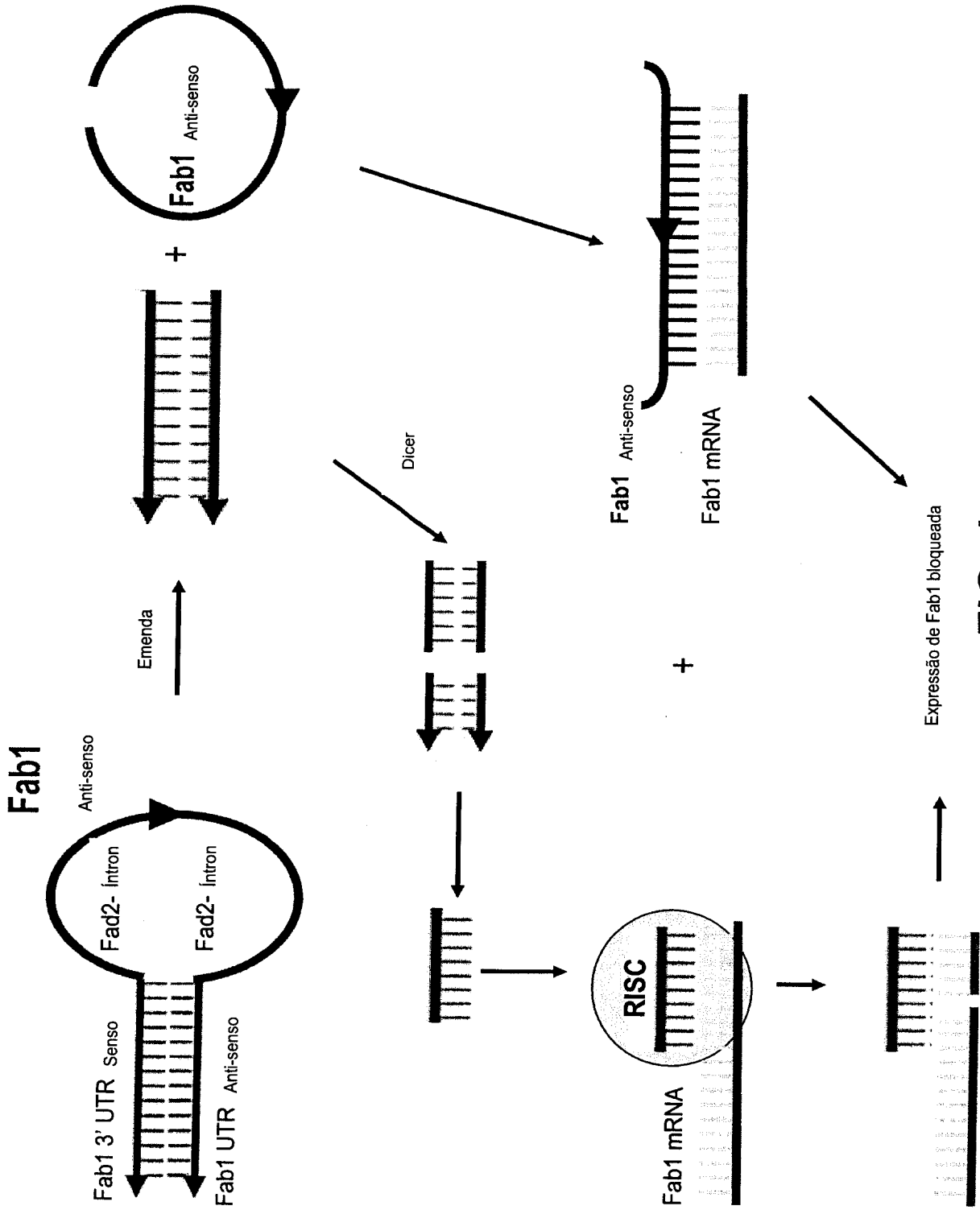


FIG. 4

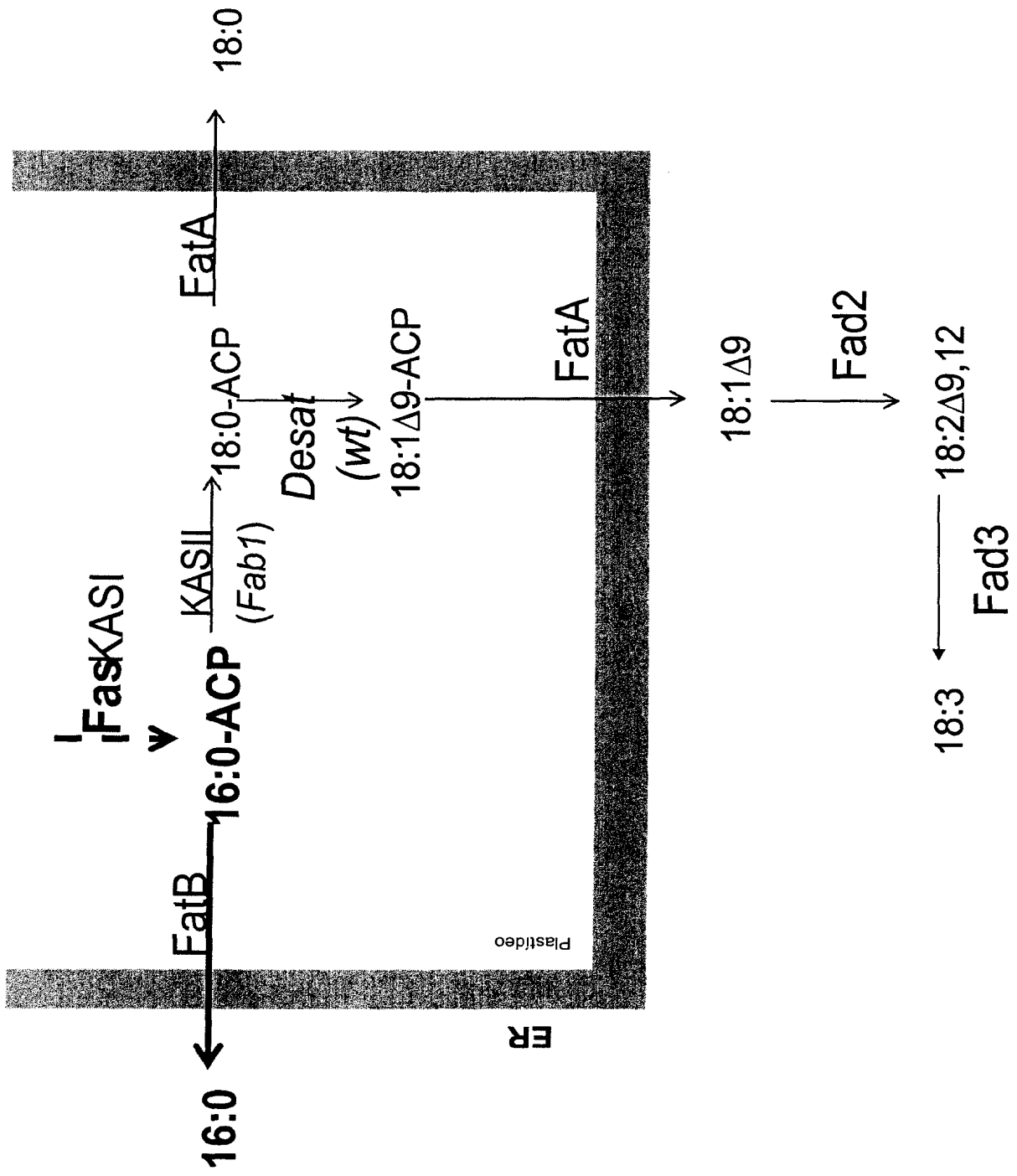


FIG. 5

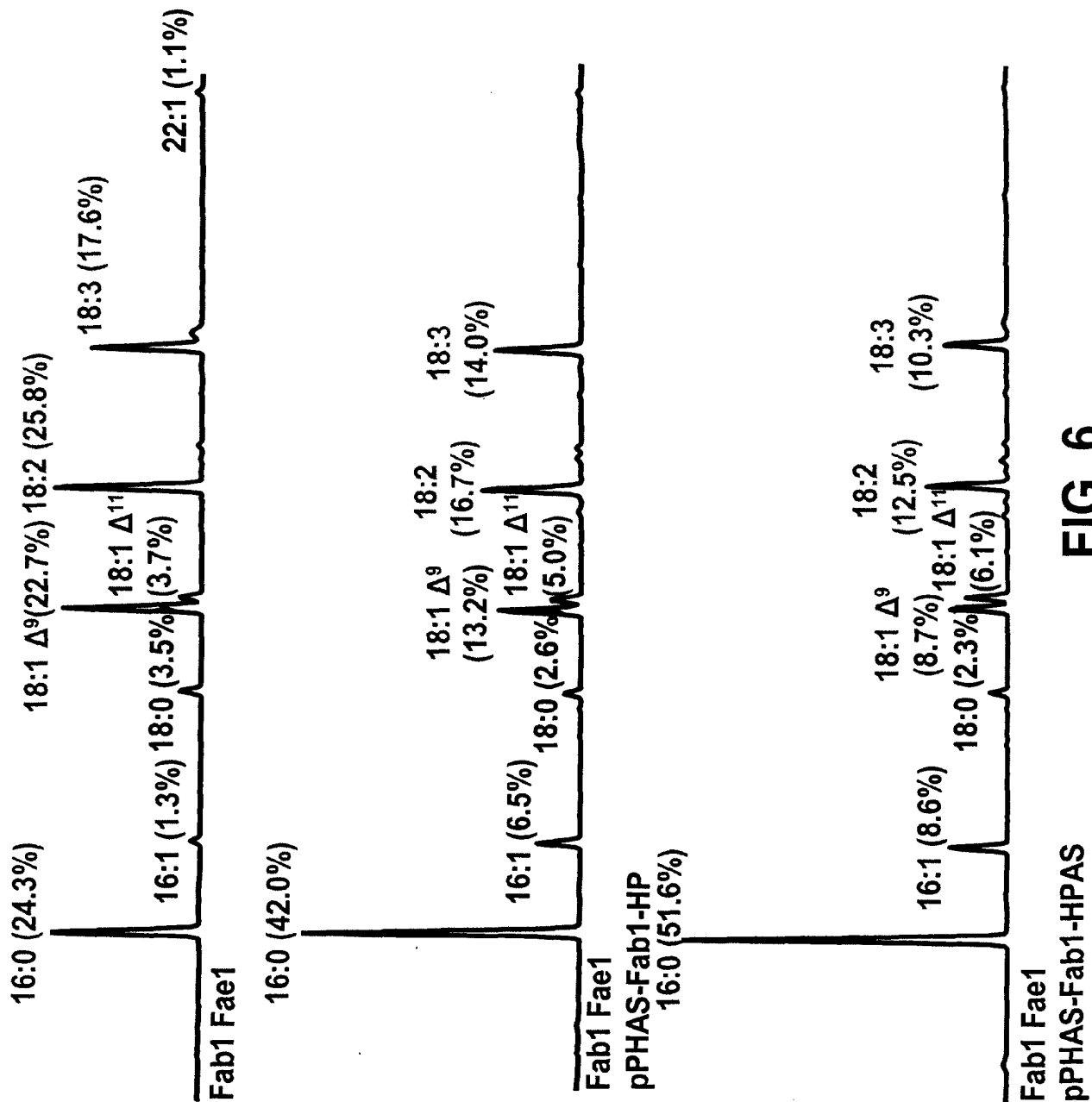


FIG. 6

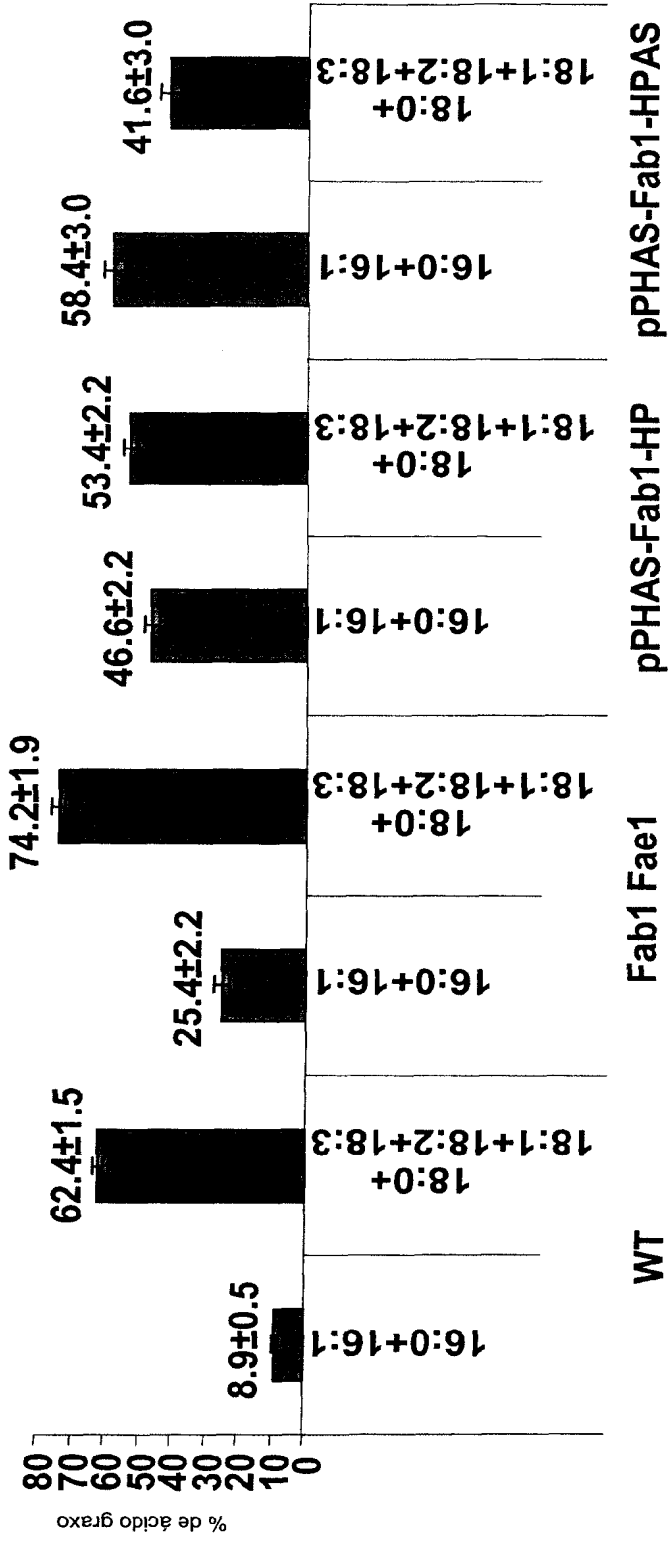


FIG. 7

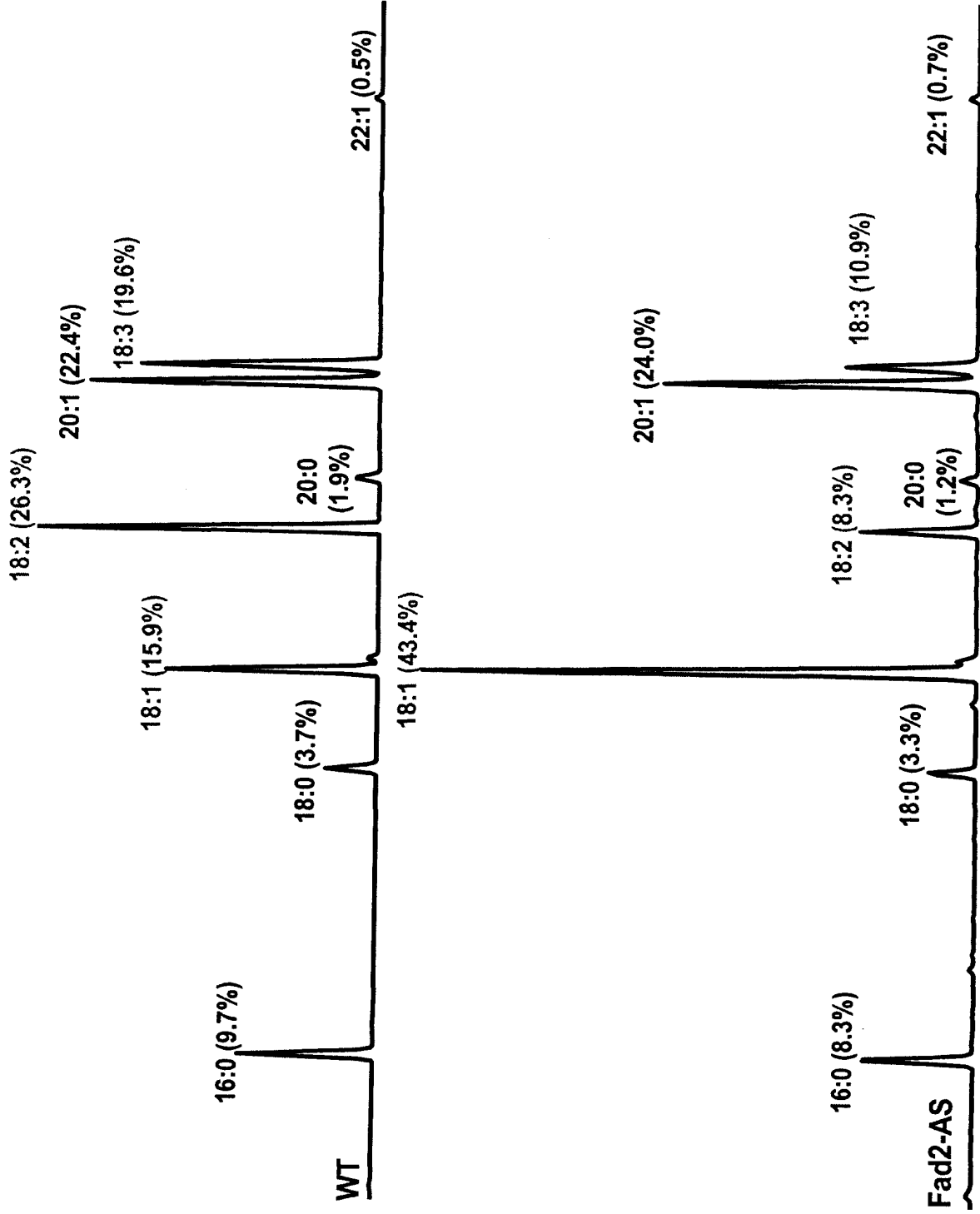


FIG. 8

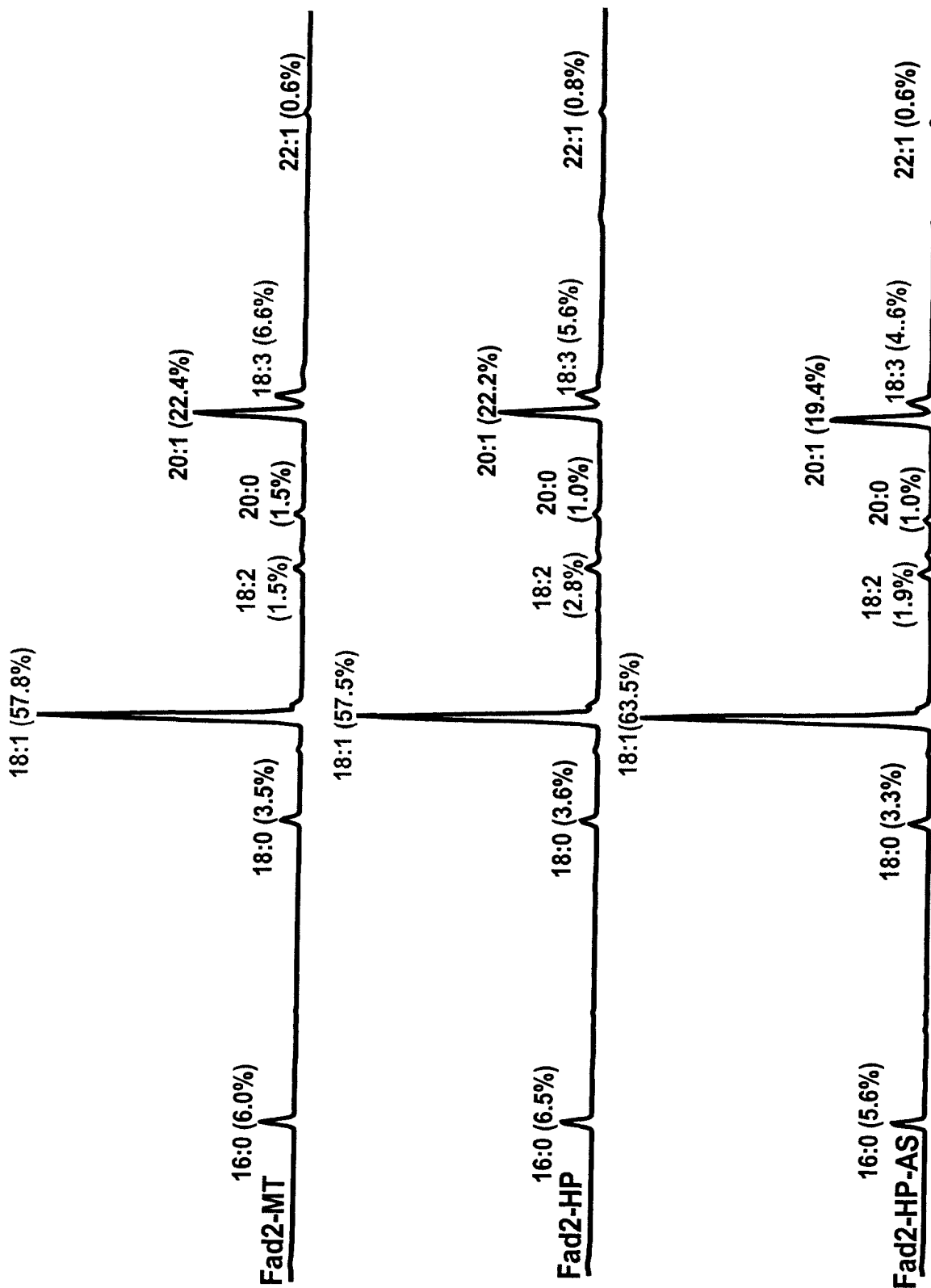


FIG. 9

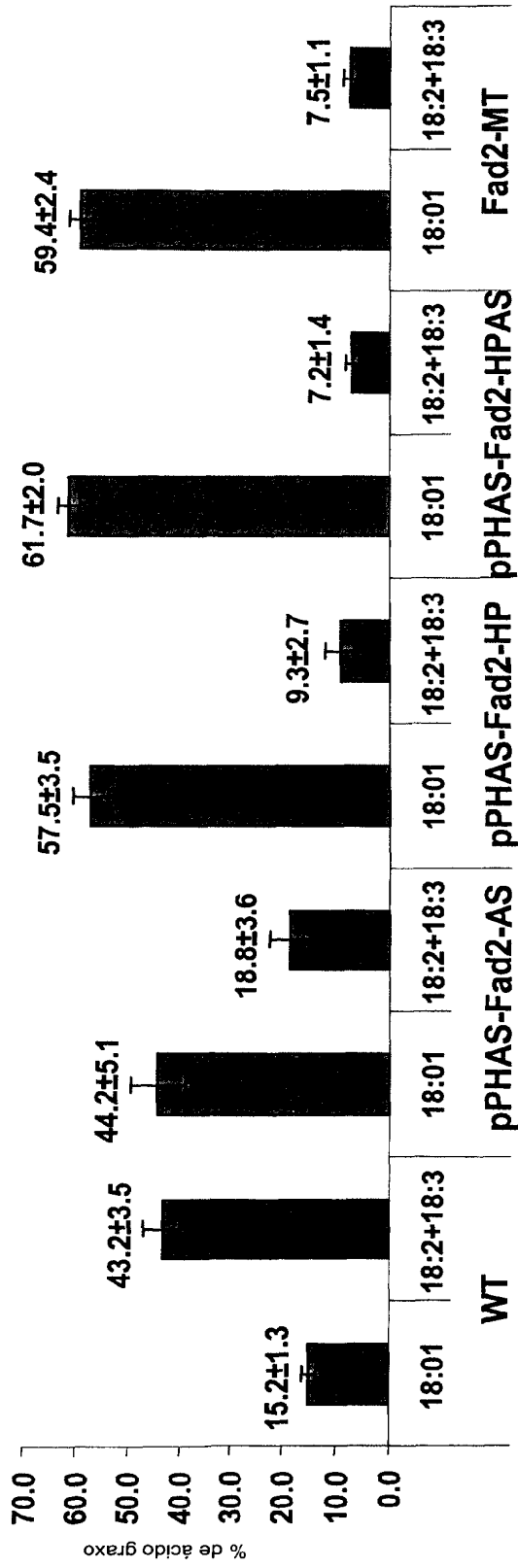


FIG. 10

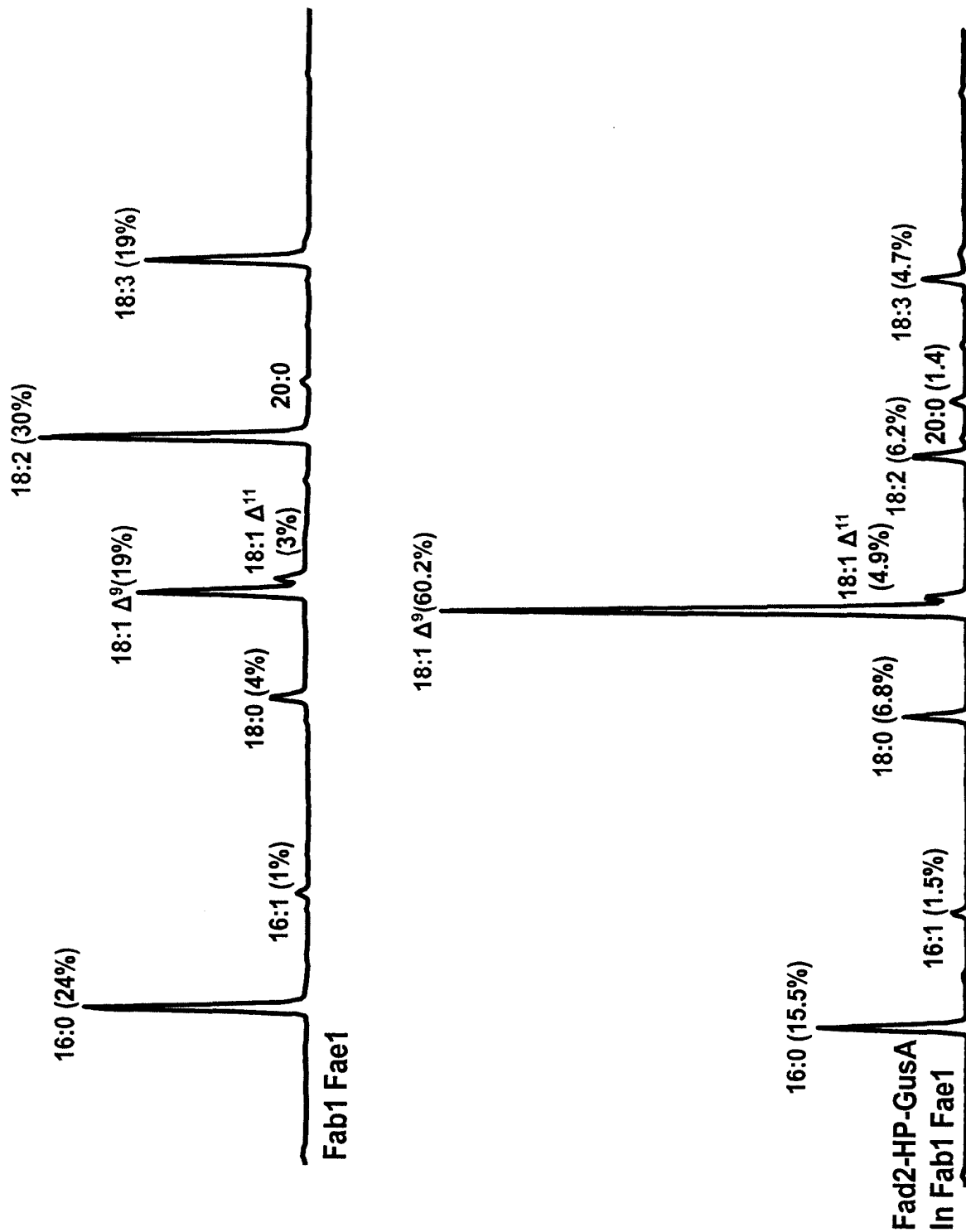


FIG. 11

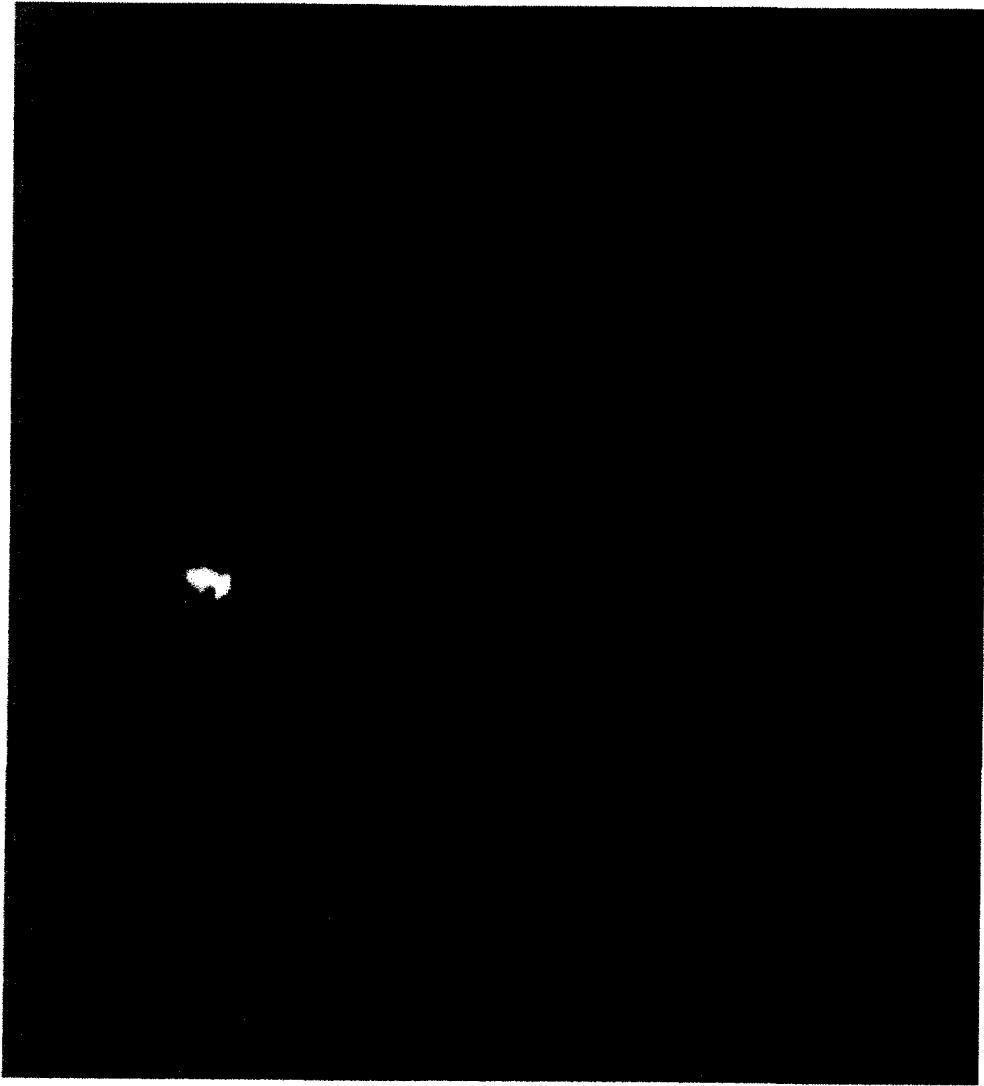


FIG. 12

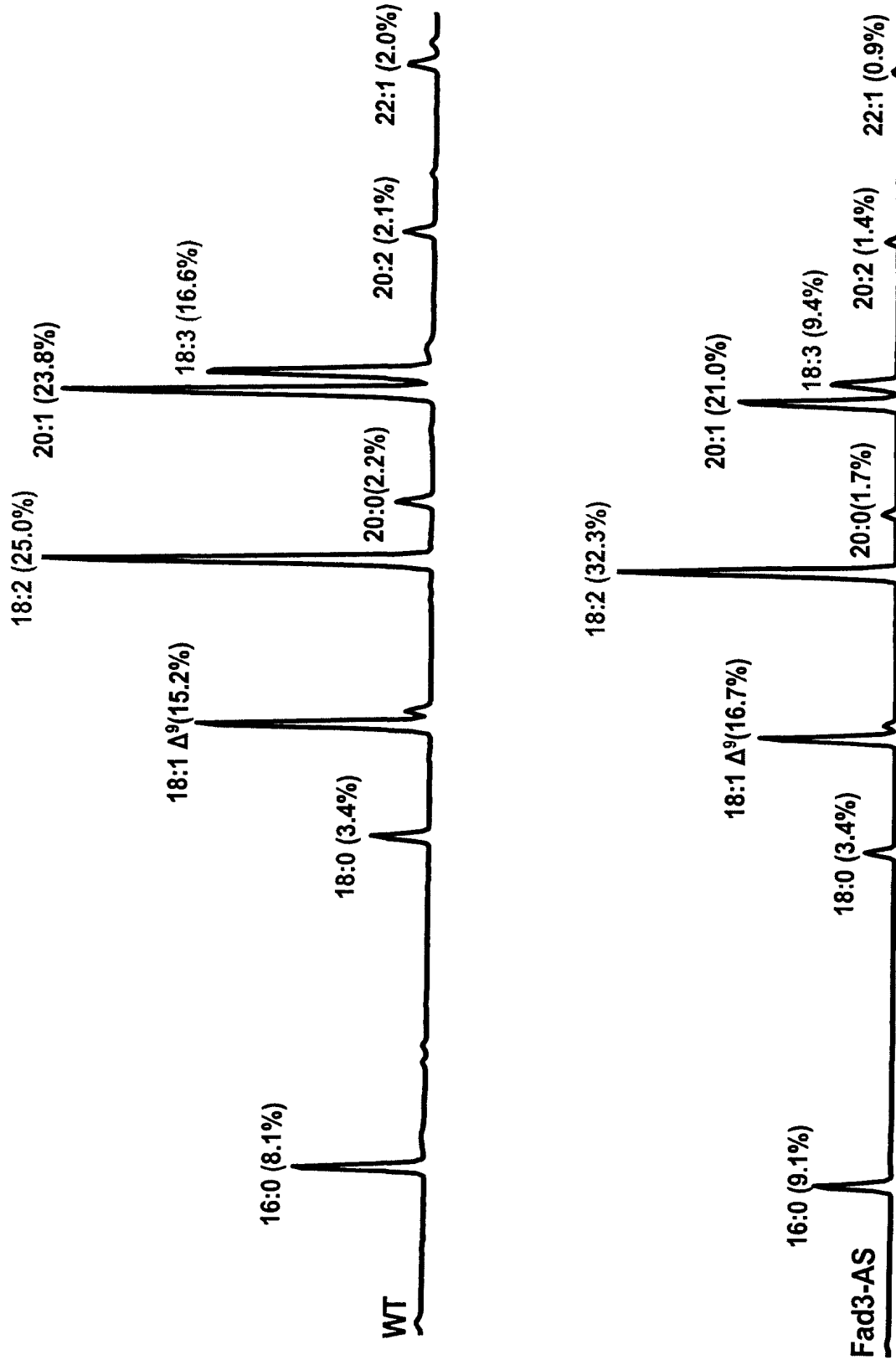


FIG. 13

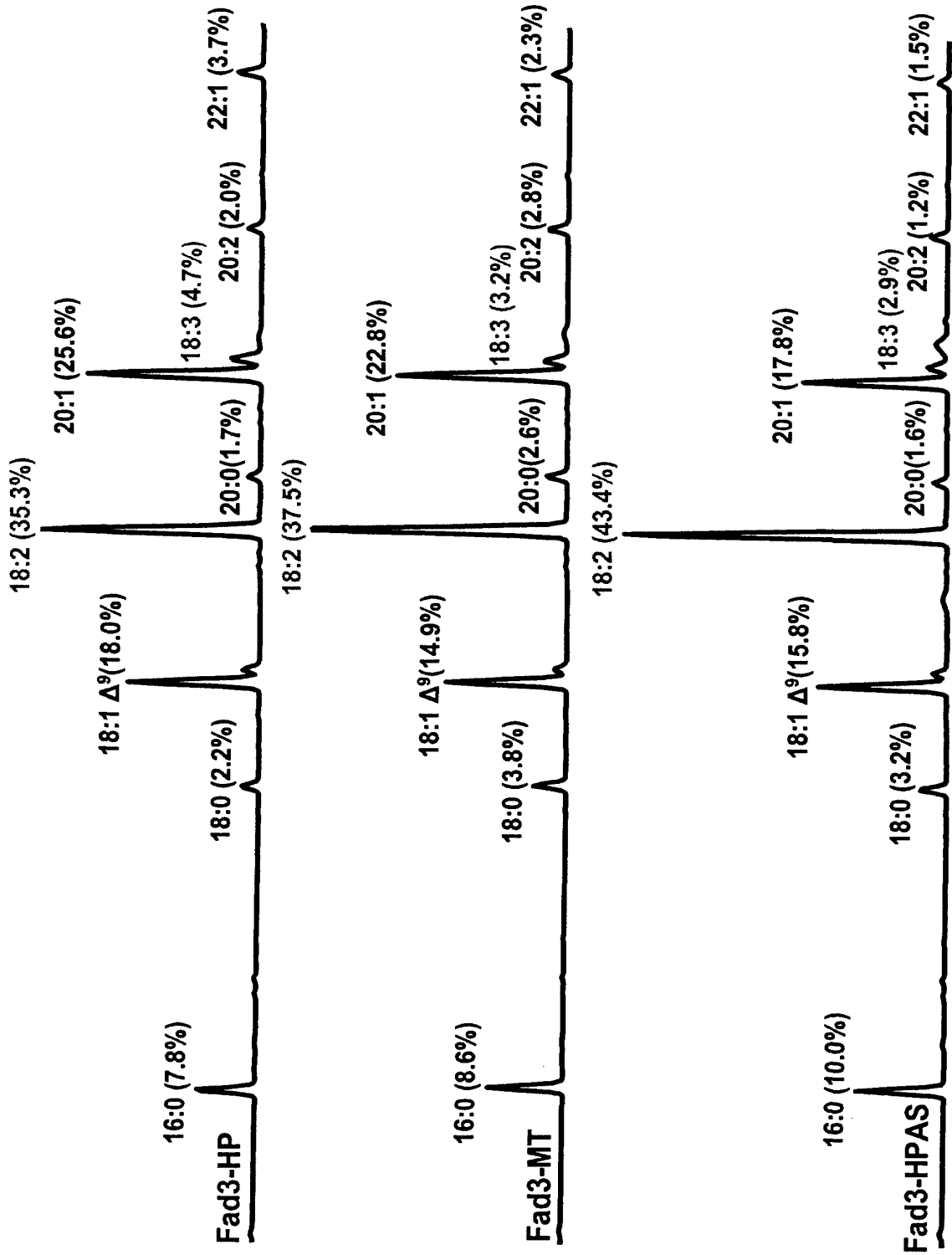


FIG. 14

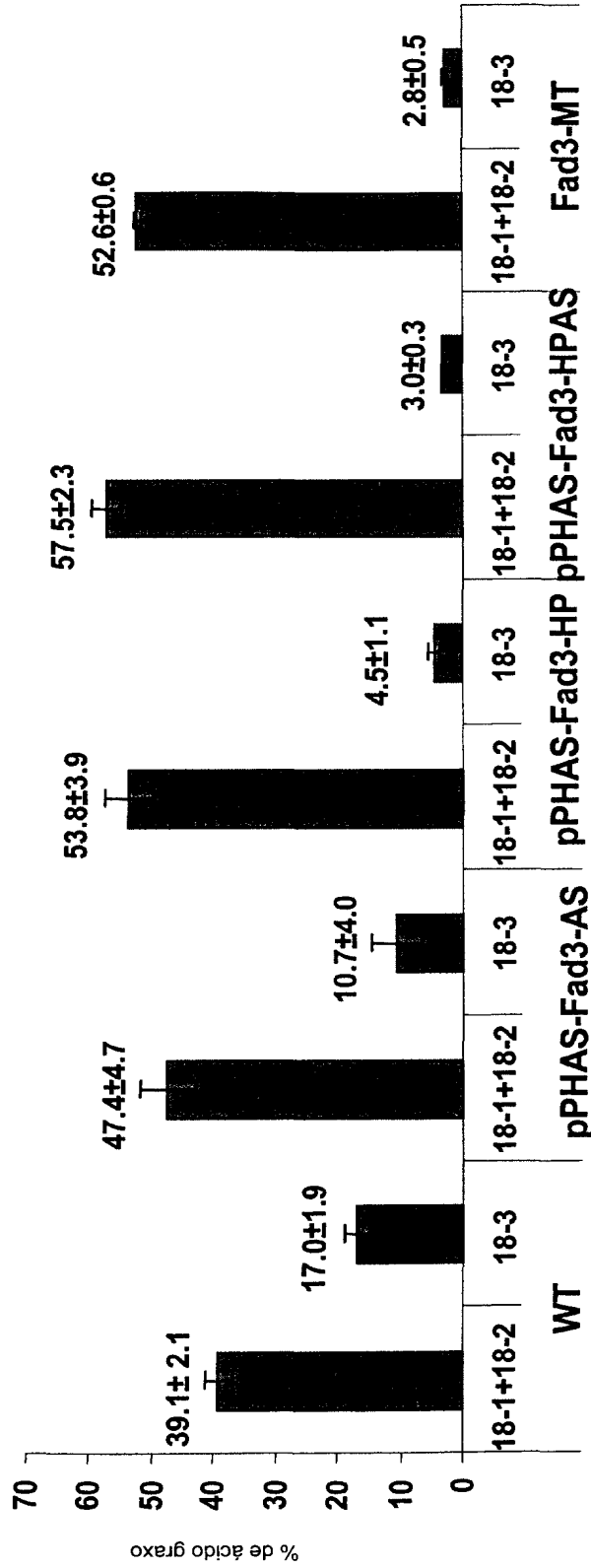


FIG. 15

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÕES COMBINADAS *HAIRPIN*-
ANTISSENSE E MÉTODOS PARA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO"**.

5 É descrito um constructo de nucleotídeos que compreende uma
sequência de nucleotídeos que forma uma haste e uma alça, em que a alça
compreende uma sequência de nucleotídeos que modula a expressão de um
alvo, em que a haste compreende uma sequência de nucleotídeos que mo-
dula a expressão de um alvo, e em que o alvo modulado pela sequência de
nucleotídeos na alça e o alvo modulado pela sequência de nucleotídeos na
10 haste podem ser iguais ou diferentes. Vetores, métodos de regulação de
expressão-alvo, métodos de fornecimento de uma célula, e métodos de tra-
tamento de condições que compreendem a sequência de nucleotídeos tam-
bém são descritos.

Listagem de Sequência

<110> Dow Chemical
 Shanklin, John
 Nguyen, Tam

<120> MÉTODO COMBINADO ANTISENSE-HAIRPIN PARA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO

<130> 2971.01-8076

<160> 18

<170> PatentIn versão 3.3

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

<220> Iniciador
 <223>

<400> 1
 ttaattaacg catcgaagct ctctgcacgc 30

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

<220> Iniciador
 <223>

<400> 2
 gctagcggct ttgagaagaa cccag 25

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

<220> Iniciador
 <223>

<400> 3
 gctagcgtca gctccatctc caggtcc 27

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

<220> Iniciador
 <223>

<400> 4
 gctagcgttt ctgcagaaaa ccaaaaagc 28

<210> 5
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador
 <400> 5
 ctgcagaaac ccgggcatcg aagctctctg cacgc 35

<210> 6
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador
 <400> 6
 gagctcctcg agggctttga gaagaaccca g 31

<210> 7
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador
 <400> 7
 gggagatctg gcgcgccggc tatctctccc accgtga 37

<210> 8
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador
 <400> 8
 gggactagtt cttccttttt atgccatgg 29

<210> 9
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador
 <400> 9
 ggctcgagct agccgcatcg aagctctctg cacgc 35

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

<220>
 <223> Iniciador
 <400> 10
 ggттааттаа ggctttgaga agaaccag 29

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

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 11
 cgcatgcatg ggtgcaggtg gaagaat 27

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

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 12
 ccactagttc ataacttatt gttgtacca 29

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

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 13
 ccctcgagat ggggcaggt ggaagaat 28

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

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 14
 ccttaattaa tcataactta ttgtgtacc a 31

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

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 15
 ggagatctgg cgcgcccgtg gccgagaaca aagatg 36

 <210> 16
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Iniciador

<400> 16
gggactagtg ttgttgctat ggaccaacgc 30

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

<220>
<223> Iniciador

<400> 17
gggtaatta acgtggccga gaacaaagat g 31

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

<220>
<223> Iniciador

<400> 18
ccctcgagag ttgttgctat ggaccaacgc 30