(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 566 561**

(51) Int. CI.:

C07H 21/02 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
A01K 67/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2002 E 02746979 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 1412371**

(54) Título: **Producción in vivo de ARN pequeños de interferencia que median el silenciamiento génico**

(30) Prioridad:

12.07.2001 US 305185 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.04.2016

(73) Titular/es:

UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS (100.0%)
225 Franklin Street, 12th Floor
Boston, MA 02110, US

(72) Inventor/es:

ZAMORE, PHILLIP, D.;
HUTVAGNER, GYORGY;
MCLACHLAN, JUANITA;
MELLO, CRAIG, C. y
GRISHOK, ALLA

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

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

DESCRIPCIÓN

Producción in vivo de ARN pequeños de interferencia que median el silenciamiento génico

Campo técnico

Esta invención se refiere a ácido ribonucleico de interferencia (ARNi), y más particularmente a ARNi *in vivo.*

Antecedentes de la invención

ARNi es el silenciamiento postranscripcional específico de la secuencia de la expresión de un gen por ARN bicatenario. ARNi está mediado por 21 a 25 nucleótidos, las moléculas de ARN bicatenario denominadas como ARN pequeños de interferencia (ARNpi) que se derivan por escisión enzimática de ARN bicatenario largo en las células. Los ARNpi también se pueden sintetizar química o enzimáticamente fuera de las células y luego suministrados a las células (por ejemplo, por transfección) (véase, por ejemplo, Fire y colaboradores, 1998, "Potent and specific genetic interference by double-stranded ARN in Caenorhabditis elegans," Nature, 391: 806-11; Tuschl y colaboradores, 1999, "Targeted ARNm degradation by double-stranded ARN in vitro," Genes Dev., 13: 3191-7; Zamore y colaboradores, 2000, "RNAi: double-stranded ARN directs the ATP-dependent cleavage of ARNm at 21 to 23 nucleotide intervals," Cell, 101: 25-33; Elbashir y colaboradores, 2001, "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate ARN interference in mammalian cell culture," Nature, 411: 494-498; y Elbashir y colaboradores, 2001, "ARN interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs," Genes Dev., 15: 188-200.

Los ARNpi bicatenarios median el silenciamiento génico por manipulación dirigida para la ruptura o escisión de los ARN mensajeros (ARNm) que contienen la secuencia de una cadena del ARNpi. Los ARNpi introducidos en células de mamíferos por transfección que media el silenciamiento génico específico de la secuencia, mientras que el ARN bicatenario largo induce respuestas no específicas de la secuencia.

Pasquinelli y colaboradores, 2000, "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA", Nature, 408: 86-89, describe que los ARN let-7 se detectan en las muestras de diversas especies animales y que se conserva la regulación temporal de let7. Smith y colaboradores, 2000, "Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs", Nature, 407: 319-320, divulga que los constructos génicos que codifican ARN empalmado con un intrón con una estructura de horquilla puede inducir silenciamiento génico postranscripcional cuando son dirigidos contra virus o genes endógenos. Groebe y colaboradores, 1998, "Characterization of RNA hairpin loop stability", Nucleic Acids Research, 16(24): 11725-11735, divulga las estabilidades térmicas de quince horquillas de ARN que comparten la misma secuencia de tallo y tienen bucles de homopolímero de residuos de A, C y U, que varían en longitud de tres a nueve nucleótidos.

Resumen

La invención se basa en el descubrimiento de nuevos precursores artificiales de ARN manipulado genéticamente, que cuando se expresan en una célula, por ejemplo, *in vivo,* son procesados por la célula para producir ARNpi manipulados que silencian selectivamente los genes objetivo (mediante la manipulación de ARNm específicos para escisión) utilizando la propia ruta de ARNi de la célula. Mediante la introducción de moléculas de ácido nucleico que codifican estos precursores de ARN manipulados genéticamente en células *in vivo* con secuencias reguladoras apropiadas (por ejemplo, un transgén en un vector tal como un plásmido), se puede controlar selectivamente la expresión de los precursores de ARN manipulados genéticamente tanto en forma temporal como espacial, es decir, en momentos concretos y/o en tejidos, órganos o células particulares.

La presente invención se define en y mediante las reivindicaciones adjuntas. En general, la invención presenta una molécula aislada de ácido nucleico que incluye una secuencia reguladora enlazada operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un precursor de ácido ribonucleico (ARN) manipulado genéticamente, en donde el precursor incluye: (i) una primera porción de tallo que comprende una secuencia de 18 a 30 nucleótidos que es complementaria a una secuencia de un ARN mensajero (ARNm) de un gen objetivo; (ii) una segunda porción de tallo que comprende una secuencia de 18 a 30 nucleótidos que es suficientemente complementaria a la primera porción de tallo para hibridar con la primera porción de tallo para formar un tallo dúplex (por ejemplo, un tallo que puede ser procesado por la enzima Dicer); y (iii) una porción de bucle de 4 a 20 nucleótidos que conecta las dos porciones de tallo. En otro aspecto, la invención presenta el propio ARN manipulado genéticamente. El precursor de ARN manipula en forma dirigida una porción del ARNm del gen objetivo, interrumpe la traducción del ARNm mediante la escisión del ARNm, e impide por lo tanto la expresión de la proteína que va a ser inhibida. Los genes objetivo puede ser, por ejemplo, genes humanos, por ejemplo, genes humanos mutantes, por ejemplo, que tienen una mutación puntual, o pueden ser genes virales o de otro tipo.

En estas moléculas y precursores, la primera porción de tallo es totalmente complementaria (es decir, completamente complementaria) a la secuencia de ARNm. La segunda porción de tallo puede ser completamente o sustancialmente

complementaria a la primera porción de tallo. La primera porción de tallo puede estar situada en un extremo 5' o 3' del precursor de ARN.

En estos precursores, la porción de bucle puede incluir al menos 4, 7, u 11, o más nucleótidos, y la secuencia del ARNm se localiza a partir de 100 a 300 nucleótidos en dirección 3' del inicio de la traducción del ARNm. La secuencia del ARNm puede localizarse en una región no traducida en dirección 5' (UTR) o una UTR en dirección 3' del ARNm. Las primera y segunda porciones de tallo incluyen cada una 18 a 30 nucleótidos, por ejemplo aproximadamente 22 hasta aproximadamente 28 nucleótidos. La primera y segunda porciones de tallo pueden tener cada una el mismo número de nucleótidos, o una de las primera y segunda porciones de tallo puede tener de 1 a 4 nucleótidos más que la otra porción de tallo. Estos nucleótidos que sobresalen pueden ser todos uracilos.

En estas moléculas de ácido nucleico, la secuencia reguladora puede ser un promotor Pol III o Pol II, y puede ser constitutivo o inducible. En realizaciones específicas, el precursor de ARN manipulado genéticamente puede tener la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 8, o 9, y la molécula de ácido nucleico puede tener la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 10, 11, 17, 18, 20, o 21, o un complemento de la misma.

En otras realizaciones, la invención utiliza vectores, por ejemplo, vectores plásmidos o virales (por ejemplo, retrovirales), que incluyen las moléculas de ácidos nucleicos. En otro aspecto, la invención utiliza células huésped, por ejemplo, células de mamífero, que contienen moléculas de ácido nucleico. La invención también utiliza transgenes que incluyen las moléculas de ácido nucleico.

En otro aspecto de la invención, la invención utiliza animales transgénicos no humanos, una o más de cuyas células incluyen un transgén que contiene una o más de las moléculas de ácido nucleico, en donde el transgén se expresa en una o más células del animal transgénico dando como resultado que el animal exhiba ácido ribonucleico de interferencia (ARNi) del gen objetivo mediante el precursor de ARN manipulado genéticamente. Por ejemplo, el transgén puede ser expresado de forma selectiva en una o más células cardíacas, linfocitos, células hepáticas, células endoteliales vasculares, o células de bazo. En estos animales, la secuencia reguladora puede ser constitutiva o inducible, o la secuencia reguladora puede ser específica del tejido. En algunas realizaciones, la secuencia reguladora puede ser un promotor Pol III o Pol II, y puede ser una secuencia exógena. Estos animales transgénicos pueden ser primates no humanos o roedores, tales como ratones o ratas, u otros animales (por ejemplo, otros mamíferos, tales como cabras o vacas; o aves) descritos aquí.

La invención también puede utilizar células derivadas de los nuevos animales transgénicos. Por ejemplo, estas células pueden ser un linfocito, una célula hematopoyética, una célula hepática, una célula cardíaca, una célula endotelial vascular, o una célula de bazo.

En otro aspecto, la invención incluye métodos de inducción de ácido ribonucleico de interferencia (ARNi) de un gen objetivo en una célula, por ejemplo, en un animal o en cultivo. Los nuevos métodos incluyen la obtención de un animal transgénico que comprende una transgén que incluye una molécula de ácido nucleico que codifica un precursor de ARN manipulado genéticamente y un promotor inducible; y la inducción de la célula para expresar el precursor para formar un ácido ribonucleico pequeño de interferencia (ARNpi) dentro de la célula, induciendo de ese modo ARNi del gen objetivo en el animal.

Alternativamente, los métodos incluyen la obtención de una célula huésped; cultivar la célula; y permitir que la célula exprese el precursor de ARN para formar un ácido ribonucleico pequeño de interferencia (ARNpi) dentro de la célula, induciendo de ese modo ARNi del gen objetivo en la célula.

Un "transgén" es cualquier molécula de ácido nucleico, que se inserta por artificio en una célula, y se convierte en parte del genoma del organismo que se desarrolla a partir de la célula. Tal transgén puede incluir un gen que es parcial o totalmente heterólogo (es decir, extraño) para el organismo transgénico, o puede representar un gen homólogo para un gen endógeno del organismo. El término "transgén" también significa una molécula de ácido nucleico que incluye una o más secuencias seleccionadas de ácido nucleico, por ejemplo, ADN, que codifican uno o más precursores de ARN modificados genéticamente, que se expresa en un organismo transgénico, por ejemplo, animal, que es parcial o completamente heterólogo, es decir, extraño, para el animal transgénico, u homólogo a un gen endógeno del animal transgénico, pero que está diseñado para ser insertado en el genoma del animal en una ubicación que difiere de aquella del gen natural. Un transgén incluye uno o más promotores y cualquier otro ADN, tal como intrones, necesarios para la expresión de la secuencia seleccionada de ácido nucleico, todos operativamente enlazados a la secuencia seleccionada, y puede incluir una secuencia potenciadora.

Una "célula transformada" es una célula en la que (o en un antepasado de la cual) se ha introducido, por medio de técnicas de ADN recombinante, una molécula de ácido nucleico o un transgén que codifica un precursor de ARN manipulado genéticamente.

Tal como se utiliza aquí, el término "operativamente enlazado" significa que una secuencia seleccionada de ácido

nucleico, por ejemplo, que codifica un precursor de ARN manipulado genéticamente, se encuentra próximo a un promotor, por ejemplo, un promotor específico de tejido, para permitir que el promotor regule la expresión de la secuencia seleccionada de ácido nucleico. Además, el promotor está situado secuencia arriba de la secuencia seleccionada de ácido nucleico en términos de la dirección de la transcripción y la traducción.

Por "promotor" se entiende una secuencia de ácido nucleico que es suficiente para dirigir la transcripción. Un promotor específico de tejido afecta la expresión de la secuencia seleccionada de ácido nucleico en células específicas, por ejemplo, células hematopoyéticas, o células de un tejido específico dentro de un animal, por ejemplo, endotelio cardíaco, muscular o vascular. El término también abarca a los llamados promotores "defectuosos", que regulan la expresión de una secuencia seleccionada de ácido nucleico principalmente en un tejido, pero provocan también la expresión en otros tejidos. Tales promotores pueden incluir también secuencias adicionales de ADN que son necesarias para la expresión, tales como intrones y secuencias potenciadoras.

Por "transgénico" se entiende cualquier célula que incluye un ácido nucleico, por ejemplo, secuencia de ADN, que se inserta por artificio en una célula y se convierte en parte del genoma de un organismo que se desarrolla a partir de esa célula. Un "animal transgénico" significa un animal que incluye un transgén que se inserta en una célula embrionaria y se convierte en una parte del genoma del animal que se desarrolla a partir de esa célula, o un descendiente de tal animal. En los animales transgénicos descritos en este documento, el transgén hace que las células de tejidos específicos expresen un precursor de ARN manipulado genéticamente. Cualquier animal no humano que pueda ser producido por tecnología transgénica se puede utilizar en la invención, aunque se prefieren los mamíferos. Los mamíferos preferidos incluyen primates no humanos, ovejas, cabras, caballos, vacas, cerdos, conejos y roedores tales como cobayas, hámsteres, ratas, jerbos, y, preferiblemente, ratones.

Una "molécula o secuencia aislada de ácido nucleico" es una molécula o secuencia de ácido nucleico que no es inmediatamente contigua a ambas secuencias codificantes con las que está inmediatamente contigua (una en el extremo 5' y una en el extremo 3') en el genoma natural del organismo del que se deriva. El término incluye por lo tanto, por ejemplo, un ADN o ARN recombinante que se incorpora en un vector; en un plásmido o virus de replicación autónoma; o en el ADN genómico de un procariota o eucariota, o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido por PCR o tratamiento con endonucleasas de restricción) independiente de otras secuencias. Esto también incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica una secuencia adicional de polipéptido.

Un "gen objetivo" es un gen cuya expresión es inhibida o "silenciada" selectivamente. Este silenciamiento se logra mediante escisión del ARNm del gen objetivo por un ARNpi que se crea a partir de un precursor de ARN manipulado genéticamente por un sistema de ARNpi de la célula. Una porción o segmento de un tallo dúplex del precursor de ARN es una hebra antisentido que es complementaria, por ejemplo, totalmente complementaria, a una sección de aproximadamente 18 hasta aproximadamente 40 o más nucleótidos del ARNm del gen objetivo.

El término "manipulado genéticamente", como en un precursor de ARN manipulado genéticamente, o una molécula de ácido nucleico manipulada genéticamente, indica que el precursor o la molécula no se encuentran en la naturaleza, ya que toda o una porción de la secuencia de ácido nucleico del precursor o molécula es creada o seleccionada por el hombre. Una vez creada o seleccionada, la secuencia puede ser replicada, traducida, transcrita, o bien procesada por mecanismos dentro de una célula. Por lo tanto, un precursor de ARN producido dentro de una célula de un transgén que incluye una molécula de ácido nucleico manipulada genéticamente, es un precursor de ARN manipulado genéticamente.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por una persona ordinariamente capacitada en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento en la práctica o comprobación de la presente invención, a continuación se describen los métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, se hará control mediante la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

La invención proporciona varias ventajas. Por ejemplo, la invención mejora y supera una deficiencia significativa en la técnica anterior. Los métodos anteriores para inducir ARNi en células de mamífero que utilizan ARNpi estaban restringidos a los cultivos de células. Los nuevos métodos extienden el ARNi a animales enteros, por ejemplo, mamíferos, y por lo tanto permiten que el ARNi sea destinado a tipos de células, órganos o tejidos específicos, y/o a etapas de desarrollo específicas.

Además, esta tecnología simplifica y reduce el coste de la construcción de ARNpi, ya que las moléculas de ADN son relativamente económicas de producir. Por lo tanto, se pueden preparar grandes poblaciones de plásmidos u otros vectores, conteniendo cada uno una molécula de ácido nucleico que codifica un precursor de ARN manipulado genéticamente que dirige a un gen particular, que se puede preparar fácilmente, por ejemplo, en un formato de matriz. Además, se pueden introducir las nuevas moléculas de ácido nucleico en una variedad de células, que pueden ser cultivadas *in vitro* usando técnicas conocidas. Además, los nuevos métodos permiten una reducción a largo plazo, por ejemplo, permanente, de la expresión génica manipulada en líneas celulares, ya que los ARNpi son transitorios, pero

una horquilla transgénica proporciona un suministro de larga duración de los ARNpi.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción que viene a continuación. Otras características, objetivos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y dibujos, y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático de la naturaleza dual de las rutas de ARNpt y ARNpi.

La Figura 2A es una representación esquemática de un precursor ARNpt de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1).

Las Figuras 2B a 2E son representaciones esquemáticas de precursores de ARN sintéticos manipulados genéticamente (SEQ ID NOs: 2, 3, 4, y 5).

La Figura 3 es una autorradiografía que muestra los resultados de un ensayo para determinar si un precursor de ARN manipulado genéticamente puede promover la escisión del ARNm objetivo *in vitro* en una reacción estándar de ARNi.

Las Figuras 4A a 4C son representaciones esquemáticas de ARNpi de luciferasa sintética (4A; SEQ ID NOs: 6 y 7), y precursores de ARN manipulados genéticamente 5' y 3' sintéticos (4B; SEQ ID NO: 8, y 4C; SEQ ID NO: 9).

La Figura 4D es una representación esquemática de un ARNm objetivo quimérico para una reacción *in vitro* de ARNi de luciferasa/*let-7*. Los sitios de escisión objetivo dirigida de ARNpi se indican por "tijeras".

La Figura 4E es una autorradiografía que muestra los resultados de un ensayo para determinar si los precursores de ARN manipulados genéticamente 5' y 3' sintéticos de las Figuras 4B y 4C pueden promover la escisión del ARNm objetivo *in vitro* en una reacción estándar de ARNi.

La Figura 5 es un diagrama esquemático de un transgén que codifica un precursor de ARN manipulado genéticamente (SEQ ID NO: 2) y la transcripción y el procesamiento del precursor para formar un ARNpi bicatenario (SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 12).

Descripción detallada

Los ARN pequeños temporales (ARNpt), también conocidos como microARN (miARN), tales como *lin-4* y *let-7* en *Caenorhabditis elegans* y *let-7* en *Drosophila melanogaster* y los seres humanos que no codifican proteína, sino que parecen bloquear la traducción productiva de ARNm mediante secuencias de enlazamiento en la región no traducida (3' UTR) de sus ARNm objetivo. Como se describe en Hutvágner y colaboradores, Science, 293: 834 (12 de julio, 2001), se ha demostrado que ARN *let-7* en *Drosophila* escindido a partir de transcripto precursor mayor, que es similar a la generación de ARN pequeños a partir de un ARN bicatenario precursor estructurado mayor en la ruta del ARN de interferencia (ARNi).

Al igual que ARNpi, ARNpt también son de 21-25 nucleótidos de longitud, pero a diferencia de los ARNpi, son monocatenarios y no median el silenciamiento génico a través de la escisión de ARNm objetivo. Como se muestra en la figura 1, las rutas de ARNi y ARNpt se cruzan; ambas requieren la enzima Dicer de procesamiento del ARN para producir los componentes activos de ARN pequeño que reprimen la expresión génica. Las proteínas Dicer y quizás otras proteínas actúan sobre pre-ARNpt para producir ARNpt monocatenarios maduros, que reprimen la traducción del ARNm. En ARNi, Dicer escinde ARN bicatenario largo, para producir dúplex de ARNpi que median la destrucción dirigida de ARNm.

Mientras que los ARN bicatenarios largos son escindidos de forma simétrica por Dicer para generar los ARNpi dúplex, evidencia actual sugiere que los ARNpt son escindidos de forma asimétrica para generar únicamente un ARNpt monocatenario. Los precursores de ARNpt son los ARN de bucle y tallo que no median la escisión objetivo o provocan las respuestas de secuencia no específicas inducida por, ARN bicatenario largo. Por otro lado, la invención proporciona nuevos precursores de ARN modificados genéticamente que cuando son procesados dentro de una célula generan los ARNpi que median la escisión objetivo. Estos ARNpi pueden ser bicatenarios o monocatenarios, siempre que medien la escisión del ARNm objetivo. Tales precursores de ARN manipulados genéticamente pueden expresarse en mamíferos transgénicos en una forma específica del tipo de célula o específica de la etapa de desarrollo para inducir ARNi en una célula o células específicas en un tiempo definido.

Un lisado de embrión de *Drosophila* que media ARNi *in vitro* (Tuschl y colaboradores, (1999) citado anteriormente*),* cuyo proceso de ARN bicatenario en ARNpi (Zamore y colaboradores, (2000) citado anteriormente*),* y pre-*let-7*-ARNpt en ARNpt *let-7* maduro (Hutvágner y colaboradores, (2001, citado anteriormente*),* se puede utilizar para analizar la

capacidad de un precursor de ARN manipulado genéticamente para mediar ARNi *in vitro.* Este ensayo permite analizar los nuevos precursores de ARN manipulados genéticamente. Los nuevos precursores manipulados genéticamente difieren de los precursores de ARNpt de tipo silvestre, de origen natural, por diversas modificaciones y por el hecho de que una porción de su tallo dúplex comprende una secuencia de ácido nucleico que es totalmente complementaria a una porción del ARNm de un gen objetivo.

Precursores de ARN manipulados genéticamente que generan los ARNpi

Los precursores ARNpt (pre-ARNpt) de origen natural tienen ciertos elementos o componentes que se ilustran en La Figura 2A, que muestra un precursor de ARNpt para *let-7* (pre-*let-7).* Cada precursor es una sola hebra que forma un tallo dúplex que incluye dos porciones que son generalmente complementarias, y un bucle, que conecta las dos porciones de tallo. En pre-ARNpt típicos, el tallo incluye una o más protuberancias, por ejemplo, nucleótidos adicionales que crean un único "bucle" de nucleótidos en una porción de tallo, y/o uno o más nucleótidos no apareados que crean un vacío en la hibridación de las dos porciones de tallo entre sí.

Los precursores de ARN manipulados genéticamente de la invención y usados en la invención son constructos artificiales que son similares a los pre-ARNpt de origen natural, pero difieren de las secuencias de precursores de tipo silvestre de varias maneras. La diferencia clave es que una porción de tallo dúplex es una secuencia de ácido nucleico que es complementaria (o antisentido) al ARNm objetivo. Por lo tanto, los precursores de ARN manipulados genéticamente incluyen un tallo dúplex con dos porciones y un bucle que conectan las dos porciones de tallo. Las dos porciones de tallo son de 18 o 19 a 25 o 30, nucleótidos de longitud. Cuando se utilizan en células de mamífero, la longitud de las porciones de tallo debe ser aproximadamente menor de 30 nucleótidos para evitar provocar respuestas no específicas como la ruta del interferón. Las dos porciones de tallo dúplex deben ser suficientemente complementarias para hibridar para formar el tallo dúplex. Por lo tanto, las dos porciones pueden ser, pero no tienen por qué ser, totalmente o perfectamente complementarias. Además, las dos porciones de tallo pueden ser de la misma longitud, o una porción puede incluir una saliente de 1, 2, 3, o 4 nucleótidos. Los nucleótidos que sobresalen pueden incluir, por ejemplo, uracilos (U), por ejemplo, todos los U.

Otras diferencias de secuencias de pre-ARNpt naturales pueden incluir, pero no están limitadas a, suprimir nucleótidos no apareados o abombados, la introducción de nucleótidos de bases apareadas adicionales a una o ambas porciones de tallo, la modificación de la secuencia del bucle para aumentar o disminuir el número de nucleótidos apareados, o la sustitución de todo o parte de la secuencia del bucle con un bucle cuádruple u otras secuencias de bucle. Por lo tanto, el bucle en los precursores de ARN manipulados genéticamente puede ser de 4, 5, 6, 7, 8, 9, o más, por ejemplo, 15 o 20, nucleótidos de longitud. Las secuencias del bucle cuádruple pueden incluir, pero no se limitan a, las secuencias GNRA (SEQ ID NO: 13), donde N es cualquier nucleótido y R es un nucleótido de purina, GGGG (SEQ ID NO: 14), y UUUU (SEQ ID NO: 15).

Cuatro ejemplos de tales precursores de ARN manipulados genéticamente se ilustran en las Figuras 2B a 2E. Las Figuras 2B y 2C ilustran precursores manipulados genéticamente en los que las porciones de tallo han tenido todos los nucleótidos no apareados y sobresalientes removidos o apareados, pero el bucle es el mismo que el bucle de tipo silvestre en el pre-ARNpt. Las Figuras 2D y 2E ilustran dos precursores de ARN manipulados genéticamente con un bucle cuádruple. En la figura 2D, el bucle cuádruple UUUU (SEQ ID NO: 15) sustituye a una porción del bucle de tipo silvestre en la Figura 2A. En La Figura 2E, el bucle cuádruple GGGG (SEQ ID NO: 14) sustituye a toda la secuencia de bucle de tipo silvestre.

Las Figuras 4B y 4C ilustran precursores adicionales de ARN manipulados genéticamente. Cada precursor de ARN manipulado genéticamente incluye en su tallo una secuencia que es perfectamente complementaria a una porción de la secuencia del ARNm de luciferasa de luciérnaga. En La Figura 4B (SEQ ID NO: 8), esta región se muestra en negrita, y se encuentra en el lado 3' de tallo. En la Figura 4C (SEQ ID NO: 9), esta secuencia complementaria está en el lado 5' de tallo. A diferencia del pre-let-7-ARN de origen natural, estos precursores de ARN manipulados genéticamente tienen tallos totalmente complementarios y dirigen ARNi contra el ARNm de luciferasa.

Además, la modificación del precursor de ARNpt de origen natural para generar un precursor de ARN manipulado genéticamente (pre-ARNpi) puede incluir la alteración de la secuencia del ARN para incluir las secuencias de los dúplex deseados de ARNpi. Los dúplex deseados de ARNpi, y por lo tanto ambas porciones de tallo en el precursor de ARN manipulado genéticamente, son seleccionados por métodos conocidos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, la selección de un secuencia de 18,19, 20,21 nucleótidos, o más larga, de la secuencia de ARNm del gen objetivo de una región de 100 a 200 o 300 nucleótidos en el lado 3' del inicio de la traducción. En general, la secuencia se puede seleccionar de cualquier porción del ARNm del gen objetivo, tal como la 5' UTR (región no traducida), secuencia de codificación, o 3' UTR. Esta secuencia puede ir inmediatamente después de una región del gen objetivo que contiene dos nucleótidos AA adyacentes. Los dos últimos nucleótidos de los 21 o secuencia de nucleótidos similar pueden ser seleccionados para que sean UU (de modo que la cadena antisentido del ARNpi comienza con UU). Esta secuencia de 21 nucleótidos o similar puede ser usada para crear una porción de un tallo dúplex en el precursor de ARN manipulado genéticamente. Esta secuencia puede reemplazar una porción de tallo de una secuencia de pre-ARNpi de tipo silvestre, por ejemplo, enzimáticamente, o puede incluirse en una secuencia completa que se sintetiza. Por ejemplo, se pueden

sintetizar oligonucleótidos de ADN que codifican al precursor de ARN manipulado genéticamente de tallo-bucle, o que codifican sólo la porción que se inserta en el tallo dúplex del precursor, y usa enzimas de restricción para construir al constructo del precursor de ARN manipulado genéticamente, por ejemplo, a partir de un pre-ARNpt de tipo silvestre.

Los precursores de ARN manipulados genéticamente pueden incluir en el tallo dúplex las secuencias de 21-22 nucleótidos o similares del ARNpi deseado para ser producido *in vivo.* Por lo tanto, la porción de tallo del precursor de ARN manipulado genéticamente incluye al menos 18 o 19 pares de nucleótidos correspondientes a la secuencia de una porción exónica del gen cuya expresión se va a reducir o inhibir. Los dos nucleótidos 3' que flanquean esta región de tallo se pueden escoger a fin de maximizar la producción del ARNpi a partir del precursor de ARN manipulado genéticamente, y para maximizar la eficacia del ARNpi resultante en la manipulación dirigida del correspondiente ARNm para destrucción por el ARNi *in vivo* e *in vitro.*

Otra característica definitoria de estos precursores de ARN manipulados genéticamente puede ser aquella, como consecuencia de su longitud, secuencia y/o estructura, no inducen respuestas no específicas de la secuencia, tal como la inducción de la respuesta o apoptosis del interferón, o que ellos inducen un menor nivel de tales respuestas no específicas de la secuencia que el ARN bicatenario largo (> 150 pb) actualmente utilizado para inducir el ARNi. Por ejemplo, la respuesta de interferón es activada por ARNbc de más de 30 pares de bases.

Transgenes que codificación Precursores de ARN manipulados genéticamente

Los precursores de ARN manipulados genéticamente pueden ser sintetizados por métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado (tal como los que se encuentran disponibles a través de Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Estos precursores sintéticos de ARN manipulados genéticamente pueden ser usados directamente como se describe mas adelante o clonados en vectores de expresión por métodos conocidos en el campo.

Los precursores de ARN manipulados genéticamente deben ser suministrados a las células *in vitro* o *in vivo* en las cuales se desea manipular un ARNm específico para destrucción. Se han desarrollado una cantidad de métodos para suministrar ADN o ARN a las células. Por ejemplo, para suministro *in vivo,* se pueden inyectar moléculas directamente en un tejido o administrarlas sistémicamente. El suministro *in vitro* entrega incluye métodos conocidos en la técnica tales como electroporación y lipofección.

Para lograr concentraciones intracelulares de la molécula de ácido nucleico, suficientes para suprimir la expresión de ARNm endógenos, se puede utilizar, por ejemplo, un constructo de ADN recombinante en el cual se colocó el oligonucleótido bajo el control de un promotor *Pol III* (por ejemplo, un promotor de H1-ARN U6 o *Pol* III) o *Pol II* fuerte. El uso de tal constructo para transfectar células objetivo *in vitro* o *in vivo* dará como resultado la transcripción de cantidades suficientes del precursor de ARN manipulado genéticamente para dar lugar a la producción de un ARNpi que puede manipular una secuencia de ARNm correspondiente para escisión por un ARNi para disminuir la expresión del gen que codifica aquel ARNm. Por ejemplo, se puede introducir un vector *in vivo* de tal manera que se a absorbido por una célula y dirija la transcripción de un precursor de ARN manipulado genéticamente. Tal vector puede permanecer episomal o ser integrado al cromosoma, siempre que pueda transcribirse para producir el precursor deseado de ARNpt.

Tales vectores pueden construirse por métodos de tecnología de ADN recombinante conocidos en la técnica. Los vectores pueden ser plásmidos, virales, u otros vectores conocidos en la técnica tales como aquellos descritos aquí, usados para replicación y expresión en células de mamífero u otros tipos de células objetivo. Las secuencias de ácidos nucleico que codifican a los precursores de ARN manipulados genéticamente pueden ser preparadas usando técnicas conocidas. Por ejemplo, se puede sintetizar dos oligonucleótidos sintéticos de ADN para crear un nuevo gen que codifica al precursor completo de ARN manipulado genéticamente. Los oligonucleótidos de ADN, que se aparearán, dejando 'extremos adhesivos' apropiados para clonación, pueden ser insertados en un sitio de restricción en un plásmido que contiene una secuencia promotora (Por ejemplo, un promotor Pol II o Pol III) y secuencias terminadoras adecuadas 3' a las secuencias del precursor de ARN manipulado genéticamente (Por ejemplo, una secuencia de una señal de escisión y poliadenilación de SV40 o una secuencia de terminador Pol III).

La invención también puede ser usada con células huésped manipuladas genéticamente que contienen cualquiera de los vectores de expresión anteriores y por lo tanto expresar las moléculas de ácido nucleico de la invención en la célula huésped. Las células huésped pueden ser cultivadas utilizando técnicas y métodos conocidos (véase, por ejemplo, Culture of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc. 1987); Molecular Cloning, Sambrook y colaboradores (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)).

La introducción exitosa de vectores en células huésped puede ser controlada utilizando diversos métodos conocidos. Por ejemplo, la transfección transitoria puede ser señalizada con un reportero, tal como un marcador fluorescente, tal como proteína fluorescente verde (GFP). La transfección estable puede ser indicada utilizando marcadores que les dan a las células transfectadas resistencia a factores ambientales específicos (por ejemplo, antibióticos y fármacos), tal como resistencia a la higromicina B, por ejemplo, en células de insectos y en células de mamíferos.

Secuencias reguladoras

La expresión de los precursores de ARN manipulados genéticamente puede ser conducida por secuencias reguladoras, y los vectores puede incluir cualquiera de las secuencias reguladoras conocidas en la técnica que actúan en células de mamífero, por ejemplo, células de murino; en células de insectos; en células de plantas; u otras células. El termino secuencia reguladora incluye promotores, reforzadores, y otros elementos de control de la expresión. Se apreciará que la secuencia reguladora apropiada depende de factores tales como el uso futuro de la célula o animal transgénico en el cual se introduce una secuencia que codifica a un precursor de ARN manipulado genéticamente, y el nivel de expresión del precursor de ARN deseado. Una persona ordinariamente capacitada en la técnica sería capaz de elegir las secuencias reguladoras apropiadas. Por ejemplo, los animales transgénicos descritos en este documento pueden utilizarse para determinar el papel de un polipéptido de prueba o los precursores de ARN manipulados genéticamente en un tipo de célula particular, por ejemplo, una célula hematopoyética. En este caso, puede utilizarse una secuencia reguladora que dirige la expresión del transgén en forma ubicua, o una secuencia reguladora especifica hematopoyético que expresa el transgén únicamente en células hematopoyéticas. La expresión de los precursores de ARN manipulados genéticamente en una célula hematopoyética significa que la célula es ahora susceptible a ARNi objetivo específico de un gen particular. A continuación se describen ejemplos de varias secuencias reguladoras.

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

Alternativamente, la secuencia reguladora puede dirigir la expresión del transgén en órganos o tipos de células específicos (véase, por ejemplo, Lasko y colaboradores, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 6232). Se conocen en la técnica varias secuencias reguladoras específicas de tejido incluyendo la secuencia reguladora de albúmina para el hígado (Pinkert y colaboradores, 1987, Genes Dev. 1: 268-276); la secuencia reguladora de endotelina para las células endoteliales (Lee, 1990, J. Biol. Chem. 265: 10446-50); la secuencia reguladora de queratina para epidermis; la secuencia reguladora de la cadena ligera 2 de la miosina para corazón (Lee y colaboradores, 1992, J. Biol. Chem. 267: 15875-85), y la secuencia reguladora de insulina para páncreas (Bucchini y colaboradores, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 83: 2511 a 2515), o la secuencia reguladora de vav para células hematopoyéticas (Oligvy y colaboradores, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 96: 14943-14948). Otra secuencia reguladora adecuada, que dirige la expresión constitutiva de transgenes en células de origen hematopoyético, es la secuencia reguladora de MHC clase I de murino (Morello y colaboradores, 1986, EMBO J.5: 1877-1882) ya que la expresión de MHC es inducida por citoquinas, la expresión de un gen de prueba operativamente enlazado a su secuencia reguladora puede ser sobrerregulada en presencia de citoquinas.

Además, la expresión del transgén puede ser regulada de forma precisa, por ejemplo, mediante el uso de un secuencia reguladora inducible y sistemas de expresión tales como una secuencia reguladora que es sensible a ciertos reguladores fisiológicos, por ejemplo, niveles de glucosa en circulación, u hormonas (Docherty y colaboradores, 1994, FASEB J. 8: 20-24.). Tales sistemas de expresión inducibles, adecuados para el control de la expresión transgénica en células o en mamíferos tales como ratones, incluyen la regulación por ecdisona, por estrógeno, progesterona, tetraciclina, inductores químicos de dimerización, e isopropil-beta-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (colectivamente denominada como "la molécula reguladora"). Cada uno de estos sistemas de expresión está bien descrito en la literatura y permite la expresión del transgén a través del animal en una forma controlada por la presencia o ausencia de la molécula reguladora. Para una revisión de los sistemas de expresión inducibles, véase, por ejemplo, Mills, 2001, Genes Devel. 15: 1461-1467, y las referencias citadas en ese documento.

Los elementos reguladores mencionados anteriormente incluyen, pero no se limitan a, al gen temprano inmediato de citomegalovirus hCMV, los promotores tempranos o tardíos del adenovirus SV40 (Bemoist y colaboradores, Nature, 290: 304, 1981), el sistema tet, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC, el sistema TRC, el operador principal y las regiones promotoras del fago A, las regiones de control de la proteína de recubrimiento fd, el promotor para 3-fosfogliceratoquinasa, los promotores de la fosfatasa ácida, y los factores apareamiento α de levadura. Los promotores adicionales incluyen al promotor contenido en la repetición del terminal largo 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto y colaboradores, Cell 22: 787-797, 1988); el promotor de timidina quinasa de herpes (Wagner y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 78: 1441, 1981); o las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster y colaboradores, Nature 296: 39, 1988).

Ensayo para probar precursores de ARN manipulados genéticamente.

Se pueden usar lisados de embrión de *Drosophila* para determinar si un precursor de ARN manipulado genéticamente era, en realidad, el precursor directo de un ARNpt o ARNpi maduro. Este ensayo de lisado se describe en Tuschl y colaboradores, 1999, ver más arriba, Zamore y colaboradores, 2000, ver más arriba, y Hutvágner y colaboradores 2001, ver más arriba. Estos lisados recapitulan ARNi *in vitro*, permitiendo por lo tanto la investigar si el ARN del precursor propuesto era escindido en un ARNpt o ARNpi maduro por un mecanismo como el de ARNi. En resumen, el ARN precursor se incuba con un lisado de embrión de *Drosophila* varias veces luego ensayado para la producción del ARNpi

o ARNpt maduro por extensión del cebador o hibridación tipo Northern. Como en el ajuste *in vivo*, se acumula ARN maduro en la reacción libre de células. Por lo tanto, se puede demostrar que un ARN correspondiente al precursor propuesto es convertido en un dúplex de ARNpt o ARNpi en el lisado de embrión de *Drosophila*.

Además, se puede probar funcionalmente un precursor de ARN manipulado genéticamente en los lisados de embrión de *Drosophila*. En este caso, se incuba el precursor de ARN manipulado genéticamente en el lisado en presencia de un ARNm objetivo marcado en forma radioactiva en 5' en una reacción estándar de ARNi *in vitro* durante diferentes periodos de tiempo. El ARNm objetivo puede ser marcado de forma radiactiva en 5' usando guanililo transferasa (como se describe en Tuschl y colaboradores, 1999, *ver más arriba* y las referencias citadas ahí) u otros métodos adecuados. Los productos de la reacción *in vitro* son luego aislado y analizados en una acrilamida desnaturalizante o gel de agarosa para determinar si el ARNm objetivo ha sido escindido en respuesta a la presencia del precursor de ARN manipulado genéticamente en la reacción. El grado y la posición de tal decisión del ARNm objetivo indicará si la manipulación genética del precursor creó un pre-ARNpi capaz de mediar al ARNi específico de la secuencia.

Animales transgénicos

Los precursores de ARN manipulados genéticamente de la invención y usados en la invención pueden ser expresados en animales transgénicos. Estos animales representan un sistema modelo para el estudio de trastornos que son causados por, o exacerbadas por, sobreexpresión o subexpresión (comparado con el de tipo silvestre o normal) de ácidos nucleicos (y sus polipéptidos codificados) destinados a la destrucción por los productos precursores de ARN manipulados genéticamente (ARNpi), y para el desarrollo de agentes terapéuticos que modulan la expresión o actividad de ácidos nucleicos o polipéptidos destinados a la destrucción.

Los animales transgénicos pueden ser animales de granja (cerdos, cabras, ovejas, vacas, caballos, conejos, y similares), roedores (tales como ratas, cobayas y ratones), primates no humanos (por ejemplo, babuinos, monos, y chimpancés), y animales domésticos (por ejemplo, perros y gatos). Invertebrados tales como *Caenorhabditis elegans* o *Drosophila* pueden ser utilizados también como vertebrados no mamíferos tales como peces (por ejemplo, el pez cebra), o aves (por ejemplo, pollos). Los precursores de ARN manipulados genéticamente con tallos de 18 a 30 nucleótidos de longitud se prefieren para uso en mamíferos, tales como ratones.

Un animal fundador transgénico puede ser identificado con base en la presencia de un transgén que codifica los nuevos precursores de ARN en su genoma, y/o la expresión del transgén en tejidos o células de los animales, por ejemplo, usando PCR o análisis tipo Northern. La expresión se confirma mediante una disminución en la expresión (ARN o proteína) de la secuencia objetivo.

Un animal fundador transgénico puede ser usado para criar animales adicionales que portan el transgén. Por otra parte, los animales transgénicos que portan un transgén que codifica los precursores de ARN pueden ser criados además con otros animales transgénicos que portan otros transgenes. Además, las células obtenidas de los animales fundadores transgénicos o su descendencia pueden ser cultivadas para establecer líneas celulares primarias, secundarias, o inmortales que contienen el transgén.

Procedimientos para elaborar animales no humanos transgénicos

Una serie de métodos se han utilizado para obtener animales no humanos transgénicos, que son animales que han ganado un gen adicional por la introducción de un transgén en sus células (por ejemplo, tanto células somáticas como germinales), o en una línea germinal de ancestros. En algunos casos, los animales transgénicos pueden ser generados en instalaciones comerciales (por ejemplo, The Transgenic *Drosophila* Facility en la Universidad del Estado de Michigan, The Transgenic Zebrafish Core Facility en el Colegio Médico de Georgia (Augusta, Georgia), y Xenogen Biosciences (St. Louis, MO). En general, se suministra el constructo que contiene el transgén a la instalación para la generar un animal transgénico.

Los métodos para generar animales transgénicos incluyen la introducción del transgén en la línea germinal del animal. Un método es mediante microinyección de un constructo génico en el pronúcleo de un embrión en etapa temprana (por ejemplo, antes de la etapa de cuatro células; Wagner y colaboradores, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 78: 5016; Brinster y colaboradores, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU 82: 4438). Alternativamente, el transgén puede ser introducido en el pronúcleo mediante infección retroviral. Se ha descrito un procedimiento detallado para producir dichos ratones transgénicos (véase, por ejemplo, Hogan y colaboradores, Manipulating the Mouse Embryon, Cold Spring Laboratory Harbour, Cold Spring Harbour, Nueva York (1986); patente de los Estados Unidos No. 5.175.383 (1992)). Este procedimiento también ha sido adaptado para otras especies animales (por ejemplo, Hammer y colaboradores, 1985, Nature 315: 680; Murray y colaboradores, 1989, Reprod. Fert. Dev1. 1: 147; Pursel y colaboradores, 1987, Vet. Immunol. Histopath. 17: 303; Rexroad y colaboradores, 1990, J. Reprod. Fert. 41 (suplemento): 119; Rexroad y colaboradores, 1989, Molec. Reprod. Dev1. 1: 164; Simons y colaboradores, 1988, BioTechnology 6: 179; Vize y colaboradores, 1988, J. Cell. Sci. 90: 295; y Wagner, 1989, J. Cell. Biochem. 13B (suplemento): 164).

En resumen, el procedimiento consiste en introducir el transgén en un animal mediante la microinyección del constructo en los pronúcleos del (de los) óvulo(s) de mamífero fertilizado(s) para hacer que una o más copias del transgén sean retenidas en las células del(de los) mamífero(s) en desarrollo. Después de la introducción del constructo del transgén en el óvulo fecundado, el óvulo puede ser incubado *in vitro* durante diferentes cantidades de tiempo, o reimplantado en un huésped sustituto, o ambos. Un método común es incubar los embriones *in vitro* durante aproximadamente 1-7 días, dependiendo de la especie y, a continuación reimplantarlos en el huésped sustituto. La presencia del transgén en la progenie de los embriones manipulados transgénicamente se puede probar mediante análisis de transferencias tipo Southern de un segmento de tejido.

Otro método para producir animales transgénicos por línea germinal es a través del uso de células madre embrionarias (ES). El constructo génico puede introducirse en las células madre embrionarias por recombinación homóloga (Thomas y colaboradores, 1987, Cell 51: 503; Capecchi, Science 1989, 244: 1288; Joyner y colaboradores, 1989, Nature 338: 153) en una región transcripcionalmente activa del genoma. Un constructo adecuado también puede ser introducido en las células madre embrionarias mediante transfección mediada por ADN, tales como por electroporación (Ausubel y colaboradores, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987). Los procedimientos detallados para el cultivo de células madre embrionarias (por ejemplo, ES-D3, ATCC # CCL-1934, ES-E14TG2a, ATCC # CCL-1821, American Type Culture Collection, Rockville, MD) y los métodos de elaboración de los animales transgénicos a partir de células madre embrionarias pueden encontrarse en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells, A Practical Approach, ed. E.J. Robertson (IRL Press, 1987). En resumen, las células se obtienen a partir de la implantación previa de embriones cultivados *in vitro* (Evans y colaboradores, 1981, Nature 292: 154-156). Los transgenes pueden introducirse eficientemente en las células ES por transfección de ADN o por transducción mediada por retrovirus. Las células ES transformadas resultantes pueden combinarse posteriormente con blastocistos de un animal no humano. Las células ES colonizan el embrión y contribuyen a la línea germinal del animal quimérico resultante.

En los métodos anteriores, el transgén puede introducirse como un constructo lineal, un plásmido circular, o un vector viral, que se puede incorporar y heredar como un transgén integrado en el genoma del huésped. El transgén también puede ser construido para permitir que sea heredado como un plásmido extracromosómico (Gassmann y colaboradores, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 92: 1292). Un plásmido es una molécula de ADN que puede replicarse de forma autónoma en un huésped.

Los animales transgénicos no humanos pueden obtenerse también mediante la infección o transfección de células, ya sea *in vivo* (por ejemplo, inyección directa), *ex vivo* (por ejemplo, infectando las células fuera del huésped y después reimplantándolas), o *in vitro* (por ejemplo, infectando el células fuera del huésped), por ejemplo, con un vector viral recombinante que porta un gen que codifica los precursores de ARN manipulado genéticamente. Los ejemplos de vectores virales adecuados incluyen vectores retrovirales recombinantes (Valerio y colaboradores, 1989, Gene 84: 419; Scharfman y colaboradores, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88: 462; Millerand Buttimore, 1986, Mol. Cell. Biol. 6: 2895), vectores adenovirales recombinantes (Freidman y colaboradores, 1986, Mol. Cell. Biol. 6: 3791; Levrero y colaboradores, 1991, Gene 101: 195), y vectores virales recombinantes de herpes simple (Fink y colaboradores, 1992, Human Gene Therapy 3: 11). Tales métodos también son útiles para la introducción de constructos en células para usos distintos a la generación de animales transgénicos.

Otros enfoques incluyen la inserción de transgenes que codifican los nuevos precursores de ARN manipulados genéticamente en vectores virales que incluyen adenovirus recombinante, virus adenoasociados, y el virus 1 del herpes simple, o plásmidos bacterianos recombinantes o eucariotas. Los vectores virales transfectan células directamente. Otros enfoques incluyen el suministro de los transgenes, en la forma de ADN de plásmido, con la ayuda, por ejemplo, liposomas catiónicos (lipofectina) o conjugados de polilisina que forman derivados (por ejemplo, anticuerpos conjugados), gramicidina S, envolturas virales artificiales, u otros de tales portadores intracelulares, así como inyección directa del constructo transgénico o precipitación con $CaPO_4$ llevada a cabo *in vivo.* Tales métodos también se pueden utilizar *in vitro* para introducir constructos en células para usos distintos de la generación de animales transgénicos.

Los vectores retrovirales y vectores de virus adenoasociados pueden ser utilizados como un sistema de suministro de genes recombinantes para la transferencia de genes exógenos *in vivo* o *in vitro.* Estos vectores proporcionan un suministro eficiente de genes en las células, y los ácidos nucleicos transferidos se integran de manera estable en el ADN cromosómico del huésped. El desarrollo de líneas celulares especializadas (denominadas "células de empaquetamiento") que producen sólo retrovirus defectuosos en la replicación ha aumentado la utilidad de los retrovirus para la terapia génica, y los retrovirus defectuosos están caracterizados para uso en transferencia de genes para propósitos de terapia génica (para una revisión véase Miller, 1990, Blood 76: 271). Un retrovirus de replicación defectuosa puede ser empacado en viriones que se pueden utilizar para infectar una célula objetivo mediante el uso de un virus auxiliar por técnicas estándar. Los protocolos para producir retrovirus recombinantes y para infectar células *in vitro* o *in vivo* con tales virus pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M. y colaboradores (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Secciones 9.10 - 9.14 y otra manuales de laboratorio convencionales.

Los ejemplos de retrovirus adecuados incluyen pLJ, pZIP, pWE y pEM que son conocidos por aquellos ordinariamente capacitados en la técnica. Los ejemplos de líneas de virus adecuadas para empaquetamiento para preparar sistemas

retrovirales tanto ecotrópicos como anfotrópicos incluyen Psi-Crip, Psi-Cre, Psi-2 y Psi-Am. Los retrovirus han sido utilizados para introducir una variedad de genes en muchos tipos de células diferentes, incluyendo las células epiteliales, *in vitro* y/o *in vivo* (véase, por ejemplo, Eglitis y colaboradores, 1985, Science 230: 1395-1398; Danos y Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85: 6460 - 6464; Wilson y colaboradores, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85: 3014 - 3018; Armentano y colaboradores, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 87: 6141 - 6145; Huber y colaboradores, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88: 8039 - 8043; Ferry y colaboradores, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88: 8377 - 8381; Chowdhury y colaboradores, 1991, Science 254: 1802-1805; van Beusechem y colaboradores, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 7640 - 7644; Kay y colaboradores, 1992, Human Gene Therapy 3: 641-647; Dai y colaboradores, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 10892 - 10895 mil; Hwu y colaboradores, 1993, J. Immunol. 150: 4104 - 4115; patente de los Estados Unidos No. 4.868.116; patente de los Estados Unidos No. 4.980.286; solicitud PCT WO 89/07136; solicitud PCT WO 89/02468; solicitud PCT WO 89/05345; y la solicitud PCT WO 92/07573).

En otro ejemplo, los vectores retrovirales recombinantes capaces de transducir y expresar genes insertados en el genoma de una célula pueden ser producidos mediante la transfección del genoma retroviral recombinante en líneas celulares de empaquetamiento adecuadas tales como PA317 y Psi-CRIP (Cornette y colaboradores, 1991, Human Gene Therapy 2: 5-10; Cone y colaboradores, 1984, Proc Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81: 6349). Los vectores adenovirales recombinantes se pueden utilizar para infectar una amplia variedad de células y tejidos en huéspedes susceptibles (por ejemplo, rata, hámster, perro, y chimpancé) (Hsu y colaboradores, 1992, J. Infectious Disease, 166: 769), y también tienen la ventaja de no requerir células mitóticamente activas para la infección.

Otro sistema de suministro de genes virales útil en la presente invención también utiliza vectores derivados de adenovirus. El genoma de un adenovirus puede manipularse de manera que codifique y exprese un producto génico de interés pero se inactiva en términos de su capacidad para replicarse en un ciclo de vida viral lítico normal. Véase, por ejemplo, Berkner y colaboradores (1988, BioTechniques 6: 616), Rosenfeld y colaboradores (1991, Science 252: 431-434), y Rosenfeld y colaboradores (1992, Cell 68: 143-155). Los vectores adenovirales adecuados derivados de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 dl324 u otras cepas de adenovirus (por ejemplo, Ad2, Ad3, Ad7 etc.) son conocidos por aquellos ordinariamente capacitados en la técnica. Los adenovirus recombinantes pueden ser ventajosos en ciertas circunstancias ya que no son capaces de infectar células que no se dividen y se pueden utilizar para infectar una amplia variedad de tipos de células, incluyendo células epiteliales (Rosenfeld y colaboradores, 1992, citado más arriba). Además, la partícula viral es relativamente estable y susceptible a la purificación y concentración, y como anteriormente, puede ser modificada para afectar el espectro de infectividad. Adicionalmente, el ADN adenoviral introducido (y el ADN foráneo contenido en el mismo) no está integrado en el genoma de una célula huésped pero sigue siendo episomal, evitando así problemas potenciales que pueden ocurrir como resultado de mutagénesis de inserción *in situ* donde el ADN introducido se integra en el genoma del huésped (por ejemplo, ADN retroviral). Por otra parte, la capacidad de transporte del genoma adenoviral para el ADN foráneo es grande (hasta 8 kilobases) con relación a otros vectores de suministro de genes (Berkner y colaboradores citado más arriba; Haj-Ahmand y Graham, 1986, J. Virol. 57: 267).

Incluso otro sistema de vector viral útil para el suministro de los transgenes en cuestión es el virus adenoasociado (AAV). El virus adenoasociado es un virus defectuoso de origen natural que requiere de otro virus, tal como un adenovirus o un virus herpes, como un virus auxiliar para la replicación eficiente y un ciclo de vida productivo. Para una revisión, véase Muzyczka y colaboradores (1992, Curr. Topics in Micro. and Immunol. 158: 97-129). También es uno de los pocos virus que pueden integrar su ADN en las células que no se dividen, y presenta una alta frecuencia de integración estable (véase, por ejemplo, Flotte y colaboradores (1992, Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7: 349 - 356; Samulski y colaboradores, 1989, J. Virol. 63: 3822 - 3828; y McLaughlin y colaboradores (1989, J. Virol. 62: 1963-1973). Los vectores que contienen tan poco como 300 pares de bases de AAV pueden empaquetarse y pueden integrarse. El espacio para ADN exógeno se limita a aproximadamente 4,5 kb. Un vector AAV tal como el descrito en Tratschin y colaboradores (1985) Mol. Cell. Biol. 5: 3251 - 3260 se puede utilizar para introducir ADN en las células. Se han introducido una variedad de ácidos nucleicos en diferente tipos de células usando vectores AAV (véase, por ejemplo, Hermonat y colaboradores (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81: 6466 - 6470; Tratschin y colaboradores (1985) Mol. Cell. Biol. 4: 2072-2081; Wondisford y colaboradores (1988) Mol. Endocrinol. 2: 32-39; Tratschin y colaboradores (1984) J. Virol. 51: 611-619; y Flotte y colaboradores (1993) J. Biol. Chem. 268: 3781 - 3790).

Además de los métodos de transferencia viral, tales como los ilustrados anteriormente, también se puede emplear los métodos no virales para provocar la expresión de un precursor de ARN manipulado genéticamente de la invención en el tejido de un animal. La mayoría de los métodos no virales de transferencia de genes se basan en mecanismos normales usados por células de mamífero para la captación y el transporte intracelular de macromoléculas. En realizaciones preferidas, los sistemas de suministro de genes no virales utilizados en la presente invención se basan en rutas endocíticas para la captación del gen en cuestión por la célula objetivo. Los ejemplos de sistemas de suministro de genes de este tipo incluyen sistemas derivados de liposomas, conjugados de polilisina, y envolturas virales artificiales. Otras realizaciones incluyen sistemas de inyección de plásmido tal como se describen en Meuli y colaboradores, (2001) J. Invest. Dermatol., 116 (1): 131-135; Cohen y colaboradores, (2000) Gene Ther., 7 (22): 1896-905; y Tam y colaboradores, (2000) Gene Ther., 7 (21): 1867-1874.

En una realización representativa, un gen que codifica un precursor de ARN manipulado genéticamente de la invención puede ser atrapado en liposomas que portan cargas positivas en su superficie (por ejemplo, lipofectinas) y

(opcionalmente) que están etiquetados con anticuerpos contra antígenos de superficie celular del tejido objetivo (Mizuno y colaboradores, (1992) No Shinkei Geka, 20: 547-551; publicación PCT WO 91/06309; La solicitud de patente japonesa 1047381; y la publicación de patente europea EP-A-43075).

Los animales que albergan el transgén pueden identificarse mediante la detección de la presencia del transgén en el ADN genómico (por ejemplo, usando análisis tipo Southern). Además, la expresión del precursor de ARN manipulado genéticamente puede ser detectada directamente (por ejemplo, por análisis tipo Northern). La expresión del transgén también se puede confirmar mediante la detección de una disminución en la cantidad de proteína correspondiente a la secuencia objetivo. Cuando el transgén está bajo el control de un promotor regulado en forma inducible o por desarrollo, la expresión de la proteína objetivo se reduce cuando se induce el transgén o en el la etapa de desarrollo cuando se expresa el transgén, respectivamente.

Clones de animales transgénicos

Los clones de los animales transgénicos no humanos descritos en este documento pueden producirse de acuerdo con los métodos descritos en Wilmut y colaboradores ((1997) Nature, 385: 810-813) y las publicaciones PCT Nos. WO 97/07668 y WO 97/07669. En resumen, una célula, por ejemplo, una célula somática del animal transgénico, se puede aislar e inducir para salir del ciclo de crecimiento y entrar en la fase G_0 para entrar en inactividad. La célula inactiva puede entonces fusionarse, por ejemplo, a través del uso de pulsos eléctricos, a un ovocito enucleado de un animal de la misma especie de la que se aísla la célula inactiva. El ovocito reconstruido se cultiva luego de tal manera que se desarrolla en una mórula o blastocito y luego se transfiere a un animal de acogida hembra pseupreñado. La descendencia nacida de este animal de acogida hembra serán clones del animal del cual se aisló la célula, por ejemplo, la célula somática.

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

Los animales transgénicos utilizados en la presente invención pueden ser homocigotos o heterocigotos, y uno de los beneficios de la invención es que el ARNm objetivo se degrada eficazmente incluso en heterocigotos. La presente invención puede utilizar animales transgénicos que portan un transgén de la invención en todas sus células, así como animales que portan un transgén en algunas, pero no en todas sus células. Es decir, la invención puede usar animales mosaico. El transgén puede ser integrado como un único transgén o en concatémeros, por ejemplo, tándems inversos o tándems directos.

Para una revisión de las técnicas que se pueden usar para generar y evaluar animales transgénicos, las personas capacitadas en la técnica pueden consultar Gordon (Intel. Rev. Cytol. 115: 171-229, 1989), y pueden obtener orientación adicional por ejemplo en: Hogan y colaboradores "Manipulating the Mouse Embryo" (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1986; Krimpenfort y colaboradores, Bio/Technology 9: 86, 1991; Palmiter y colaboradores, Cell 41: 343, 1985; Kraemer y colaboradores, "Genetic Manipulation of the Early Mammalian Embryo", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1985; Hammer y colaboradores, Nature 315: 680, 1985; Purcel y colaboradores, Science, 244: 1281, 1986; Wagner y colaboradores, patente de los Estados Unidos No. 5.175.385; y Krimpenfort y colaboradores, patente de los Estados Unidos No. 5.175.384.

Plantas transgénicas

Entre los organismos eucariotas que pueden ser usados en la invención están plantas que contienen un ácido nucleico exógeno que codifica un precursor de ARN manipulado genéticamente de la invención.

Por consiguiente, un método de acuerdo con la invención comprende la elaboración de una planta que tiene una molécula de ácido nucleico o constructo, por ejemplo, un transgén, que se describe en este documento. Las técnicas para introducir ácidos nucleicos exógenos en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas son conocidas en la técnica, e incluyen, sin limitación, la transformación mediada por *Agrobacterium*, la transformación mediada por un vector viral, electroporación y transformación con pistola de partículas, véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.204.253 y 6.013.863. Si se usa un cultivo de células o tejido como el tejido receptor para la transformación, se pueden regenerar plantas a partir de cultivos transformados mediante técnicas conocidas por aquellos ordinariamente capacitados en la técnica. Las plantas transgénicas pueden ser ingresadas en un programa de fitomejoramiento, por ejemplo, para introducir un ácido nucleico que codifica un polipéptido en otras líneas, para transferir el ácido nucleico a otras especies o para una selección adicional de otros rasgos deseables. Alternativamente, las plantas transgénicas pueden ser propagadas en forma vegetativa para aquellas especies susceptibles a este tipo de técnicas. Progenie incluye descendientes de una planta particular o línea de plantas. La progenie de una planta incluyen las semillas

formada en F_1, F_2, F_3, y plantas de generación posteriores, o semillas formadas en BC_1, BC_2, BC_3 y plantas de una generación posterior. Las semillas producidas por una planta transgénica pueden ser cultivadas y luego autofecundadas (o cruzamiento y autofecundación) para obtener semillas homocigotas para el ácido nucleico que codifica un nuevo polipéptido.

Un grupo adecuado de plantas con las cuales practicar la invención incluyen las dicotiledóneas, tales como cártamo, alfalfa, soja, colza (alto contenido de ácido erúcico y canola), o girasol. También son adecuadas monocotiledóneas tales como maíz, trigo, centeno, cebada, avena, arroz, mijo, amaranto o sorgo. También son adecuados los cultivos de hortalizas o cultivos de tubérculos como la patata, brócoli, guisantes, maíz dulce, palomitas de maíz, tomate, guisantes (incluyendo frijoles, habas, judías secas, judías verdes) y similares. También son adecuados cultivos de frutas como el melocotón, pera, manzana, cereza, naranja, limón, pomelo, ciruela, mango y palma. Por lo tanto, la invención tiene uso en una amplia variedad de plantas, incluyendo especies de los géneros *Anacardium*, *Arachis*, *Asparagus*, *Atropa*, *Avena*, *Brassica*, *Citrus*, *Citrullus*, *Capsicum, Carthamus*, *Cocos*, *Coffea, Cucumis*, *Cucurbita, Daucus*, *Elaeis*, *Fragaria*, *Glycine*, *Gossypium*, *Helianthus*, *Heterocallis*, *Hordeum*, *Hyoscyamus*, *Lactuca*, *Linum, Lolium*, *Lupinus*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Manihot, Majorana, Medicago*, *Nicotiana*, *Olea*, *Oryza*, *Panicum, Pannesetum*, *Persea, Phaseolus*, *Pistachia*, *Pisum*, *Pyrus*, *Prunus*, *Raphanus, Ricinus, Secale*, *Serzecio*, *Sinapis*, *Solanum*, *sorgo*, *Theobromus*, *Trigonella*, *Triticum*, *Vicia*, *Vitis*, *Vigna* y *Zea.*

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden expresarse en plantas de una forma específica de la célula o del tejido de acuerdo con los elementos reguladores elegidos para incluir en un constructo particular de ácido nucleico presente en la planta. Las células, tejidos y órganos adecuados en los que expresar un polipéptido quimérico de la invención incluyen, sin limitación, células de óvulo, células centrales, células sinérgidas, cigotos, primordios de óvulo, nucelos, tegumentos, endotelio, células gametofitos femeninos, embriones, eje, cotiledones, suspensores, endospermo, cubierta de la semilla, meristemo de las planta, haz vascular, cambium, floema, corteza, meristemas apicales de la raíz y de los brotes, meristemos radiculares o de brotes laterales, meristemo floral, primordios foliares, células epidérmicas de la hoja, y células epidérmicas de la hoja, por ejemplo, células epidérmicas involucradas en la formación de la capa cuticular. También son adecuados las células y tejidos cultivados en medios líquidos o en medios semisólidos.

Hongos transgénicos

Otros organismos eucariotas que pueden ser usados en la invención son los hongos que contienen una molécula de ácido nucleico exógeno que codifica un precursor de ARN manipulado genéticamente de la invención.

Por consiguiente, un método de acuerdo con la invención comprende introducir una molécula de ácido nucleico o constructo como se describe en el presente documento en un hongo. Las técnicas para introducir ácidos nucleicos exógenos en muchos hongos son conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.252.726 y 5.070.020. Los hongos transformados se pueden cultivar mediante técnicas conocidas por aquellos ordinariamente capacitados en la técnica. Tales hongos se pueden utilizar para introducir un ácido nucleico que codifica un polipéptido en otras cepas de hongos, para transferir el ácido nucleico a otras especies o para una selección adicional de otros rasgos deseables.

Un grupo adecuado de hongos con los cuales poner en práctica la invención incluyen la levadura de fisión y la levadura en gemación, tal como *Saccharomyces cerevisiae, S. pombe, S. carlsbergeris* y *Candida albicans.* Hongos filamentosos tales como *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.*, son también útiles.

Composiciones farmacéuticas

Las moléculas de la invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas. Tales composiciones típicamente incluyen una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un transgén) que codifica un precursor de ARN manipulado genéticamente, o el precursor mismo de ARN, y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en la presente descripción, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Se pueden incorporar también compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Una composición farmacéutica se formula para ser compatible con su vía de administración prevista. Ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, inhalación, transdérmica (tópica), transmucosal, y rectal. La administración también puede ser oral. Las soluciones o suspensiones usadas para administración parenteral tal como intradérmica, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como el ácido etilendiaminotetraacético; reguladores tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La

preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables, o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL^{MR} (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina regulada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta un grado que pueda ser fácilmente inyectable. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe ser preservada contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

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

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Para los propósitos de administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, pastillas, o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un portador fluido para uso como un enjuague bucal. Los agentes de enlazamiento farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes pueden ser incluidos como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente de desintegración tal como ácido algínico, Primogel^{MR}, o almidón de maíz, un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes^{MR}; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo o sabor de naranja.

Para administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de un rocío en aerosol a partir de un envase o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por vía transmucosa o transdérmica. Para administración transmucosal o transdérmica, se usan penetrantes apropiados para la barrera a permear en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede lograrse a través del uso de aerosoles nasales o supositorios. Para administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, bálsamos, geles o cremas como generalmente se conoce en la técnica.

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

En una realización, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de vinil etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para aquellos ordinariamente capacitados en la técnica. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente a través de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) también se pueden utilizar como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por aquellos ordinariamente capacitados en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 4.522.811.

Es ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidades de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el vehículo farmacéutico requerido.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de dosis entre efectos tóxico y terapéutico es el índice terapéutico y puede expresarse como relación DL50/DE50. Se prefieren los compuestos que exhiben índices terapéuticos altos. Aunque se pueden usar compuestos que presentan efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado para diseñar un sistema de administración que dirija dichos compuestos al sitio de tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de las composiciones está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para lograr un intervalo de concentración circulante en plasma del compuesto o, en su caso, del producto polipeptídico de una secuencia objetivo (por ejemplo, logrando una menor concentración del polipéptido) que incluye el IC50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición máxima media de los síntomas) como se determina en cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar en forma más precisa las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

Una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que contiene una secuencia que codifica un precursor de ARN manipulado genéticamente, o el precursor mismo (es decir, una dosificación efectiva), es una cantidad que inhibe la expresión del polipéptido codificado por el gen objetivo en por lo menos un 30 por ciento. Porcentajes más altos de inhibición, por ejemplo, 45, 50, 75, 85, 90 por ciento o mayores puede ser preferibles en ciertas realizaciones. Los ejemplos de dosis incluyen cantidades en miligramos o microgramos de la molécula por kilogramo del sujeto o peso de la muestra (por ejemplo, aproximadamente 1 microgramo por kilogramo hasta aproximadamente 500 miligramos por kilogramo, aproximadamente 100 microgramos por kilogramo hasta aproximadamente 5 miligramos por kilogramo, o aproximadamente 1 microgramo por kilogramo hasta aproximadamente 50 microgramos por kilogramo. Las composiciones se pueden administrar una vez por semana durante entre aproximadamente 1 a 10 semanas, por ejemplo, entre 2 a 8 semanas, o entre aproximadamente 3 a 7 semanas, o durante aproximadamente 4, 5, o 6 semanas. La persona ordinariamente capacitada en la materia de dará cuenta que ciertos factores pueden influir en la dosis y el tiempo requerido para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo pero no limitado a la severidad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, estado general de salud y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición puede incluir un tratamiento único o una serie de tratamientos. En algunos casos puede ser deseable la expresión transitoria del precursor de ARN manipulado genéticamente. Cuando se incluye un promotor inducible en el constructo que codifica un precursor de ARN manipulado genéticamente, se ensaya la expresión después del suministro al sujeto de una dosis apropiada de la sustancia utilizada para inducir expresión.

Se entiende además que las dosis apropiadas de una composición dependen de la potencia de la molécula (la secuencia que codifica al precursor manipulado genéticamente) con respecto a la expresión o actividad a modular. Cuando una o más de estas moléculas es para ser administrada a un animal (por ejemplo, un humano) para modular la expresión o actividad de un polipéptido o ácido nucleico, un médico, veterinario, o investigador puede, por ejemplo, prescribir una dosis relativamente baja al principio, aumentando posteriormente la dosis hasta obtener una respuesta adecuada. Además, se entiende que el nivel de dosis específica para cualquier sujeto particular dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, estado general de salud, sexo y dieta del sujeto, el tiempo de administración, la ruta de administración, la velocidad de excreción, cualquier combinación de fármacos y el grado de expresión o actividad a modular.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden ser generalmente insertadas en vectores y utilizarse como vectores para terapia génica. Los vectores para terapia génica pueden administrarse a un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase la patente de los Estados Unidos No. 5.328.470) o por inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Chen y colaboradores (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91: 3054 - 3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que está embebido el vehículo de suministro del gen. Alternativamente, cuando puede producirse intacto el vector completo de suministro de genes a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de suministro de genes.

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

Métodos de Tratamiento

Los métodos profilácticos y terapéuticos de tratamiento de un sujeto en riesgo de (o susceptible a) un trastorno o que tiene un trastorno asociado con una expresión o actividad aberrante o indeseada de cualquier gen que se transcribe como se describe en el presente documento. Tal como se utiliza aquí, el término "tratamiento" se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico a un paciente, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido aislado o línea celular de un paciente, que tiene un trastorno, por ejemplo, una enfermedad o condición, un síntoma de enfermedad, o una predisposición hacia una enfermedad, con el propósito de curar, sanar, paliar, aliviar, alterar, remediar, mejorar, mejorar, o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad, o la predisposición hacia la enfermedad. Un agente terapéutico puede ser un precursor de ARN manipulado genéticamente de la invención, o una molécula de ácido nucleico (ADN) que codifica al precursor.

Con respecto a los métodos tanto profilácticos como terapéuticos de tratamiento, tales tratamientos pueden ser específicamente adaptados o modificados, con base en el conocimiento obtenido respecto al genoma de un sujeto, específicamente el conocimiento respecto a la secuencia de un gen (es decir, gen mutado) cuya expresión está asociada con la enfermedad. Por lo tanto, una molécula de la invención puede ser manipulada genéticamente, con base en el conocimiento del gen cuya expresión se busca, para inhibir la expresión de ese gen como se describe aquí.

Se divulga en el presente documento un método para tratar en un sujeto, un trastorno, por ejemplo, una enfermedad o condición, asociada con una expresión o actividad génica aberrante o no deseada, mediante la administración al sujeto de una secuencia de ácido nucleico manipulada genéticamente que codifica un ARN precursor manipulado genéticamente. Los sujetos en riesgo de una enfermedad que es causada o donde contribuye una expresión o actividad aberrante o no deseada de un gen se pueden identificar, por ejemplo, por cualquiera o por una combinación de ensayos de diagnóstico o de pronóstico que son conocidos en la técnica. La administración de un agente profiláctico puede ocurrir antes de la manifestación de los síntomas característicos de la aberración, de tal manera que se evite una enfermedad o trastorno o, alternativamente, se retrase su avance.

Las moléculas de la invención pueden actuar como agentes terapéuticos novedosos para controlar uno o más trastornos celulares proliferativos y/o de diferenciación, trastornos asociados con el metabolismo óseo, trastornos del sistema inmune, trastornos hematopoyéticos, trastornos cardiovasculares, trastornos hepáticos, enfermedades virales, dolor o trastornos metabólicos.

Ejemplos de trastornos celulares proliferativos y/o de diferenciación incluyen cáncer, por ejemplo, carcinoma, sarcoma, trastornos metastásicos o trastornos neoplásicos hematopoyéticos, por ejemplo, leucemias. Un tumor metastásico puede surgir de una multitud de tipos de tumores primarios, incluyendo pero no limitado a aquellos de próstata, colon, pulmón, mama y de origen hepático.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "cáncer", "hiperproliferativo", y "neoplásico" se refieren a células que tienen la capacidad de crecimiento autónomo, es decir, un estado o condición anormal caracterizada por un crecimiento celular de rápida proliferación. Estados de enfermedad hiperproliferativos y neoplásicos pueden clasificarse como patológicos, es decir, que caracterizan o constituyen una estado de enfermedad, o pueden ser clasificados como no patológicos, es decir, una desviación de lo normal pero no asociada con un estado de enfermedad. El término se entiende que incluye todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos, u órganos transformados en forma maligna, independientemente del tipo histopatológico o la etapa de invasividad. Las células "hiperproliferativas patológicas" se presentan en estados de enfermedad caracterizados por el crecimiento de un tumor maligno. Ejemplos de células proliferativas no patológicas incluyen la proliferación de células asociadas con la reparación de heridas.

Los términos "cáncer" o "neoplasias" incluyen tumores malignos de los diversos sistemas de órganos, tales como los que afectan al pulmón, mama, tiroides, linfoide, gastrointestinal, y del tracto genitourinario, así como adenocarcinomas que incluyen tumores malignos tales como la mayoría de los cánceres de colon, carcinoma de células renales, cáncer de próstata y/o tumores testiculares, carcinoma de células no pequeñas del pulmón, cáncer del intestino delgado y cáncer del esófago.

El término "carcinoma" es reconocido en la técnica y se refiere a tumores malignos de tejidos epiteliales o endocrinos que incluyen carcinomas del sistema respiratorio, carcinomas del sistema gastrointestinal, carcinomas del sistema genitourinario, carcinomas testiculares, carcinomas de mama, carcinomas de próstata, carcinomas del sistema endocrino y melanomas. Los ejemplos de carcinomas incluyen aquellos que se forman a partir del tejido del cuello uterino, pulmón, próstata, mama, cabeza y cuello, colon y ovario. El término también incluye carcinosarcomas, por ejemplo, que incluye tumores malignos compuestos por tejidos carcinomatosos y sarcomatosos. Un "adenocarcinoma" se refiere a un carcinoma derivado de tejido glandular o en el que las células tumorales forman estructuras glandulares

reconocibles.

El término "sarcoma" es reconocido en la técnica y se refiere a tumores malignos de derivación mesenquimal.

Otros ejemplos de trastornos proliferativos incluyen trastornos neoplásicos hematopoyéticos. Tal como se usa en este documento, el término "trastornos neoplásicos hematopoyéticos" incluye enfermedades que involucran células hiperplásicas/neoplásicas de origen hematopoyético o, por ejemplo, que surgen de linaje mieloide, linfoide o eritroide, o células precursoras de los mismos. Preferiblemente, las enfermedades surgen de las leucemias agudas pobremente diferenciadas, por ejemplo, leucemia eritroblástica y leucemia megacarioblástica aguda. Otros Ejemplos de trastornos mieloides incluyen, pero no se limitan a, leucemia promieloide aguda (APML), leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia mielógena crónica (CML) (revisado en Vaickus, L. (1991) Crit Rev. en Oncol./Hemotol. 11: 267-97); Los tumores malignos linfoides incluyen, pero no se limitan a leucemia linfoblástica aguda (ALL) que incluye ALL de linaje B y ALL de linaje T, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), leucemia de células pilosas (HLL) y macroglobulinemia de Waldenstrom (WM). Otras formas de linfomas malignos incluyen, pero no se limitan a, linfoma no Hodgkin y variantes del mismo, linfomas de células T periféricas, leucemia/linfoma de células T adultas (ATL), linfoma de células T cutáneas (CTCL), leucemia linfocítica granular grande (LGF), enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Reed-Sternberg.

En general, los precursores de ARN manipulados genéticamente de la invención están diseñados para manipular los genes asociados con trastornos particulares. Ejemplos de tales genes asociados con proliferativos que pueden ser manipulados incluyen ras activado, p53, BRCA-1 y BRCA-2. Otros genes específicos que pueden ser manipulados son aquellos asociados con esclerosis lateral amiotrófica (ALS; por ejemplo, superóxido dismutasa 1 (SOD1)); enfermedad de Huntington (por ejemplo, la Huntingtina), enfermedad de Parkinson (Parkina), y genes asociados con trastornos autosómicos dominantes.

Los ARN manipulados genéticamente de la invención pueden ser usados para tratar una variedad de trastornos del sistema inmune, en particular aquellos asociados con la sobreexpresión de un gen o la expresión de un gen mutante. Los ejemplos de trastornos o enfermedades hematopoyéticas incluyen, pero no se limitan a, enfermedades autoinmunes (incluyendo, por ejemplo, diabetes mellitus, artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psoriásica), esclerosis múltiple, encefalomielitis, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis autoinmune, dermatitis (incluyendo dermatitis atópica y dermatitis eccematosa), psoriasis, síndrome de Sjögren, enfermedad de Crohn, úlcera aftosa, iritis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, colitis ulcerosa, asma, asma alérgica, lupus eritematoso cutáneo, escleroderma, vaginitis, proctitis, erupciones medicamentosas, reacciones de reversión de la lepra, eritema nudoso leproso, uveítis autoinmune, encefalomielitis alérgica, encefalopatía hemorrágica necrotizante aguda, pérdida auditiva neurosensorial idiopática bilateral progresiva, anemia aplásica, anemia pura de glóbulos rojos, trombocitopenia idiopática, policondritis, granulomatosis de Wegener, hepatitis activa crónica, síndrome de Stevens-Johnson, esprue idiopático, liquen plano, enfermedad de Graves, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveítis posterior, y fibrosis pulmonar intersticial), enfermedad de injerto contra huésped, casos de trasplantes, y alergia, tales como, alergia atópica.

Los ejemplos de trastornos que implican el corazón o "trastornos cardiovasculares" incluyen, pero no se limitan a, una enfermedad, trastorno, o estado que involucra al sistema cardiovascular, por ejemplo, el corazón, los vasos sanguíneos, y/o la sangre. Un trastorno cardiovascular puede ser causado por un desequilibrio en la presión arterial, un mal funcionamiento del corazón, o una oclusión de un vaso sanguíneo, por ejemplo, por un trombo Los ejemplos de tales trastornos incluyen hipertensión, aterosclerosis, espasmo arterial coronario, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad arterial coronaria, enfermedad valvular, arritmias y cardiomiopatías.

Los trastornos que pueden ser tratados por los métodos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, trastornos asociados con una acumulación en el hígado de tejido fibroso, tal como aquel resultante de un desequilibrio entre la producción y la degradación de la matriz extracelular acompañado por el colapso y condensación de fibras preexistentes.

Además, las moléculas de la invención pueden usarse para tratar enfermedades virales, incluyendo, pero sin limitarse a, hepatitis B, hepatitis C, virus de herpes simple (HSV), VIH-SIDA, virus de la polio y virus de la viruela. Las moléculas de la invención son manipuladas genéticamente como se describe en este documento para manipular las secuencias expresadas de un virus, mejorando de este modo la actividad viral y la replicación. Las moléculas se pueden utilizar en el tratamiento y/o el diagnóstico del tejido infectado por virus. También, tales moléculas se pueden utilizar en el tratamiento de carcinoma asociado a virus, tal como cáncer hepatocelular.

Usos de precursores de ARN manipulados genéticamente para inducir ARNi

Los precursores de ARN manipulados genéticamente, introducidos en células u organismos completos como se describe en el presente documento, conducirán a la producción de una molécula deseada de ARNpi. Tal molécula de ARNpi se asociará entonces con componentes de proteína endógena de la ruta de ARNi para enlazarse con y manipular

una secuencia específica de ARNm para escisión y destrucción. De esta manera, el ARNm que va a ser manipulado por el ARNpi generado a partir del precursor de ARN manipulado genéticamente será eliminado de la célula u organismo, lo que conduce a una disminución en la concentración de la proteína codificada por aquel ARNm en la célula u organismo.

Por ejemplo, se puede buscar descubrir una pequeña molécula que reduzca la actividad de una quinasa cuya sobreexpresión conduce a una proliferación celular incontrolada. Esta quinasa es sobreexpresa en una variedad de células cancerosas. Una cuestión clave es determinar si la disminución o no de la actividad de esta quinasa en mamíferos adultos tendría efectos nocivos inesperados. Mediante la expresión de un precursor de ARN manipulado genéticamente que dirige la destrucción mediante la ruta del ARNi del ARNm que codifica la quinasa a través de los tejidos de un ratón adulto, se pueden determinar los efectos nocivos de tal fármaco potencial. Es decir, el método descrito en el presente documento permitirá una evaluación a la rápida de la idoneidad de la quinasa como un fármaco objetivo.

Las nuevas moléculas de ácido nucleico que codifican a los precursores de ARN manipulados genéticamente también pueden ser usadas para crear grandes cantidades de células o vectores en microarreglos en los que cada célula o vector en el arreglo incluye moléculas de ácido nucleico que codifican un precursor de ARN manipulado genéticamente que es específico para un gen objetivo diferente. Véase, por ejemplo, Ziauddin y colaboradores, Nature, 411: 107-110 (2001).

Ejemplos

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplo 1 - Producción de un precursor de ARN manipulado genéticamente

Para producir un precursor de ARN manipulado genéticamente que manipulará un gen para la escisión de la luciferasa de luciérnaga, se examinó la secuencia de la porción de codificación del ARNm de luciferasa de luciérnaga para seleccionar una secuencia adecuada. En una posición a más de 100 nucleótidos, pero a menos de 300 nucleótidos, 3' del inicio de la traducciónn, se encontró la secuencia CGUACGCGGAAUACUUCGAUU (SEQ ID NO: 16) inmediatamente después de la secuencia de AA. Ya que esta secuencia cumple los criterios para la selección de un ARNpi, se escogió. Se diseñó luego un ARN precursor manipulado genéticamente que incluye esta secuencia (subrayada) como la representa a continuación (y mostrada en la figura 2B):

5′-

GGCAAACGUACGCGGAAUACUUCGAUUAGUAAUUACACAUCAUAA-

UCGAAG UAUUCCGCGUACGUUUGCU-3′ (SEQ ID NO:2)

Se prepararon secuencias sintéticos de desoxioligonucleótidos que sirven como una plantilla de transcripción *in vitro* para preparar este precursor de ARN manipulado genéticamente usando la enzima T7 ARN polimerasa de acuerdo con los protocolos publicados. A continuación se muestran los dos desoxioligonucleótidos. Los oligonucleótidos contienen la secuencia del promotor de T7 ARN Polimerasa (subrayado en la cadena superior) para facilitar la transcripción *in vitro* en ARN.

Oligo superior:

5′-

GCGTAATACGACTCACTATAGGCAAACGTACGCGGAATACTTCGAT-

TAGTAATTACACATCATAATCGAAGTATTCCGCGTACGTTTGCT-3′ (SEQ ID NO:17)

oligo inferior:

5′-

TGTAGTCACGTACGCGGAATACTTCGAAGAAACGAGTAATTACTAAAT-

CGAA GTATTCCGCGTACGTTTGCCTATAGTGAGTCGTATTACGC-3′ (SEQ ID NO:18)

A continuación, se formó el ADN bicatenario por hibridación de los dos desoxioligonucleótidos y se transcribieron en ARN utilizando T7 ARN polimerasa. El precursor resultante de ARN manipulado genéticamente se purificó por medios

estándar, y después se analizó su capacidad para promover la escisión del ARNm objetivo *in vitro* en una reacción estándar de ARNi.

En resumen, se preparó ARNm de luciferasa de luciérnaga por transcripción *in vitro* y se marcó en forma radioactiva usando α-^{32}P-GTP y guanililo transferasa como se describió previamente (Tuschl *et al*., (1999) citado anteriormente) para generar un ARNm objetivo marcado en forma radiactiva. El ARNm objetivo marcado en forma radiactiva se incubó en una reacción estándar *in vitro* de ARNi con lisado de embriones de *Drosophila* y precursor de ARN manipulado genéticamente 50 nM (ESP) durante 0 y 3 horas como se describió previamente (Tuschl *et al*., (1999) citado anteriormente). Los productos de reacción fueron aislados y se analizados mediante electroforesis en gel desnaturalizante de acrilamida tal como se describió anteriormente (Zamore *y colaboradores,* (2000) citado anteriormente). Como se muestra en la figura. 3, el precursor de ARN manipulado genéticamente indujo la escisión específica de la secuencia del ARNm objetivo radiactivo (producto de escisión 5'). Por lo tanto, se demostró que el precursor media ARNi. La Figura 3 también muestra el producto de escisión de ARN de una ARNpi estándar (también incubada durante 0 y 3 horas), que produjo el mismo producto de escisión 5' específico de la secuencia como el ESP.

Ejemplo 2 – Los ARN precursores *let-7* manipulados genéticamente activan asimétricamente ARN *in vitro*

Se prepararon dos precursores de ARN *let-7* (ESP) manipulados genéticamente en los cuales se alteró el tallo de pre-let-7 (Fig. 4B y 4C) para contener una secuencia complementaria a la luciferasa de luciérnaga. Debido a que la mayoría de los ARNpt comienzan con uracilo, los ESP se diseñaron para que la secuencia complementaria de la luciferasa (luciferasa antisentido) comenzara con U. Ya que los ARNpt pueden ser codificados ya sea en el lado 5' o en lado 3' de la horquilla del precursor (por ejemplo, en cualquiera de los tallos) se colocó la secuencia de la luciferasa de antisentido (en negrita) en el lado 3' de tallo en un ESP (3' ESP) (Fig. 4B) y en el lado 5' en el segundo tallo (5' ESP) (Fig. 4C).

Se prepararon los ARN de ESP como se describe en forma general en el Ejemplo 1 mediante el uso de los siguientes pares de oligonucleótido de ADN para generar plantillas de transcripción T7 ARN polimerasa parcialmente bicatenarias:

5'-GTAATACGACTCACTATAG-3 '(SEQ ID NO: 19)

5´-

GGCAAATTCGAAGTATTCCGCGTACGTGATGATGTGTAATTACTCACG

TACGCGGAATACTTCGAATTTGCCTATAGTGAGTCGTATTAC-3´ (5´ ESP)

(SEQ ID NO:20)

5´-

GGCAAATCGTACGCGGAATACTTCGAAAATGATGTGTAATTACTTTTC

GAAGTATTCCGCGTACGATTTGCCTATAGTGAGTCGTATTAC-3´ (3´ ESP)

(SEQ ID NO:21)

El ARN objetivo antisentido de luciferasa de luciérnaga se ha descrito previamente (A. Nykänen, B. Haley, P.D. Zamore, Cell 107, 309, 2001).

La capacidad de cada ESP para dirigir un ARNi específico de luciferasa en una reacción *in vitro* fue probada contra un ARNm objetivo (que se muestra esquemáticamente en la Fig. 4D) que contenía una porción del ARNm de luciferasa de luciérnaga y una secuencia totalmente complementaria a *let-7* (el objetivo se construyó mediante técnicas estándar y se sintetizó utilizando T7 ARN polimerasa). Como control, se usó un dúplex de ARNpi que contiene la secuencia antisentido de luciferasa (Fig. 4A).

La Figura 4E es una autorradiografía que muestra los resultados de un ensayo para determinar si los ESP 5' y 3' pueden promover igualmente la escisión del ARN objetivo *in vitro* (las condiciones del ensayo se describen en el Ejemplo 1, excepto que los ESP y el control se incubaron durante 0 y 2 horas). Tanto los ESP 3' y el 5' dirigieron la escisión del ARN objetivo dentro de las secuencias de luciferasa, el mismo sitio escindido cuando se programó la reacción de ARNi con el ARNpi de control.

Ejemplo 3 - Preparación de un transgén que codifica un precursor de ARN manipulado genéticamente

Para preparar un transgén que codifica un precursor manipulado genéticamente para dirigir la destrucción del ARNm de luciferasa en una ratón transgénico que expresa ARNm de luciferasa de luciérnaga en todas sus células, se clona la secuencia del precursor de ARN manipulado genéticamente descrito en el Ejemplo 1 mediante métodos estándar de ADN recombinante en una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un vector que contiene una secuencia de promotor

expresada constitutivamente y la secuencia deseada de ácido nucleico (transgén) que codifica al precursor de ARN manipulado genéticamente como se ilustra en la Figura 5. Este vector también contendrá secuencias apropiadas para su introducción en células ES para producir ratones transgénicos mediante métodos estándar. El transgén resultante expresa al precursor de ARN manipulado genéticamente en todas las células de un ratón transgénico.

El ARN precursor manipulado genéticamente es luego procesado por Dicer y otros componentes de la maquinaria del ARNi para producir un ARNpi dirigido contra el gen de la luciferasa de luciérnaga. Este ARNpi dirige la escisión del ARNm de luciferasa, lo que resulta en una disminución en la expresión de ARNm de luciferasa en las células del animal.

Se pueden usar los mismos métodos para silenciar otros genes objetivo, ya sea utilizando sistemas de expresión expresados constitutivamente o inducibles en una variedad de animales transgénicos.

Otras realizaciones

Se entiende que aunque la invención ha sido descrita junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método no terapéutico de inducción de interferencia de ácido ribonucleico (ARNi) de un gen objetivo en una célula, utilizando un molécula de ácido nucleico aislado que comprende

una secuencia reguladora operativamente enlazada a una secuencia de ácido nucleico que codifica un precursor de ácido ribonucleico (ARN) manipulado genéticamente, en donde el precursor comprende

(i) una primera porción de tallo que comprende una secuencia de 18 a 30 nucleótidos que es totalmente complementaria a una secuencia de un ARN mensajero (ARNm) del gen objetivo;

(ii) una segunda porción de tallo que comprende una secuencia de 18 a 30 nucleótidos que es suficientemente complementaria a la primera parte de tallo para hibridar con la primera porción de tallo para formar un tallo dúplex; y

(iii) una porción de bucle de 4 a 20 nucleótidos que conecta las dos porciones de tallo.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la segunda porción de tallo es totalmente complementaria a la primera porción de tallo.

3. El método de la reivindicación 1, en donde la primera porción de tallo se localiza en un extremo 5' del precursor de ARN.

4. El método de la reivindicación 1, en donde la primera porción de tallo se localiza en un extremo 3' del precursor de ARN.

5. El método de la reivindicación 1, en donde la porción del bucle comprende al menos 7 nucleótidos.

6. El método de la reivindicación 1, en donde la porción del bucle comprende 11 nucleótidos.

7. El método de la reivindicación 1, en donde la secuencia del ARNm se localiza desde 100 a 300 nucleótidos 3' del inicio de la traducción del ARNm.

8. El método de la reivindicación 1, en donde la secuencia del ARNm se localiza en una región no traducida 5' (UTR) o una 3' UTR del ARNm.

9. El método de la reivindicación 1, en donde la primera y segunda porciones de tallo comprenden cada una 21 a 28 nucleótidos.

10. El método de la reivindicación 1, en donde la primera y segunda porciones de tallo comprenden cada una el mismo número de nucleótidos.

11. El método de la reivindicación 1, en donde una entre la primera y la segunda porciones de tallo comprende de 1 a 4 nucleótidos más que la otra porción de tallo.

12. El método de la reivindicación 1, en donde la secuencia reguladora comprende un promotor Pol III o Pol II.

13. El método de la reivindicación 1, en donde la secuencia reguladora es constitutiva o inducible.

14. El método de la reivindicación 1, en donde la secuencia del precursor de ARN manipulado genéticamente es la secuencia expuesta en las SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 5, 8, o 9.

15. El método de la reivindicación 1, que comprende la secuencia expuesta en las SEQ ID NOs: 10, 11, 17, 18, 20, o 21, o un complemento de las mismas.

16. Un método de cualquier reivindicación precedente, en donde la molécula de ácido nucleico está comprendida en un vector.

17. El método de la reivindicación 16, en donde el vector es un vector plásmido o viral.

18. El método de la reivindicación 17, en donde el vector viral es un vector retroviral.

19. El método de la reivindicación 1, en donde la molécula de ácido nucleico está contenida en una célula huésped.

20. El método de la reivindicación 19, en donde la célula es una célula de mamífero.

21. Un método no terapéutico de inducir interferencia de ácido ribonucleico (ARNi) de un gen objetivo en una célula, utilizando una precursor de ARN manipulado genéticamente que comprende

(i) una primera porción de tallo que comprende una secuencia de 18 a 30 nucleótidos que es totalmente complementaria a una secuencia de un ARN mensajero (ARNm) del gen objetivo;

(ii) una segunda porción de tallo que comprende una secuencia de 18 a 30 nucleótidos que es suficientemente complementaria a la primera porción de tallo para hibridar con la primera porción de tallo para formar un tallo dúplex; y

(iii) una porción de bucle de al menos 4 a 20 nucleótidos que conecta las dos porciones de tallo.

22. El método de la reivindicación 21, en donde la segunda porción de tallo es totalmente complementaria a la primera porción de tallo.

23. El método de la reivindicación 21, en donde la primera parte de tallo se localiza en un extremo 5' del precursor de ARN.

24. El método de la reivindicación 21, en donde la primera porción de tallo se encuentra en un extremo 3' del precursor de ARN.

25. El método de la reivindicación 21, en donde la porción de bucle comprende al menos 7 nucleótidos.

26. El método de la reivindicación 21, en donde la porción de bucle comprende 11 nucleótidos.

27. El método de la reivindicación 21, en donde la secuencia del ARNm se localiza en una región no traducida 5' (UTR) o una 3' UTR del ARNm.

28. El método de la reivindicación 21, en donde la primera y segunda porciones de tallo comprende cada una 21 a 28 nucleótidos.

29. El método de la reivindicación 21, en donde la primera y segunda porciones de tallo comprenden cada una el mismo número de nucleótidos.

30. El método de la reivindicación 21, en donde una entre la primera y la segunda porciones de tallo comprende de 1 a 4 nucleótidos más que la otra porción de tallo.

31. El método de la reivindicación 21, que comprende la secuencia expuesta en las SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 5, 8, o 9.

32. El método de la reivindicación 21, en donde el gen objetivo es un gen humano.

33. El método de la reivindicación 21, en donde el gen objetivo es un gen humano mutante.

34. El método de la reivindicación 21, en donde el gen objetivo es un gen viral.

35. Un método de inducción de interferencia de ácido ribonucleico (ARNi) de un gen objetivo en una célula en un animal, comprendiendo el método

la obtención de un animal no humano transgénico, una o más de cuyas células comprende un transgén que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 en la cual la secuencia reguladora es un promotor inducible, en donde el transgén se expresa en una o más células del animal transgénico dando como resultado el animal que exhibe interferencia de ácido ribonucleico (ARNi) del gen objetivo por el precursor de ARN manipulado genéticamente; y

la inducción de la célula para expresar el precursor para formar un ácido ribonucleico pequeño de interferencia (ARNpi) dentro de la célula, induciendo con así ARNi del gen objetivo en el animal.

36. El método de la reivindicación 35, en donde el transgén se expresa en una o más células cardiacas, linfocitos, células hepáticas, células endoteliales vasculares, o células de bazo.

37. El método de la reivindicación 35, en donde la secuencia reguladora es constitutiva o inducible.

38. El método de la reivindicación 35, en donde la secuencia reguladora es específica de tejido.

39. El método de la reivindicación 35, en donde la secuencia reguladora es un promotor Pol II o Pol III.

40. El método de la reivindicación 35, en donde la secuencia reguladora es una secuencia exógena.

41. El método de la reivindicación 35, en donde el animal es un primate no humano.

42. El método de la reivindicación 35, en donde el animal es un roedor.

43. El método de la reivindicación 35, en donde el animal es un ratón.

44. Un método de inducción de interferencia de ácido ribonucleico (ARNi) de un gen objetivo en una célula, comprendiendo el método

la obtención de una célula huésped derivada de un animal no humano transgénico como se define en la reivindicación 35;

el cultivo de la célula; y

permitir que la célula exprese al precursor de ARN para formar un ácido ribonucleico pequeño de interferencia (ARNpi) dentro de la célula, induciendo así ARNi del gen objetivo en la célula.

45. Un precursor de ARN manipulado genéticamente que comprende

(i) una primera porción de tallo que comprende una secuencia de 18 a 30 nucleótidos que es totalmente complementaria a una secuencia de un ARN mensajero (ARNm) del gen objetivo;

(ii) una segunda porción de tallo que comprende una secuencia de 18 a 30 nucleótidos que es suficientemente complementaria a la primera porción de tallo para hibridar con la primera porción de tallo para formar un tallo dúplex; y

(iii) una porción de bucle de al menos 4 a 20 nucleótidos que conecta las dos porciones de tallo;

en donde el gen objetivo se selecciona de ras activado, p53, BRCA-1, BRCA-2, superóxido dismutasa 1, huntingtina y parkina.

46. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende

una secuencia reguladora operativamente enlazada a una secuencia de ácido nucleico que codifica un precursor de ácido ribonucleico (ARN) manipulado genéticamente , en donde el precursor comprende

(i) una primera porción de tallo que comprende una secuencia de 18 a 30 nucleótidos que es totalmente complementaria a una secuencia de un ARN mensajero (ARNm) del gen objetivo;

(ii) una segunda porción de tallo que comprende una secuencia de 18 a 30 nucleótidos que es suficientemente complementaria a la primera porción de tallo para hibridar con la primera porción de tallo para formar un tallo dúplex; y

(iii) una porción de bucle de 4 a 20 nucleótidos que conecta las dos porciones de tallo,

en donde el gen objetivo se selecciona de ras activado, p53, BRCA-1, BRCA-2, superóxido dismutasa 1, huntingtina y parkina.

FIG. 1

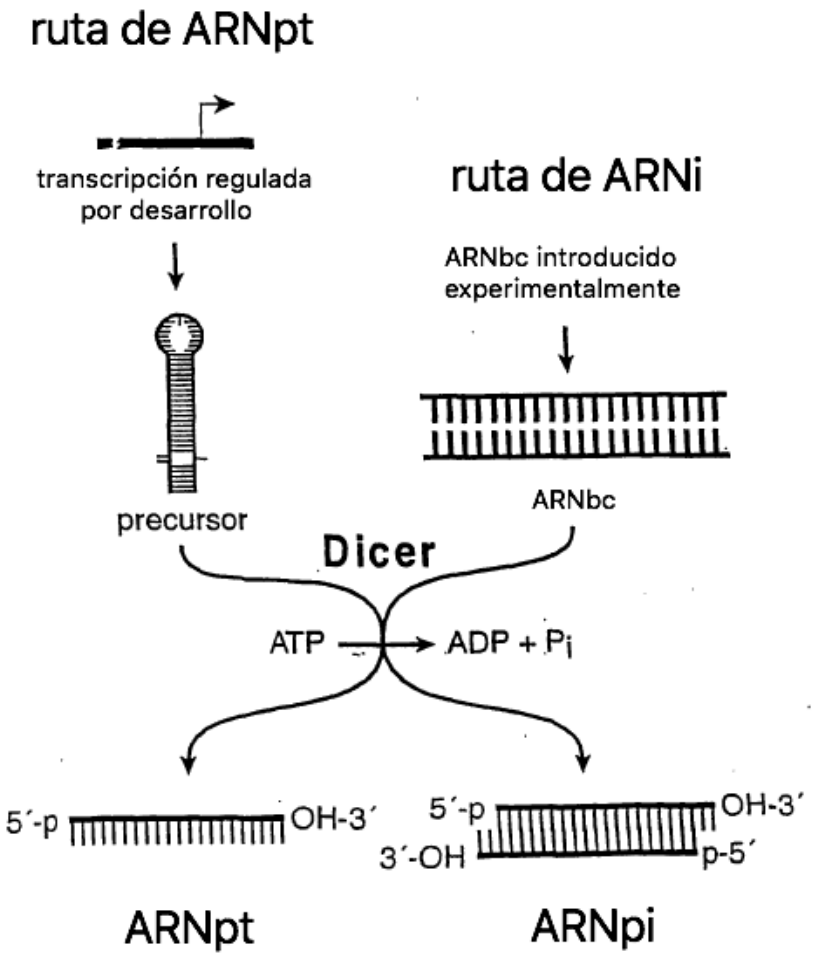
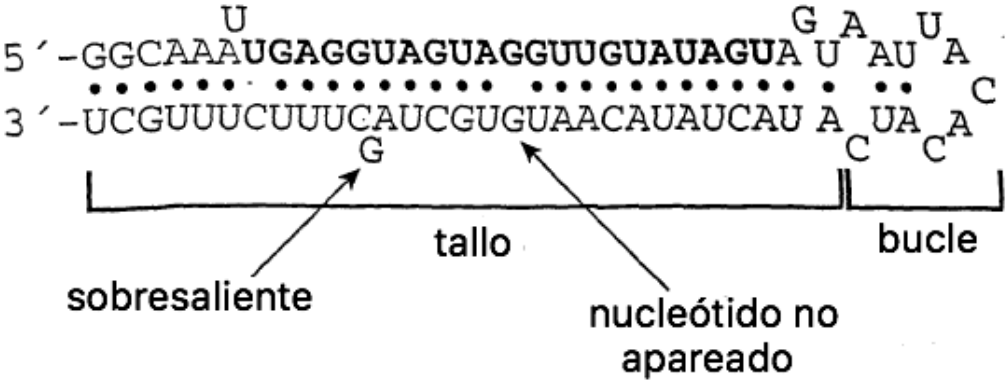
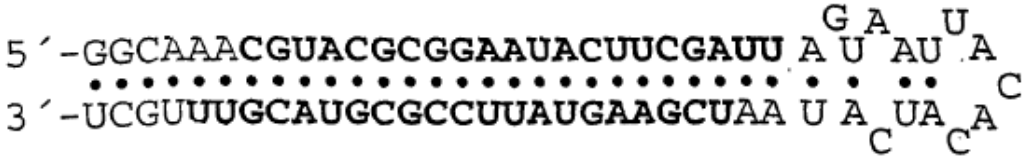

ruta de ARNpt
transcripción regulada por desarrollo
precursor
ruta de ARNi
ARNbc introducido experimentalmente
ARNbc
Dicer
ATP
ADP + Pi
5´-p
OH-3´
5´-p
OH-3´
3´-OH
p-5´
ARNpt
ARNpi

FIG. 2A



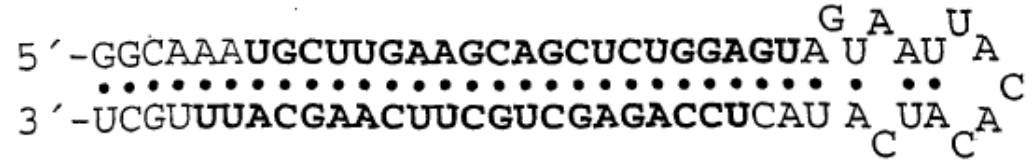
(SEQ ID NO:1)

FIG. 2B



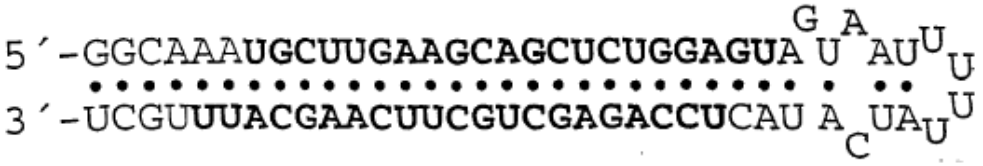
(SEQ ID NO:2)

FIG. 2C



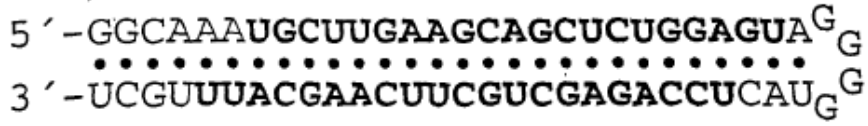
(SEQ ID NO:3)

FIG. 2D



(SEQ ID NO:4)

FIG. 2E



(SEQ ID NO:5)

FIG. 3

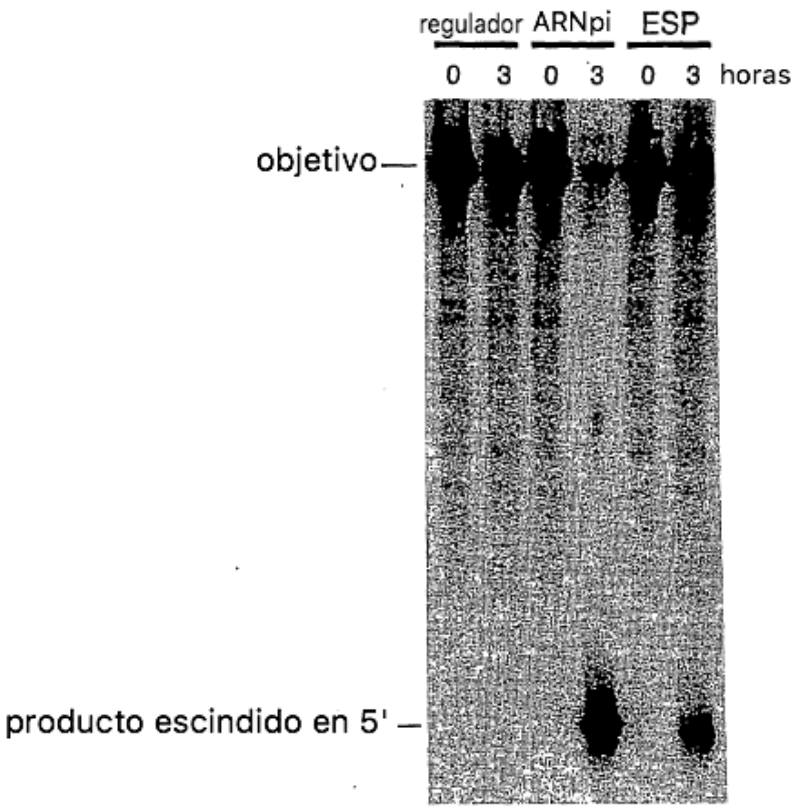

regulador
ARNpi
ESP
0 3 0 3 0 3 horas
objetivo
producto escindido en 5'

FIG. 4D

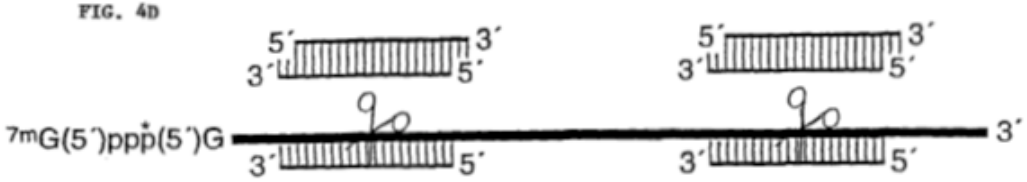


FIG. 4A

ARNpi

5´-UCGAAGUAUUCCGCGUACGUG-3´ (SEQ ID NO:6)
3´-UUAGCUUCAUAAGGCGCAUGC-5´ (SEQ ID NO:7)

precursores de ARNpt manipulados genéticamente

5´-GGCAAAUCGUACGCGGAAUACUUCGAAAA U AU A C
3´-CCGUUUAGCAUGCGCCUUAUGAAGCUUUU A UA A
(SEQ ID NO:8)

FIG. 4B

5´-GGCAAAUUCGAAGUAUUCCGCGUACGUGA U AU A C
3´-CCGUUUAAGCUUCAUAAGGCGCAUGCACU A UA A
(SEQ ID NO:9)

FIG. 4C

FIG. 4E

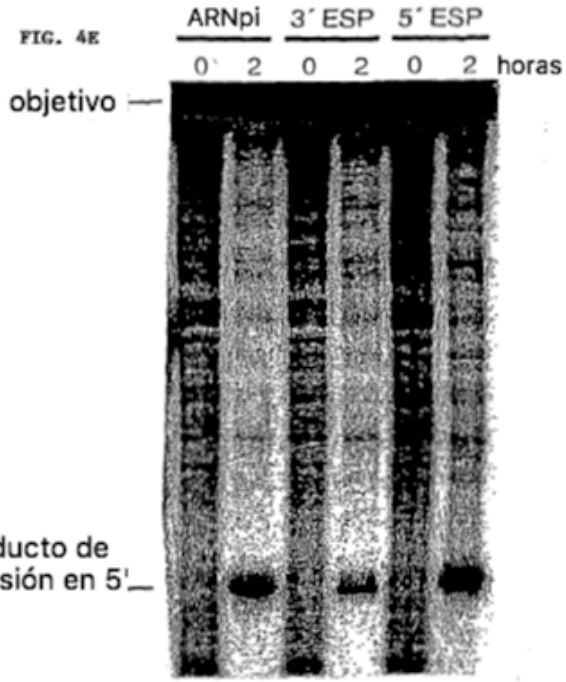
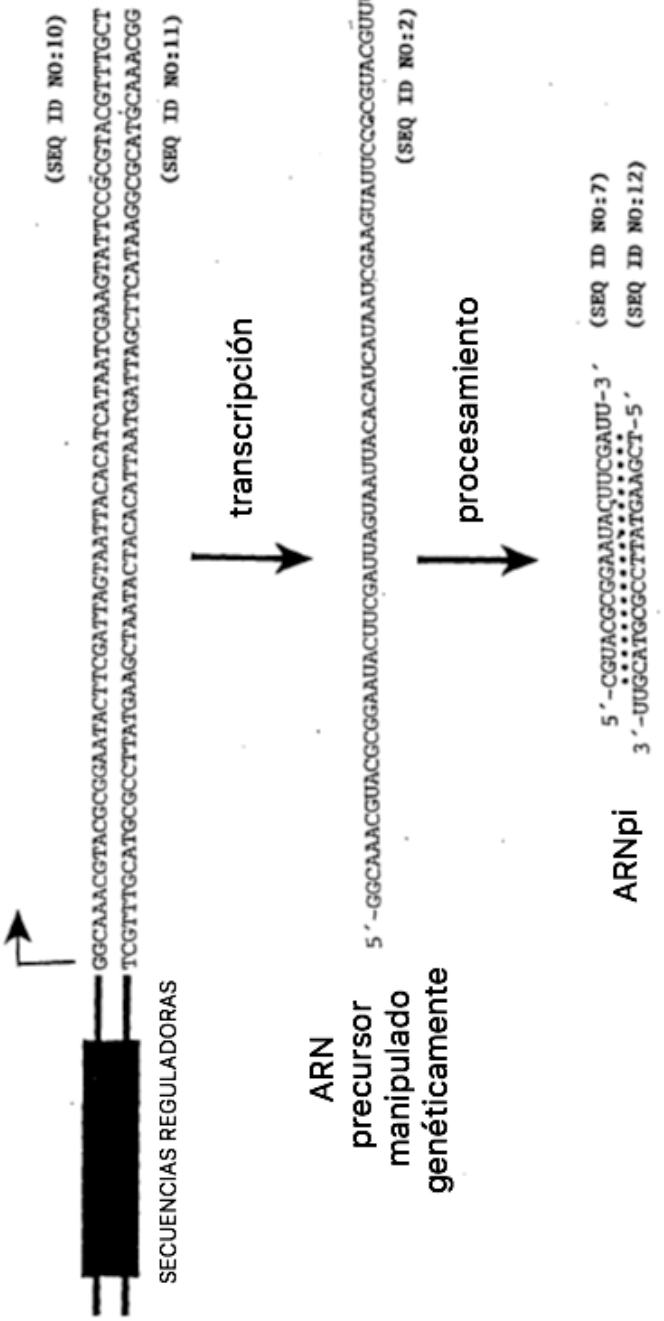


FIG. 5


(SEQ ID NO:10)
GGCAAACGTACGCGGAATACTTCGATTAGTAATTACACATCATAATCGAAGTATTCCGCGTACGTTTGCT
TCGTTTGCATGCGCCTTATGAAGCTAATACTACACATTAATGATTAGCTTCATAAGGCGCATGCAAACGG
(SEQ ID NO:11)
SECUENCIAS REGULADORAS
transcripción
ARN precursor manipulado genéticamente
5'-GGCAAACGUACGCGGAAUACUUCGAUUAGUAAUUACACAUCAUAAUCGAAGUAUUCCGCGUACGUUUGCU-3'
(SEQ ID NO:2)
procesamiento
ARNpi
5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAUU-3' (SEQ ID NO:7)
3'-UUGCATGCGCCTTATGAAGCT-5' (SEQ ID NO:12)