



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată  
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: 145344

(22) Data de depozit: 14.12.1988

(30) Prioritate: 15.12.1987 AU PI 5911/87;  
19.08.1988 AU PI 9950/88;  
09.09.1988 AU PJ 0353/88;  
04.11.1988 AU PJ 1304/88;  
07.11.1988 AU PJ 1333/88;

(41) Data publicării cererii:  
BOPI nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:  
30.04.1999 BOPI nr. 4/1999

(45) Data eliberării și publicării brevetului:  
BOPI nr.

(61) Perfecționare la brevet:  
Nr.

(62) Divizată din cererea:  
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:  
Nr. AU 88 / 00478 14.12.1988

(87) Publicare internațională:  
Nr. WO 89/05852 29.06.1989

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
WO/04300

(71) Solicitant: GENE SHEARS PTY. LIMITED- C/- MACPHILLAMY, CUMMINS & GIBSON, CANBERRA, ACT, AU;

(73) Titular: GENE SHEARS PTY. LIMITED- C/- MACPHILLAMY, CUMMINS & GIBSON, CANBERRA, ACT, AU;

(72) Inventatori: HASELOFF JAMES PHILLIP, O'CONNOR, AUSTRALIAN CAPITAL TERRITORY, AU; GERLACH WAYNE LYLE, HUGHES, AUSTRALIAN CAPITAL TERRITORY, AU; JENNINGS PHILIP ANTHONY, CHATSWOOD, NEW SOUTH WALES, AU; CAMERON FIONA HELEN, FORESTVILLE, NEW SOUTH WALES, AU;

(74) Mandatar: ROMINVENT S.A. (AGENȚIE PENTRU BREVETE, DESENE, MĂRCI ȘI TRANSFER TEHNOLOGIE) BUCUREȘTI

(54) **COMPUS OLIGORIBONUCLEOTIDIC, PROCEDEU DE  
PREPARARE ȘI METODĂ DE INACTIVARE**

(57) **Rezumat:** Compusul oligoribonucleotidic, din prezenta invenție, cuprinde o regiune de hibridizare cuprinzând unul sau mai multe brațe formate dintr-un unic fascicul de ARN și având o secvență complementară la cel puțin o parte a țintei ARN, respectivul braț sau respectivele brațe fiind asociate cu o zonă catalitică capabilă să scindeze respectiva țintă, și acolo unde regiunea de hibridizare cuprinde un singur braț de ARN, respectivul braț conține cel puțin 9 nucleotide, iar acolo unde regiunea de hibridizare cuprinde două sau mai multe brațe de ARN, totalul nucleotidelor în respectivele brațe este mai mare de 9 nucleotide. Procedul de obținere

a produsului cuprinde etapele de: a) legare într-un vector de transfer cuprins în ADN, ARN sau o combinație a acestora, a unei secvențe nucleotidice corespunzând compusului respectiv; b) transcripția secvenței nucleotidice din etapa (a) cu o ARN polimerază; c) recuperarea compusului. Metoda de inactivare cuprinde contactarea ARN țintă din celulă cu compusul care este capabil să interacționeze, prin împerechere de baze, cu secvența ARN țintă în astfel de condiții, încât compusul interacționează stabil, prin împerechere de baze cu ARN țintă, iar ARN țintă este scindat.

Revendicări: 15  
Figuri: 17

RO 114469 B1



Prezenta invenție se referă la un compus oligoribonucleotidic care posedă o înaltă activitate specifică ribonucleazică, la un procedeu de preparare a acestui compus, precum și la o metodă de inactivare a ARN țintă într-o celulă, prin utilizarea acestui compus.

Este cunoscut un număr de molecule ARN existente în natură, ca de exemplu, virusul de avocado pătat (ASBV), ARN-urile satelite din virusul cu spoturi inelare a tutunului (STObRV) și din virusul tranzitoriu striat al lucernei (sLTSV), care suferă o scindare autocatalizată. Astfel de scindări apar ca o parte esențială și unică a duratei ciclului acestor tipuri de ARN sau a altora.

Toate reacțiile de scindare autocatalitice ale ARN-ului necesită prezența unor ioni de metale bivalente și un pH neutru sau alcalin și aceste duc la obținerea de ARN cu grupări terminale 5'-hidroxil și 2',3'-fosfat ciclic (așa cum este cunoscut din literatura de specialitate). Reacțiile sunt catalizate chiar de ARN-uri, probabil ca rezultat al conformației care aduce grupări reactive în imediata apropiere. Pozițiile scindării autocatalitice a ARN-urilor de proveniență naturală sunt localizate în interiorul regiunilor celor mai bine conservate ale structurii secundare a ARN-ului (de asemenea cunoscut din literatura de specialitate).

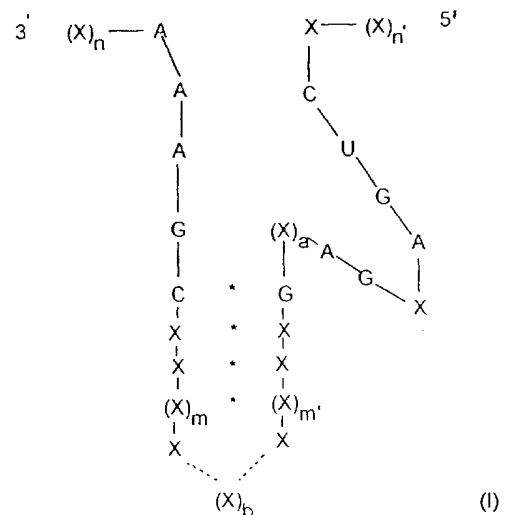
Experimentele făcute pe ARN-urile satelite din virusul cu spoturi inelare ale tutunului (sTobRV) au dus la desemnarea unor noi endoribonucleaze (pe care le vom denumi în cele ce urmează "ribozime"), acestea fiind enzime conținute în ARN, care catalizează scindarea catalitică a moleculelor țintă de ARN.

Termenul de ribozime, așa cum se specifică că este utilizat în descriere, se referă la moleculele cuprinzând în întregime ARN-ul sau derivații acestuia.

Ribozimele, din prezenta invenție, sunt diferite de ARN endoribonuclează care se găsește în mod normal în *Tetrahymena Thermophila* (cunoscută ca IVS, sau L-19 IVS ARN) și care a fost descrisă pe larg de Thomas Cech și colaboratori. Endoribonucleaza Cech are un oc-

tet de baze perechi într-un situs activ care hibridizează într-o secvență de ARN țintă, după care are loc scindarea țintei ARN, cu o cerință pentru guanozină sau derivați de guanozină liberi. Fragmentele rezultate din scindare conțin grupări terminale 5'-fosfat și 3'-hidroxil. Numărul limitat de nucleotide disponibile pentru hibridizarea la un substrat ARN limitează eficacitatea și eficiența endoribonucleazei Cech ca și în general, oligonucleotidele conținând mai puțin de douăsprezece nucleotide care hibridizează în mică măsură la secvențele țintă. De asemenea, reiese că situsul activ a endoribonucleazei Cech este necesar să fie conservat cu un număr de nucleotide pentru eficiența activității endoribonucleazei. Acest lucru restrânge numărul permutărilor secvențelor de situs activ care pot fi îndreptate spre efectuarea hibridizării la secvențele țintă, astfel restrângând seria secvențelor de ARN țintă scindabile de către endoribonucleaza Cech. Endoribonucleaza Cech modifică, de asemenea ARN-ul, prin adăugarea unei guanozine nucleotide libere la poziția finală 5' a ARN-ului scindat.

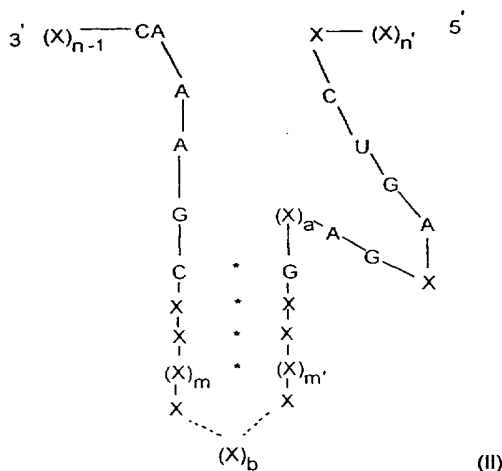
Compusul oligoribonucleotidic din prezenta invenție are formula generală I:



în care: fiecare X reprezintă o ribonucleotidă care poate fi aceeași sau diferită; în care fiecare  $(X)_n$  și  $(X)_n$  reprezintă o oligoribonucleotidă (a) aptă de hibridizare cu o secvență de scindare ARN țintă și (b) definită printr-o secvență predeterminată, care nu se leagă covalent în mod firesc la secvențele A-A-A-G-C și, respec-

tiv, X-C-U-G-A-, o astfel de secvență ARN țintă nefiind prezentă în compus; în care fiecare dintre  $n$  și  $n'$  reprezintă un număr întreg care definește numărul de ribonucleotide în oligonucleotidă cu condiția ca suma  $n+n'$  să fie suficientă pentru a permite compusului să interacționeze stabil cu secvența de ARN țintă prin împerecherea de baze; în care fiecare \* reprezintă împerecherea de baze dintre ribonucleotidele localizate de fiecare parte a acestuia; în fiecare linie continuă reprezintă o legătură chimică ce realizează legături covalente între ribonucleotidele localizate pe oricare parte a acestuia; în care  $a$  reprezintă un număr întreg ce definește un număr de ribonucleotidele cu condiția că  $a$  poate fi 0 sau 1 și dacă este 0, atunci A în poziția 5' față de  $(X)_a$  este legat de G în poziția 3' față de  $(X)_a$ ; în care fiecare dintre  $m$  și  $m'$  reprezintă un număr întreg care este mai mare sau egal cu 1; în care fiecare dintre liniile punctate reprezintă independent, fie o legătură chimică realizând legături covalente între ribonucleotidele dispuse de fiecare parte a acestuia, fie lipsa unei astfel de legături chimice; și în care  $(X)_b$  reprezintă o oligoribonucleotidă, care poate fi prezentă sau absentă, cu condiția că  $b$  reprezintă un număr întreg mai mare sau egal cu 2 dacă  $(X)_b$  este prezent.

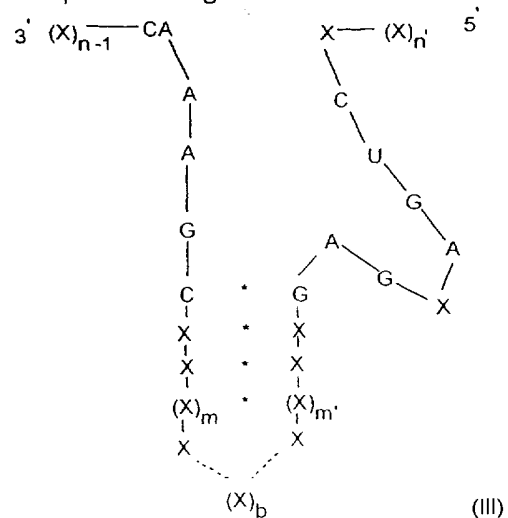
Compusul oligoribonucleotidic din prezenta invenție poate avea și formula generală II:



în care: fiecare X reprezintă o ribonucleotidă care poate fi aceeași sau diferită; în care fiecare  $(X)_{n-1}$  și  $(X)_{n'}$ , reprezintă o oligoribonucleotidă (a) aptă de hibridizare cu o secvență de scindare ARN

țintă și (b) definită printr-o secvență predeterminedă, care secvență nu poate forma firesc o legătură covalentă la secvențele C-A-A-A-G-C și, respectiv, X-C-U-G-A-, o astfel de secvență ARN țintă nefiind prezentă în compus; în care fiecare dintre  $n$  și  $n'$  reprezintă un număr întreg care definește numărul de ribonucleotide în oligonucleotidă cu condiția ca suma  $n+n'$  să fie suficientă pentru a permite compusului să interacționeze stabil cu secvența de ARN țintă prin împerecherea de baze; în care fiecare \* reprezintă împerecherea de baze dintre ribonucleotidele localizate de fiecare parte a acestuia; în care fiecare linie continuă reprezintă o legătură chimică ce realizează legături covalente între ribonucleotidele localizate pe oricare parte a acestuia; în care  $a$  reprezintă un număr întreg ce definește un număr de ribonucleotidele cu condiția că  $a$  poate fi 0 sau 1 și dacă este 0, atunci A în poziția 5' față de  $(X)_a$  este legat de G în poziția 3' față de  $(X)_a$ ; în care fiecare dintre  $m$  și  $m'$  reprezintă un număr întreg care este mai mare sau egal cu 1; în care fiecare dintre liniile punctate reprezintă independent, fie o legătură chimică, care realizează legături covalente între ribonucleotidele dispuse de oricare parte a acestuia, fie lipsa unei astfel de legături chimice; și în care  $(X)_b$  reprezintă o oligoribonucleotidă, care poate fi prezentă sau absentă, cu condiția că,  $b$  reprezintă un număr întreg mai mare sau egal cu 2 dacă  $(X)_b$  este prezent.

De asemenea, compusul oligoribonucleotidic din prezenta invenție poate avea și formula generală III:



5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

(III)

în care: fiecare  $X$  reprezintă o ribonucleotidă care poate fi aceeași sau diferită; în care fiecare  $(X)_{n-1}$  și  $(X)_{n'}$  reprezintă o oligoribonucleotidă (a) aptă de hibridizare cu o secvență de scindare ARN țintă și (b) definită printr-o secvență predeterminată care secvență nu poate forma, în mod firesc, o legătură covalentă la secvențele C-A-A-G-C și, respectiv, X-C-U-g-A-, o astfel de secvență țintă ARN nefiind prezentă în compus; în care fiecare dintre  $n$  și  $n'$  reprezintă un număr întreg, care definește numărul de ribonucleotide în oligonucleotidă cu condiția ca suma  $n+n'$  să fie suficientă pentru a permite compusului să interacționeze stabil cu secvența de ARN țintă prin împerecherea de baze; în care fiecare \* reprezintă împerecherea de baze dintre ribonucleotidele localizate de fiecare parte a acestuia; în fiecare linie continuă reprezintă o legătură chimică ce realizează legături covalente între ribonucleotidele localizate pe oricare parte a acestuia; în care fiecare dintre  $m$  și  $m'$  reprezintă un număr întreg, care este mai mare sau egal cu 1; în care fiecare dintre liniile punctate reprezintă independent, fie o legătură chimică realizând legături covalente între ribonucleotidele dispuse de fiecare parte a acestuia, fie lipsa unei astfel de legături chimice; și în care  $(X)_b$  reprezintă o oligoribonucleotidă, care poate fi prezentă sau absentă, cu condiția că  $b$  reprezintă un număr întreg, mai mare sau egal cu 2, dacă  $(X)_b$  este prezent.

Suma  $n+n'$  este mai mare sau egală cu 14 și fiecare  $n$  și  $n'$  este mai mare decât 6. Secvența țintă ARN de scindare este o secvență virală.

Procedeele de obținere a compusului oligoribonucleotidic, conform invenției, cuprinde următoarele etape: a) legare într-un vector de transfer cuprins în ADN, ARN sau o combinație a acestora, a unei secvențe nucleotidice corespunzând compusului respectiv; b) transcripția secvenței nucleotidice din etapa (a) cu o ARN polimerază; și c) recuperarea compusului.

Metoda de inactivare a ARN țintă

într-o celulă, în conformitate cu prezenta invenție, cuprinde contactarea ARN țintă din celulă cu compusul prezentat mai sus, compusul fiind capabil să interacționeze prin împerechere de baze cu secvența ARN țintă în astfel de condiții încât compusul interacționează stabil prin împerechere de baze cu ARN țintă este scindat.

ARN țintă este o transcripție a unei gene care este endogenă față de celulă sau este exogenă față de celulă. Celula este procariotă sau eucariotă și este o celulă vegetală sau animală. Celula vegetală este o componentă a unei plante și compusul este format în interiorul celulei sau în exteriorul celulei.

Prin contrast, ribozimele din prezenta invenție hibridizează eficient într-o mare varietate de secvențe ARN țintă, și nu modifică ținta ARN scindată.

Ribozimele din prezenta invenție conțin o porțiune de hibridizare care este complementară cu secvența nucleotidică, cu cel puțin o porțiune din ținta ARN și o zonă catalitică, care este adaptată pentru a scinda ținta ARN. Zona de hibridizare conține 9 sau mai multe nucleotide.

De preferință, ribozimele din prezenta invenție au o regiune de hibridizare cuprinzând unul sau mai multe brațe formate dintr-un unic fascicol de ARN și având o secvență complementară la cel puțin o parte a țintei ARN, respectivul braț sau respectivele brațe fiind asociate cu o zonă catalitică capabilă să scindeze respectiva țintă, și acolo unde regiunea de hibridizare cuprinde un singur braț de ARN, respectivul braț conține cel puțin 9 nucleotide, iar acolo unde regiunea de hibridizare cuprinde două sau mai multe brațe de ARN, totalul nucleotidelor în respectivele brațe este mai mare de 9 nucleotide.

Ribozimele, din prezenta invenție, pot fi preparate prin metode bine cunoscute în tehnica sintezei moleculelor ARN. În particular, ribozimele din această invenție pot fi preparate dintr-o secvență corespunzătoare de ARN (ADN care prin transcriere duce la obținerea unei ribo-

zime, și care poate fi sintetizată, conform metodelor bine cunoscute, în tehnica sintezei ADN] legat chimic de ARN polimerază, ca de exemplu, un promotor pentru T7 ARN polimerază sau SP6 ARN polimerază. O secvență ADN, corespunzând unei ribozime, din prezenta invenție, poate fi ligată dintr-un vector de transfer ADN, ca ADN plasmide sau ADN bacteriofag. Acolo unde vectorul de transfer conține un promotor ARN polimerază legat la ADN-ul corespunzător unei ribozime, ribozima poate fi obținută, în mod convenabil, prin incubare cu o ARN polimerază. Ribozimele pot fi prin urmare obținute, *in vitro*, prin incubarea ARN polimerazei cu un promotor ARN polimerază legat la ADN-ul corespunzător unei ribozime, în prezență de ribonucleotide. *In vivo*, celulele procariotice sau eucariotice (incluzând celulele mamifere și celulele de plante) pot fi transfectate cu un vector de transfer adecvat conținând material genetic corespunzând unei ribozime în concordanță cu prezenta invenție, legat la un promotor ARN polimerază astfel că, ribozima este transcrisă în celula gazdă. Vectorii de transfer pot fi: plasmide bacteriale sau ARN sau ADN viral. Secvențele nucleotidice corespunzând ribozimelor sunt, în general, plasate sub controlul unor promotori puternici ca, de exemplu, impur, SV40 întârziat, SV40 timpuriu, metalotionină, sau promotor  $\lambda$ . Ribozimele pot fi direct transcrise *in vivo*, de la un vector de transfer, sau la alegere pot fi transcrise ca parte a unei molecule ARN mai mari. De exemplu, ADN corespunzând secvenței de ribozimă poate fi legat la capătul 3' al unei gene purtătoare cum ar fi, de exemplu, după o translație stop-signal și moleculele ARN mai mari pot ajuta la stabilizarea moleculelor de ribozimă împotriva digestiei de nuclează în interiorul celulelor. La translație, gene purtătoare pot face să crească o proteină a cărei prezență poate fi direct analizată, de exemplu, prin reacția enzimatică. Gena purtătoare poate, de exemplu, codifica o enzimă.

Suplimentar, invenția prevede un

vector de transfer ADN, care conține o secvență ADN corespunzând unei ribozime legate de un promotor pentru a preveni transcrierea ribozimei.

Într-o metodă preferențială, pentru a produce o ribozimă, două oligonucleotide sintetice ale secvenței complementare sunt preparate prin procedee standard (care sunt cunoscute din literatura de specialitate), și hibridizează împreună. Una dintre oligonucleotide codifică o ribozimă dorită. Respectivetele capete ale oligonucleotidelor hibridizate corespund la diferite situsuri restrictive enzimatică, fie EcoR1, la un cap, și Pst1, la celălalt capăt. După scindare cu enzimele restrictive potrivite (EcoR1 și Pst1 în exemplul de mai sus), fragmentul ADN dublu catenar poate fi clonat într-un vector de transfer. Acolo unde vectorul plasmidic conține un promotor ARN polimerază, provenit din secvența ADN corespunzând unei ribozime din prezenta invenție, ARN-ul transcris corespunzând unei ribozime poate fi convenabil fie *in vitro*, fie *in vivo*. Acolo unde ribozima conține două jumătăți reținute împreună de împerecherea bazelor nucleotidelor complementare, fiecare jumătate a ribozimei poate fi obținută, conform metodelor de mai sus, și jumătățile incubate împreună formează ribozima.

Ribozimele preferate ale prezentei invenții scindează ținta ARN, care conține secvența X°UY unde X° este orice ribonucleotidă, U este uracil și Y este adenină, citozină sau uracil. X°U formează o parte dintr-o pereche bază a zonei de flancare, iar Y nu este împerecheat cu bază. De preferință, dar în nici un caz exclusiv, X° este guanidină și X°UY este GUC sau GUA. Orice moleculă ARN conținând aceste secvențe poate fi scindată cu ribozimele din prezenta invenție. O dată secvența unui ARN transcris conținând secvența X°UY fiind determinată, brațele secvenței de ribozimă pot fi sintetizate, astfel, încât să-i fie complementare, și astfel să-i producă hibridizarea, ARN-ul din secvența țintă flancând secvența X°UY. La hibridizarea brațelor ribozimei, cu secvența de ARN țintă flan-

când X°UY, regiunea catalitică a ribozimei scindează ARN-ul țintă în interiorul secvenței X°UY. Scindarea ARN-ului este facilitată în prezență de magneziu sau alt cation bivalent, la pH aproximativ 8,0.

În felul acesta, ribozimele preferențiale ale prezentei invenții pot fi proiectate pentru a scinda orice ARN a cărui secvență este cunoscută. Înalta frecvență a reziduurilor scindate de ribozime în ARN (1:64 pentru GUC într-un ARN ,cu coincidență și frecvență egală a distribuției de bază) înseamnă că un număr potențial de situsuri pentru scindări cu ribozime poate fi prezis cu siguranță în orice ARN țintă dat.

Potrivit unui alt aspect al prezentei invenții este asigurată o metodă pentru inactivarea unei secvențe de ARN țintă care include reacția respectivei ținte ARN cu o ribozimă din prezenta invenție.

*In vivo*, adică în interiorul unei celule sau a unor celule ale unui organism, un vector de transfer, cum ar fi o plasmidă vectorială sau un ARN viral, codificând unul sau mai multe ribozime, poate fi transferat în celule de exemplu (fenomen care este cunoscut din literatura de specialitate). Odată aflat în interiorul celulei, vectorul de transfer poate replica, și să fie transcris de polimerazele celulare pentru a produce ARN-uri ribozimice care apoi, inactivează un ARN țintă dorit.

La alegere, un vector de transfer conținând, una sau mai multe secvențe de ribozimă, poate fi transferat în celule sau introdus în celule prin intermediul micromanipulării tehnice, cum ar fi, microinjecția, astfel ca vectorul de transfer sau o parte a acestuia să se integreze în genomul celulei gazdă. Transcrierea materialului genetic integrat duce la apariția ribozimelor, care acționează inactivând o anumită țintă ARN.

Ribozimerle din prezenta invenție au aplicații terapeutice și biologice extinse. De exemplu, virusurile cauzând bolile la om și animale pot fi inactivate prin administrarea la un subiect infectat cu un virus, a unei ribozime, conform prezentei invenții, adaptat să hibridizeze și

să scindeze ARN-ul transcris al unui virus. Astfel de ribozime pot fi hibridizate prin administrarea parenterală sau alte mijloace de administrare. Unui subiect infectat cu un virus cauzând boală, i se poate administra, la alegere, un virus non-virulent ca vaccinul sau un adenovirus, care a fost preparat, astfel, încât să conțină ADN corespunzător la o ribozimă legată de un promotor ARN, astfel, încât ribozima este transcrisă în celulele animalului gazdă, transfectată cu virusul preparat, pentru a efectua scindarea și/sau inactivarea ARN-ului țintă transcris al virusului cauzând boala. Ribozimele din prezenta invenție au aplicație, în particular, la bolile virale cauzate de exemplu, de virusul *Herpes simplex* (HSV) sau virusul SIDA (HIV).

Ribozimele prezentei invenții au, de asemenea, o importanță deosebită la inactivarea ARN-ului transcris în bacterii și alte celule procariotice, plante și animale. În bacterii, ARN-ul transcris de exemplu, bacteriofagul, care cauzează moartea celulelor bacteriale, poate fi inactivat prin transfectarea unei celule cu un vector de transfer al ADN, care este capabil să producă o ribozimă, conform prezentei invenții, și care inactivează ADN-fagul. În altă variantă, ribozima însăși poate fi adăugată și absorbită de celula bacterială pentru a efectua scindarea ARN-ofagului.

ARN-ul transcris în plante poate fi inactivat utilizând ribozime codificate de către un vector ca Ti plasmida din *Agrobacterium tumefaciens*. Când astfel de vectori sunt transfectați, într-o celulă de plantă, ribozimele sunt produse sub acțiunea ARN polimerazei și poate duce la scindarea unei secvențe ARN țintă specifice. Asemănător virusurile de plante ale căror secvențe ARN sunt cunoscute, sau ARN-ul transcris al genelor de plante, pot fi inactivate utilizând ribozime.

Genele endogene transcrise în plante, animale sau alte tipuri de celule pot fi inactivate folosind ribozimele din prezenta invenție. Asemănător, fenotipurile nedorite sau caracteristice pot fi mo-

dulate. Poate fi posibil, de exemplu, utilizând ribozimele din prezenta invenție să se îndepărteze sâmburii din fructe sau se pot trata bolile ereditare umane cauzate de producția unei proteine pernicioase, sau supraproducția unei proteine particulare.

Se dau, în continuare, 5 exemple de realizare a invenției, în legătură cu fig. 1...17, care reprezintă:

-Fig. 1, prezintă situsurile auto-scindabile ale ARN-ului de tip sălbatic și ale ARN-urilor de mutație și o reprezentare a unui profil electroforetic a produselor de scindare auto-catalitică a ARN-ului:

(a). Cuprinde structurile conservate asociate cu situsurile de scindare ale ARN natural în ASBV, ADN satelit transcris din triton și ARN-uri satelite ale sTobRV, LTSV, virusul pestriț de *Solanum nodiflorum*, virusul pestriț de tutun și virusul pestriț de trifoi subteran. Sunt reprezentate secvențele nucleotidice care sunt conservate între aceste structuri, pe când, altele sunt reprezentate cu X. Împerecherea pe baze este reprezentată prin "\*" și situsul pentru scindarea ARN este indicat cu săgeată.

(b). Reprezintă secvențele de nucleotide conservate asociate cu scindarea catenei (+) a sTobRV ARN. Situsul de scindare este indicat cu săgeată.

(c). Este prezentat un mutant *in vitro* al sTobRV conținând o inserție de opt nucleotide (reprezentată încercuit) împreună cu o duplicație pe flanc de trei nucleotide (UGU cu resturi de la 7 și 9).

(d). Fragmente sub-clonate de HaellI de tip sălbatic sTobRV și mutantul D-51 *in vitro* au fost fiecare transcrise în ambele orientări (+) și (-) și fracționate prin transcriere radiomarcată și electroforeză pe gel de poliacrilamidă. Pozițiile bazelor 159 și 170 nescindate transcrise din secvențele de tip sălbatic (WT) și de mutant (D-51) sunt indicate cu săgeată și se evidențiază cantitățile de produse scindate.

-Fig. 2, prezintă secvența de nucleotidă a unei ribozime și produsele de scindare ale ribozimei separate prin

electroforeză pe gel:

(a). Nucleotidele inserate în mutantul D-51 (fig. 1c) conțin un situs al endonucleazei de restricție BamHI. BamHI a fost utilizat pentru a scinda ADN-ul mutant și cele două secvențe au fost subclonate și transcrise separat *in vitro*, ARN-ul transcris este reprezentat schematic cu bazele potențial împerechiabile între ARN-urile indicate, cu "\*". Fragmentul conținând situsul pentru scindare arătat cu săgeată este desemnat ca S-ARN, fragmente conținând ribozima este desemnată, ca Rz-ARN.

(b). (<sup>32</sup>P)-Rz-ARN (101 baze) a fost incubat singur (coloana 1), și cu S-ARN nemarcat (coloana 2). (<sup>32</sup>P)-S-ARN a fost incubat singur (coloana 3), și cu Rz-ARN-uri nemarcate sau marcate, cu <sup>32</sup>P (coloanele 4 și, respectiv, 5).

-Fig. 3, reprezintă schematic un model de ribozimă, conform unuia dintre obiectele prezentei invenții. Zona A reprezintă secvența de scindare din interiorul ARN țintă. Zona B reprezintă zona catalitică, iar zona C reprezintă brațele ribozimei.

-Fig. 4, prezintă schema ribozimelor ațintite împotriva genei transcrise CAT (cloramfenicol acetil transferază). Ribozimele, denumite RzCAT-1,2 și 3, au fost ațintite către trei situsuri ale genei CAT, dintr-o bază 835 transcrisă *in vitro*. Localizările relative ale situsurilor de scindare pe transcris sunt reprezentate schematic cu bazele numerotate de pe flancuri (a). Cele trei secvențe de ribozime sunt reprezentate (de la (b) la (d)) cu secvențele lor țintă. Secvențele de aminoacid ale genei CAT sunt numerotate și situsurile precise pentru scindarea ARN sunt indicate cu săgeată. RzCAT-1 și 3 conțin 24 de secvențe de baze derivate din catena (+) a sTobRV (regiunea B, fig. 3), pe când RzCAT-2 conține o singură schimbare U-A în această zonă.

-Fig. 5, prezintă rezultatul scindării CAT ARN cu ribozime RzCAT-1 la 3.

(a). ARN-urile [<sup>32</sup>P]-CAT au fost fracționate pe gel după incubare, numai (-) sau cu una dintre cele trei ribozime,

RzCAT-1 la 3 (coloanele 1, 2 și respectiv 3). Localizarea întregului transcris este indicat cu săgeată.

(b). Analiza bazei terminale 5'. Fragmentele 3' produse prin scindarea cu ribozimă a CAT mARN au fost [5'-<sup>32</sup>P]-kinazate, purificate pe gel, supuse la digestie completă de nuclează, iar reziduurile terminale eliberate au fost fracționate prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă, la pH=3,5. Nucleotidele terminale 5', determinate prin referire la markeri (coloana M), unde A, U și G sunt din fragmentele produse de RzCAT, de la 1 la 3 (coloanele 1, 2 și, respectiv, 3).

-Fig. 6, este reprezentată curba activității catalitice a ribozimei RzCAT-1 asupra CAT ARN. Cantitățile de produse de scindare ale nucleotidei 139 au fost stabilite cantitativ și reprezentate grafic. Reprezentarea suplimentară arată acumularea de fragment de bază 139 în timp, după electroforeză pe gel de poliacrilamidă.

-Fig. 7, prezintă viteza relativă de scindare a CAT ARN în diferite condiții de temperatură. Substratul ARN este reprezentat prin linie continuă. În fiecare caz, produsul de scindare este reprezentat printr-o linie punctată.

-Fig. 8, reprezintă trei ribozime (corespund pentru RzCAT-2) având brațe sau secvențe de flank de diferite mărimi.

-Fig. 9, prezintă schema de obținere a unei ribozime cuprinzând ARN antisens catalitic, conținând în fiecare domeniu de scindare RzCAT, de la 1 la 3.

-Fig. 10, arată hibridizarea ribozimelor la secvențe țintă conținând motive GUA (10a) și GUU (10b) în CAT mARN.

-Fig. 11, arată situsurile pentru scindarea autocatalitică a ARN-ului din virusul *Citrus exocortis* (CEV) ARN și complementul acestuia.

-Fig. 12, este reprezentată ribozima RzCEV25x (+) hibridizată la ținta CEV ARN(a), și o imagine a electroforezei pe gel a (+)CEV ARN și (-)CEV ARN complementar, incubat cu RzCEV25x(+) (b, coloanele 1 și, respectiv, 2. Produsul de scindare este indicat cu săgeată).

-Fig. 13, prezintă ribozima RzCAT-

2 hibridizând la secvența sa țintă (a) și ribozima RzSCMoV (b). Domeniul catalitic al fiecărei ribozime este încercuit. Sunt marcate și diferențele între zonele catalitice ale RzSCMoV, comparativ cu RzCAT-2.

-Fig. 14, prezintă ribozima RzCEV-2 hibridizând la o secvență țintă din ARN-ul virusului *Citrus exocortis* (CEV). Situsul de scindare corespunde nucleotidei-336 în secvența CEV ARN. Alterarea la secvența nucleotidică în domeniul catalitic al sTobRV este încercuită (a). Fig. 14(b) prezintă o imagine electroforetică a unui ARN de control (catena (-) a CEV) ARN, coloana 7 și catena (+) a CEV ARN coloana 8, după incubare cu RzCEV2.

-Fig. 15, prezintă ribozima RzCAT-2 (a) comparată cu ribozima RzCAT-2B (b). Domeniile catalitice sunt încercuite. Schimbările în domeniul catalitic al RzCAT-2B comparativ cu RzCAT-2 sunt, de asemenea, încercuite.

-Fig. 16, reprezintă o schemă a plasmidei pJ35SN.

-Fig. 17, este o prezentare grafică a unei medii a patru experimente asupra inhibiției expresiei CAT la plante (protoplaste de tutun).

În exemplele de realizare care urmează, reacțiile și manipulările implicând ADN, ca ligări, reducerea digestiei enzimice, transformări bacteriale, secvențierea ADN, etc, au fost conduse după tehnici standard, ca cele descrise în literatura de specialitate (de exemplu, de Maniatis și al.). Manipulările de ARN au fost, de asemenea, conduse conform tehnicilor standard ca cele descrise de Uhlenbeck.

#### **Exemplul 1.** Scindarea auto-catalitică a sTobRV ARN de mutație

Un consens al domeniilor asociate cu scindarea situsurilor ARN-ului produs natural în ASBV, ADN datelit de triton transcris, și ARN-urile satelite ale sTobRV, LTSV, virusul pestriț al tabacului catifelat (VMoV) virusul pestriț din *Solanum nodiflorum* (SNMV) și virusul pestriț de trifoi subteran (SCMoV) este așa cum este reprezentat în fig. 1a. Sunt prezentate secvențele de nucleo-

tide, care sunt conservate între aceste structuri, pe când secvențele non-conservate sunt reprezentate cu X. Un U suplimentar este poziționat după reziduul <sup>1</sup>A în catena LTSV(+).

Domeniul asociat cu scindarea auto-catalizată a catenei (+) a sTobRV a fost studiat pentru a evidenția activitatea enzimatică a substratului în acest domeniu. Mai întâi, sTobRV cADN-urile clonate au fost supuse mutagenzei utilizând o oligonucleotidă linker de redactare a inserției (BamH1).

*Construirea unui vector pentru exprimarea sTobRV in vitro*

Un fragment 160 Taq 1-Spe 1 de sTobRV cADN a fost izolat din pSP653 (după metodele cunoscute din literatura de specialitate) și ligat la restul Acc 1-Spe 1, pGEM 4 tratat cu fosfatază pentru a reforma situsul Acc 1. Un clon rezultat a fost linearizat cu Acc 1 tratat cu fosfatază și un fragment 359 bp Taq 1, din sTobRV cADN a fost linearizat. Clonele rezultate au fost protejate de prezența unei secvențe 520 bp sTobRV cADN permutată circular, conținând reziduuri terminale excesive, de la 277 la 81 (pTTS). Secvența sTobRV este flancată de promotori pentru T7 și SP6 ARN polimeraze, și transcrierea, dă o creștere de ARN de orientare (+) sau (-) care conține două situsuri pentru autoscindare.

*Mutagenza in vitro*

Plasmida pTTS (50 μg) a fost linearizată cu BamH1, tratată cu nuclează S1 și religată pentru a îndepărta un unic situs BamH1. Compusul rezultat, pTTS-B, a fost tratat cu  $2 \times 10^4$  unități de DNază 1, în 20 mM Tris-HCl, pH= 7 și 0,15 mM MgCl<sub>2</sub>, pe o perioadă de 10 min și la temperatura, de 37°C. ADN-urile lineare rezultate au fost orientate și/sau blocate la capăt, utilizând T<sub>4</sub> ADN polimerază și au fost purificate prin electroforeză cu gel 0,7% de LGT agaroză și extracție. Secvențele de linker kinază BamH1 (CGGATCCG) au fost ligate, pentru a lineariza plasmida, peste noapte la temperatura camerei, în prezență de polietilenglicol 5%. Apoi, reacțiile au fost asimilate de BamH1, și ADN-

urile plasmidice lineare au fost repurificate prin electroforeză pe gel 0,7% de LGT agaroză (acest lucru s-a găsit că este necesar pentru a îndepărta ultimele urme de plasmidă circulară împreună cu linkerii nelegați). Plasmidele au fost recirculate utilizând T<sub>4</sub> ADN ligază și transformate în *E. coli* DH-1. Colonii (mai mari de 1000) au fost răzuite de pe plăcile de agar, crescute în cultură lichidă până la saturare și s-au preparat populații mixte de ADN-uri plasmidice. Amestecul de inserții sTobRV cADN a fost excizat prin restricția enzimei de asimilare la EcoR1 flancator și la situsurile Pst1, purificat prin electroforeză pe gel 1% de LGT agaroză și sub-clonat la capătul EcoR1-Pst1, pGEM-4 tratat cu fosfat. Rezultatele au fost din nou comasate, crescute în cultură lichidă și s-a preparat ADN plasmidic. ADN-urile plasmidice au fost tratate cu BamH1, pentru a scinda numai acele plasmide conținând o secvență linker BamH1 și formele liniare au fost din nou purificate prin electroforeză în două rânduri pe gel 0,7% de AGT agaroză, recirculare cu T<sub>4</sub>ADN ligază și transformare în *E. coli* DH-1. Transformanții individuali au fost protejați pentru poziția aproximativă a linkerului BamH1 inserat în secvența sTobRV, prin restricția enzimei de asimilare, sub-clonați la M13 mp19 și secvențiați prin tehnica lanțului terminal dideoxinucleotidic.

A rezultat o multitudine de mutanți sTobRV și analiza secvenței de nucleotide a arătat că fiecare mutant a conținut o secvență linker (CGGATCCG) de BamH1 inserată împreună cu duplicarea flancurilor sau eliminarea secvențelor sTobRV. Mutanții au fost transcriși *in vitro* și ARN-urile au fost testate în privința capacității de a suferi scindarea. Din acest experiment a fost identificată o secvență 52-nucleotidă conținând, atât porțiuni de substrat, cât și de scindare a sTobRV ARN. Această secvență 52-nucleotidă, reprezentată în fig. 1b, a conținut domeniul de secvență conservată cerut pentru auto-scindarea altor ARN-uri (fig. 1a). Un mutant, desemnat D-51, a conținut o secvență opt-nucleoti-

dică de linker BamH1 inserată între trei nucleotide sTobRV duplicate numerotate de la 7 la 9. Acest mutant a suferit scindare auto-catalitică a ARN-ului.

Perechile de baze 97 și 108 din fragmentele HaellI conținând secvența de scindare 52-nucleotidă de tipul sălbatic și ARN-urile D-51 (așa cum sunt prezentate în fig. 1b și 1c) au fost excizate din clonele plasmidice secvențiate. Fragmentele au fost ligate la situsul SmaI al pGEM4 și protejate pentru a obține ambele orientări ale inserției. Plasmidele au fost linearizate utilizând EcoR1 și catena (+) și (-) a ARN-urilor cu bucăți de baze 159 și 170 au fost transcrise utilizând 200 unități/ml de T7 ARN polimerază la pH=7,5, în 50 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM spermidină, 1000 unități/ml RNazină, 500 μM ATP, CTP și GTP cu 200 μM (α<sup>32</sup>P)UTP. ARN-urile au fost fracționate prin electroforeză pe poliacrilamidă 10%, uree 7 molar, gel de formamidă 25% și autoradiografiat.

Așa cum s-a prezentat în fig. 1d, nu s-a observat scindarea catenei (-) a ARN transcris. Acest lucru era de așteptat întrucât catena (-) nu conține un situs de scindare auto-catalitică. La catenele (+) atât ale tipului sălbatic cât și ale secvențelor D-51, a avut loc scindarea, iar scindarea D-51 ARN-ului fiind întrucâtva mai puțin eficientă decât cea a tipului sălbatic (fig. 1d). Acest experiment indică că regiunea cu o buclă unicatenară, pe partea dreaptă a secvenței 52-nucleotidice, la scindarea auto-catalitică a ARN-ului, nu este esențială.

#### *Separarea activităților enzimaticice și de substrat*

Utilizând situsul endonucleazei BamH1 de restricție inserat în D-51, au fost obținute fragmente de flanc HaellI-BamH1 și BamH1-HaellI și fiecare a fost sub-clonat într-o plasmidă de *E. coli* convenabilă pentru transcrierea *in vitro*. Acest lucru a condus la eliminarea buclei unicateenare mutate din domeniul de auto-scindare, scindând regiunea în două segmente de ARN (fig. 2a). Fragmentul mai mic HaellI-BamH1 conținea nucleo-

tide de la 321 la 9, incluzând actualul situs de scindare și a fost denumit fragmentul S. Fragmentul BamH1-HaellI conținând nucleotide de la 7 la 48 din sTobRV a fost denumit ribozimă sau fragment Rz. Plasmidele *E. coli* folosite pentru transcrierea *in vivo* au fost pGEM4 și pGEM3 (așa cum este cunoscut din literatura de specialitate). Aceste plasmide de expresie conțin:

- (a). o origine a replicării;
- (b). gena selectabilă la rezistența la medicamente (Amp<sup>r</sup>);
- (c). un situs de clonare multiplă flancat de promotori ARN polimerază care pot fi utilizați pentru obținerea transcrierii *in vitro*.

T7 ADN polimeraza tratată, Rz-pGEM3 digerată cu Kpn1 și S-pGEM4 digerată cu XbaI au fost transcrise utilizând SP6 ARN polimerază în aceleași condiții cu cele descrise mai sus. Așa cum se prezintă în fig. 2, atât S,cât și Rz-ARN-urile nu au prezentat degradare semnificativă când au fost incubate singure (fig. 2b, coloanele 1 și 3) în condiții potrivite pentru auto-scindare de înaltă eficiență (50°C, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, pH=8,0). Rz-ARN marcat apare, de asemenea, nealterat după incubare cu S-ARN (fig. 2b, coloanele 2 și 5). Totuși, când S-ARN a fost amestecat cu Rz-ARN, a avut loc scindarea eficientă a S-ARN (fig. 2b, coloanele 4 și 5) rezultând două fragmente. Dimensiunile produsului au fost coordonate cu scindarea S-ARN-ului (84 de baze) la situsul normal între nucleotidele #359 și #1, pentru a da fragmente învecinate pozițiilor 5' și 3' ale nucleotidelor 67 și, respectiv, 17. Acest lucru arată că S-ARN-ul acționează ca un substrat pentru scindarea ribonucleotidică cu Rz-ARN, care acționează de o manieră catalitică.

Un model al unei ribozime bazat pe regiunea catalitică a sTobRV ARN este prezentat în fig. 3. Ribozima are două brațe sau secvențe pe flancuri, de ARN unicateenar, prezentat la C, hibridizând la secvențele complementare pe un substrat ARN, iar ARN-ul este scindat. Fiecare secvență de flanc prezentată la C, conține 8 ribonucleotide. Numărul ri-

bonucleotidelor conținut în regiunea C nu este critic. Totuși este necesar să fie prezente suficiente nucleotide pentru a permite ribozimei să hibridizeze la o țintă ARN. Reiese că patru nucleotide în

Regiunea catalitică B conține secvențe care sunt foarte bine în domeniile în care are loc scindarea pe cale naturală (în mod spontan) (de văzut fig. 1a). Din compararea domeniilor de scindare ale secvențelor cunoscute, reiese că porțiunea de pereche bază din II, nu este importantă, ca și prezența unei bucle asociate la unul din capetele acesteia.

Situsul de scindare din interiorul țintei ARN este reprezentat la A (în fig. 3) ca GUC. Pe baza experimentelor noastre (neprezentate), și a altora din domeniul de specialitate, asupra situsurilor de scindare în ARN-urile de proveniență naturală, a rezultat că și secvențele GUA, GUC, CUC, AUC și UUC acționează ca situsuri de scindare, în interiorul ARN.

**Exemplul 2.** *Demonstrarea designului, sintezei și activității ribozimelor, cu o nouă și înaltă activitate de endoribonuclează*

Ca o ilustrare a acestei invenții au fost proiectate trei ribozime, care sunt așintite împotriva transcrisului unei gene folosite în mod obișnuit ca indicator, derivate din bacterii, Tn9 Cloramfenicol Acetil Transferază (CAT), care poate dezvolta rezistență la bacterii, plante și animale și poate fi testată cu ușurință. Aceste ribozime, desemnate Rz-CAT de la 1 la 3 corespund la scindări potențiale de situsuri GUC în CAT ARN la pozițiile 139-140, 494-495 și 662-663, respectiv. Secvențele acestor ribozime sunt reprezentate în fig. 4. În fiecare caz, secvențele de pe flanc care hibridizează ARN-ul CAT țintă au conținut 8 nucleotide. Zona catalitică a fost astfel aleasă, încât să corespundă aceleia a sTobRV ARN, prezentate în fig. 3.

Gena CAT care a fost obținută din pCM4, a fost sub-clonată ca un frag-

ment BamH1 în pGEM-32. Acest plasmid a fost linearizat cu HindIII și transcripțiile genei CAT au fost obținute utilizând T7 ARN polimerază cu 220  $\mu\text{M}$  ( $\alpha^{32}\text{P}$ ) UTP. Au fost sintetizate secvențe de ribozime ca oligodezoxinucleotide, Rz CAT-1,2 și, respectiv, 3. Acestea au fost kinazate, ligate cu o porțiune EcoRI-PstI de pGEM4 tratat cu fosfatază și a fost incubat cu fragmentul Klenow al ADN polimerazei 1, înainte de transformare bacterială. Plasmidele EcoRI linearizate au fost transcrise cu T7 ARN polimerază pentru a produce ARN-uri ribozimice. Ribozimele au fost incubate cu transcris CAT, în mM Tris-HCl, pH= 8,0, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , la temperatura de 50°C, timp de 60 min, iar produsele au fost fracționate prin electroforeză pe gel conținând 5% poliacrilamidă, 7 M uree, formamidă 25% înainte de autoradiografie.

Când transcrisul CAT 840-nucleotidic a fost incubat cu oricare dintre cele trei ribozime, a avut loc o scindare eficientă și de înaltă specificitate a secvenței (fig. 5) rezultând două fragmente de ARN, din fiecare reacție. Mărimile fragmentelor au fost compatibile cu situsurile precise pentru scindare (fragmentele de baze 139 și 696, 494 și 341, 662 și 173 au fost produsele scindării catalitice 5' și 3' din RzCAT-1,2 și, respectiv, 3). Condițiile cerute pentru scindări catalitice cu ribozime au fost similare acelor observate pentru reacțiile de scindare, care au loc pe cale naturală (așa cum este cunoscut din literatura de specialitate), scindarea mai eficientă având loc, la pH-uri ridicate, temperatură și concentrații de cation bivalent (nu sunt prezentate date). Când sunt prezente în exces molar, cele trei ribozime catalizează scindarea aproape completă a CAT ARN substrat, după 60 min, în 50 mM Tris-HCl, pH=8,0, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , la temperatura de 50°C. În condiții similare, cu 0,1  $\mu\text{M}$  substrat și 3  $\mu\text{M}$  ribozime,  $T_{1/2}$  al substratului CAT mARN au fost 3,5 și 2,5 min, în prezența RzCAT-1,2 și, respectiv, 3. Secvențele de ribozime au fost inactive față de complementul substratului ARN (catena (+)), și în

forma oligodeoxiribonucleotidelor (nu sunt prezentate date). Fragmentele terminale 3' de scindare ale fiecărei reacții catalizate cu ribozimă au fost izolate și poziția 5' kinazată-<sup>32</sup>P (50 mM Tris-HCl, pH=9, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, cu uCi  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP și 5 unități T4 polinucleotid kinază, timp de 30 min, la temperatura, de 37°C). Prin kinazarea eficientă a fragmentelor, se indică că ele posedă grupări 5' terminale, similar celor rezultate în urma scindării, care are loc în mod natural.

Au fost determinate nucleotidele fragmentelor obținute prin scindarea secvențelor CAT, de către RzCAT, de la 1 la 3. Pe scurt, fragmentele radiomarcate au fost purificate pe un gel de poli-acrilamidă 5% și supuse digestiei, cu un volum egal de 500 unități/ml RNază T1, 25 unități/ml RNază T2 și 0,125 mg/ml RNază, în 50 mM acetat de amoniu pH=4,5, timp de 120 min, la temperatura de 37°C. Produsele au fost fracționate pe un gel de poli-acrilamidă 20% conținând 25 mM citrat de sodiu, pH=3,5 și uree 7 molar. Fig. 5b arată că scindarea secvențelor CAT de către RzCAT-1 la 3 are loc cu precizie în fața nucleotidelor A, U și respectiv G.

Secvențele terminale a fragmentelor de genă CAT au fost determinate direct utilizând tehnica asimilării parțiale enzimatică (așa cum este cunoscut din literatura de specialitate), utilizând scindarea specifică pe bază, parțial, nucleotidică. Secvența de fragment confirmă că scindarea are loc la localizările așteptate din interiorul CAT ARN (nu sunt arătate).

#### *Cataliza enzimatică*

Pentru a demonstra că ribozimele provoacă scindarea substratului CAT mARN într-o manieră catalitică, fiecare a fost incubat cu un exces molar de substrat, în condiții care ar favoriza, atât scindarea, cât și disocierea de produs.

Fig. 6 arată rezultatele unui experiment, în care, după 75 min, la temperatura de 50°C, pH=8,0, în 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol de RzCAT-1 au catalizat scindarea specifică a unui substrat trunchiat de 163 pmol CAT mARN (173 baze) pentru a da fragmente 5' și 3' a bazelor 139 și, respectiv, 34. În medie, fiecare ribozimă a participat la mai mult de zece reacții de scindare. După 75 min, la temperatura de 50°C a fost remarcată o proporție de scindare nespecifică a ARN-ului datorită condițiilor extreme, dar 70% din ARN-urile rămase intacte (163 mol) s-a acumulat ca fragment de bază 139. Rezultatele similare s-au obținut pentru RzCAT-2 și 3 (nu sunt prezentate date), și, astfel, rezultă că fiecare acționează ca o enzimă ARN.

#### **Exemplul 3.** *Efectul temperaturii asupra activității ribozimei*

A fost examinat efectul temperaturii asupra vitezei activității ribozimei *in vitro*.

A fost urmărit mersul reacțiilor pentru ribozimele RzCAT-1, 2 și, respectiv, 3, substraturi, la 37°C și 50°C.

În acest experiment, reacțiile pentru fiecare ribozimă au fost făcute în dublu exemplar, utilizând condițiile de reacție din exemplul 2. O probă a fost incubată la temperatura de 37°C, celaltă la temperatura de 50°C. Probele la timpul de reacție, până la 90 min și desfășurarea reacției a fost analizată prin electroforeză pe gel de poli-acrilamidă denaturată. Fig. 7 prezintă mersul reacției pentru fiecare dintre ribozimele, de la 1 la 3, la temperatura de 37°C și temperatura de 50°C. Viteza de reacție a fiecărei ribozime crește cu creșterea temperaturii de reacție.

Timpul de reacție necesar pentru scindare a 50% ( $t_{1/2}$ ) din CAT ARN este prezentat în tabelul 1:

Tabelul 1

Temperatura, °C	RzCAT-1	RzCAT-2	RzCAT-3 $t_{1/2}$ (minute)
50	3,5	3,5	2,5
37	55,0	70,0	65,0

Așa cum se arată în tabelul 1, viteza de reacție a ribozimelor la temperatura de 37°C este de aproximativ 20 de ori mai mică, decât viteza de reacție la temperatura de 50°C.

**Exemplul 4.** Efectul variației lungimii brațelor ribozimelor (sau a secvenței de flanc) asupra activității catalitice a ribozimei

Brațele sau secvențele de flanc ale unei ribozime hibridizează ribozima la o țintă ARN, după care are loc scindarea ARN. În acest experiment a fost investigat efectul asupra vitezei de scindare a unei secvențe țintă, obținut prin alterarea dimensiunilor complementarității și, prin urmare, a lungimii bazelor care înperechează, ale brațelor ribozimei, la secvența țintă.

Ribozimele au fost produse cu 4, 8 și 12 baze complementare a secvenței țintă RzCAT-2, pe fiecare braț (fig. 8a). Ribozimele au fost preparate, conform metodelor din exemplul 2. Activitatea ribozimei a fost determinată prin incubarea ribozimei ARN, cu CAT ARN, așa cum a fost descris mai înainte.

Ribozima având o complementaritate de 4 baze, pe fiecare braț, nu scindează substratul ARN. Ribozima având o complementaritate de 8 baze pe fiecare braț a scindat substratul CAT, ca și ribozima având o complementaritate de 12 baze. Ribozimele cu o complementaritate de 12 baze au scindat mai eficient ținta ARN, așa cum se poate judeca după viteza de reacție *in vitro*, decât ribozimele având un număr mai mic de baze complementare. Prin urmare, apare necesar să existe o complementaritate mai mare de patru baze, mărin-

di dimensiunile zonei de hibridizare a ribozimelor când crește viteza lor de reacție.

Într-un experiment secund, a fost

investigată eficiența reacției unei ribozime având complementaritate (a) la întreaga lungime a țintei transcrise CAT ARN și domenii catalitice multiple (b).

Patru situsuri țintă GUC, în secvențele CAT ARN, au fost alese. Domeniile catalitice ale ribozimei împotriva acestor situsuri au fost "inserate" într-o secvență completă anti-sens (-) pentru transcrisul CAT și a fost testată activitatea catalitică.

Cele patru situsuri alese au fost cele trei desemnate prin RzCAT-1, 2 și 3, descrise mai înainte și un situs suplimentar, care poate fi descris după cum urmează:

Situs CAT nou				
#192				
His	His	Ala	Val	C y s
Asp	Gly			
5'				3'
CAU	CAU	GCC	GUC	UGU
GAU	GGC			

în care: "192" se referă la aminoacidul 192 din polipeptida CAT și se referă la situsul de clivaj.

Oligodeoxiribonucleotidele conținând domenii catalitice ale ribozimei și rotirile fiecărui dintre aceste situsuri de scindare, au fost folosite pentru experimente în mutageneză M13, pentru a produce o secvență conținând întregul complement al secvenței CAT, dar cu cele patru domenii catalitice ale ribozimei, inserat în acesta. Mutageniza M13 a fost executată prin legarea oligonucleotidelor conținând inserția de ribozimă la ADN-urile unicatenare, conținând uracil, urmată de sinteza ADN-urilor complementare, conținând inserția. ADN-urile complementare au fost recuperate ca urmare a clonării într-o specie potrivită de *E. coli* (așa cum este cunoscut din literatura de specialitate).

CADN-ul rezultat dublu catenar a fost clonat într-un vector de expresie *in vitro* pentru a produce ribozima ARN, utilizând sistemul de transcripție T7. Activitatea ribozimei a fost determinată prin incubarea ARN ribozimei cu transcripția SAT urmată de electroforeza pe gel a amestecului de reacție, după tratare cu gli-

coxal pentru a denatura acizii nucleici. Scindarea autolitică a avut loc la toate situsurile așteptate pe transcrisul CAT. În consecință, secvențele de flancuri ale brațelor sau a ribozimei se pot extinde, de-a lungul întregii lungimi a transcrisului ARN, care trebuie scindat.

Fig. 9, prezintă schematic un ARN anti-sens catalitic conținând fiecare dintre cele patru ribozime. ARN-ul anti-sens catalitic conține aproximativ 900 de baze.

În condițiile de mai sus, ribozima și secvențele țintă formează complexi înalt moleculari probabil prin împerechere de baze extensive. Pentru a rezolubiliza produsele de reacție este necesar un tratament puternic denaturizant, ca, de exemplu, tratament cu glioxal, în timpul electroforezei.

**Exemplul 5.** *Secvențe țintă pentru scindarea ribozimelor*

Motivul GUA din mARN a fost testat pentru a vedea dacă o ribozimă va afecta scindarea ARN la această secvență.

A fost ales un situs specific din CAT mARN, incluzând motivul GUA (fig. 10a) și a fost preparată o secvență ribozimică potrivită și testată, din punct de vedere al activității. Ribozima conținea brațele a 8 ribonucleotide.

Oligonucleotidele sintetice corespunzând ribozimei din fig. 10, au fost preparate conform exemplului 2 și cADN-ul dublu catenar a fost clonat într-un vector de expresie *in vitro* din *E. coli*, cu scopul de a produce ribozimă ARN utilizând sistemul de transcriere T7 polimeraza. Activitatea ribozimei a fost determinată prin incubarea ribozimei ARN, cu CAT mARN, urmată de electroforeza pe gel a amestecului de reacție cum a fost descris.

Ribozima efectuează scindarea la situsul țintă GUA (nu este arătat). În consecință, motivul GUA în ARN este un substrat pentru ribozimele din prezenta invenție. Acest lucru nu este complet neașteptat, întrucât un situs de proveniență naturală din ARN-ul satelit al virusului tranzitoriu striat al lucernei necesită recunoașterea unui situs GUA.

În mod similar, un motiv GUU din secvența țintă CAT ARN a fost testat cu o ribozimă potrivită (vezi fig. 10b) și a fost efectuată scindarea.

**Exemplul 6.** *Scindarea ribozimei ARN-ului viral*

ARN-ul viroid, în formă de ARN viroid din *Citrus exocortis*, a fost scindat utilizând o ribozimă din prezenta invenție. În ARN viroid din *Citrus exocortis* (CEV) au fost alese două situsuri GUC țintă. A fost ales, de asemenea, un situs în secvența catenară complementară. Au fost preparate ribozime împotriva tuturor acestor situsuri și li s-a testat activitatea. Ribozimele au fost denumite CEV9x(+), CEV9x(-) și CEV25x(+). Fig. 11 prezintă cele trei situsuri de scindare în CEV ARN pentru fiecare din aceste ribozime.

Ribozimele au fost preparate conform metodelor precedente. Ribozima RzCEV25x(+) este prezentată în fig. 12. Această ribozimă scindează motivul GUC la nucleotida 116 a CEV ARN.

Fig. 12b prezintă scindarea CEV ARN cu ribozima RzCEV9x(+). Cu ribozima RzCEV9x(-) nu s-a observat scindare.

Acest experiment indică că ribozimele sunt active împotriva secvențelor țintă ARN din diverse surse. Acest lucru este de așteptat, întrucât toate ARN-urile sunt formate din cărămizile de bază ribonucleotidice conținând adenină, guanină, citozină și uracil, indiferent de originea lor, din animale, din plante sau din microbi.

**Exemplul 7.** *Exemple de ribozime având domenii catalitice variabile*

O ribozimă ațintită împotriva unui situs CAT-2 a fost preparată utilizând secvența de domeniu catalitic din ARN

satelit al virusului de trifoi peștiș sub-  
 teran (SCMoV). O complementaritate de  
 douăsprezece baze ale secvenței de flanc  
 a brațului ribozimei a fost încorporată în  
 proiectul ribozimei RzSCMoV. Ribozimele  
 RzCAT-2 și RzSCMoV sunt prezentate în  
 fig. 13a și, respectiv, 13b. Regiunea de  
 buclă a RzSCMoV conține 5 nucleotide  
 conținând secvența AAAUC. Aceasta  
 este în contrast cu regiunea de buclă a  
 RzCAT-2, care conține 4 nucleotide cu-  
 prinzând secvența AGAG. În plus,  
 RzSCMoV conține un C, în zona catalitică  
 în loc de U\* în RzCAT-2. Sunt marcate  
 secvențele diferite din RzSCMoV com-  
 parativ cu RzCAT-2.

RzSCMoV a fost produs conform  
 exemplului 2. RzSCMoV s-a dovedit a fi  
 activ ducând la obținerea a două produse  
 de scindare, așa cum se aștepta.

Într-un alt experiment, situsul țintă  
 de *Citrus exocortis* viroid (CEV) la nu-  
 cleotida -336 în ARN-ul său complemen-  
 tar a fost scindat utilizând o ribozimă  
 (RzCEV-2) având secvența redată în fig.  
 14a. Regiunea de buclă desemnată cu  
 litera "L" în fig. 14 cuprinde șase nucleo-  
 tide având secvența 3'-CCTATA-5'.  
 Aceasta este distinctă de regiunea de  
 buclă a sTobRV care cuprinde patru nu-  
 cleotide cu secvența 3'-AGAG-5'. Această  
 ribozimă scindează ținta CEV comple-  
 mentară a ARN la poziția -336, așa cum  
 se prezintă în profilul electroforetic din  
 fig. 14b.

Acest experiment indică că numă-  
 rul de nucleotide și secvențe de nucleo-  
 tidă din zona de buclă nu este important  
 în activitatea ribozimei. În aceste experi-  
 mente, ribozima a fost produsă conform  
 metodelor descrise mai înainte în inven-  
 ție.

În alt experiment, a fost investigat  
 efectul împerecherii de baze în domeniul  
 catalitic (regiunea trunchiului).

A fost preparată și testată o ri-  
 bozimă modificată conținând patru pe-  
 rechii de baze suplimentare. În fig. 15a,  
 este prezentată secvența de ribozimă  
 RzCAT-2 hibridizată la CAT ARN țintă. Ri-  
 bozima test este prezentată în fig. 15b,  
 cu perechile de baze adiționale încer-

cuite. Ribozima test are activitate com-  
 parabilă cu aceea a RzCAT-2. Aceasta  
 indică că zona împerecherii de baze a do-  
 meniului catalitic a ribozimei poate fi de  
 lungime variabilă fără a afecta activitatea  
 catalitică.

S-a observat (nu sunt prezentate  
 date) că forma stabilă *in vivo* a transcri-  
 selor sTobRV ARN exprimate în plantele  
 transgenice este la început circulară,  
 probabil datorită ligării grupelor 5' și 3'  
 terminale. Prin urmare, utilizarea a două  
 situsuri de scindare autolitică flancând o  
 secvență de interes într-un ARN tran-  
 scris *in vivo* este probabil să conducă la  
 un produs circularizat care poate avea o  
 stabilitate mai mare, decât transcrisul  
 linear. Acest lucru pare să proiecteze o  
 nouă metodă pentru stabilizarea *in vivo* a  
 secvențelor de ribozime. Această opera-  
 ție este denumită circularizare.

**Exemplul 8. Activitatea *in vivo* a  
 ribozimelor**

În acest exemplu este investigată  
 activitatea *in vivo* a ribozimelor din celu-  
 lele de plante.

#### *Protocol experimental*

Plasmide conținând gene de con-  
 structie anti-CAT (CAT = cloramfenicol  
 acetil transferază) sau anti-CAT/ribozimă  
 combinate (vezi mai jos) au fost intro-  
 duse în protoplaste de tutun, în aceeași  
 cantitate și proporție una față de cea-  
 laltă, împreună cu altă plasmidă, care  
 conținea o genă funcțională CAT de con-  
 structie. Activitățile CAT au fost măsu-  
 rate și comparate cu nivelul de bază a  
 activității genei.

#### *Materiale și metode*

##### *(a). Electroporări și teste CAT*

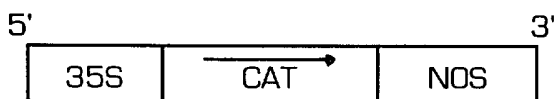
Acestea au fost executate așa  
 cum este descris în literatura de specia-  
 litate. Pe scurt, protoplastele de *Nico-  
 tiana glauca* linia T5 au fost pre-  
 parate dintr-o suspensie de două zile  
 după subcultură, suspendate în 10 mM  
 HEPES, pH=7,2, 150 mM NaCl, 0,2 M  
 manitol și ajustate la o densitate de 3 x  
 10<sup>6</sup>/ml. Electroporarea a fost condusă  
 utilizând un singur puls de 50 ms la 250  
 V. Protoplastele au fost diluate de 10 ori  
 și cultivate, timp de 20 h, la tempera-

tura de 26°C și în întuneric. Acestea au fost scindate prin sonicare și s-au obținut extractele. Extractele normalizate pentru conținutul de proteină, au fost testate din punct de vedere a activității CAT *in vitro* 5 utilizând <sup>14</sup>C-cloramfenicol și acetil CoA. Produsele de reacție au fost separate, prin cromatografie pe strat subțire și autoradiografie. Gradul de desfășurare a reacției a fost calculat prin obținerea de 10 derivați radioactivi a produsului din modelul <sup>14</sup>C-cloramfenicol.

(b). Gene de construcție

Genele de construcție au fost introduse în 0,1 ml suspensii de proto- 15 plaste ca ADN-uri plasmidice, care au fost purificate din bacterii, prin extracție și centrifugare la echilibru de gradient de densitate în două cicluri (CsCl echilibru). Acestea au fost resuspendate în 20 10 mM Tris/1 mM EDTA/, pH=7,5 pentru utilizare.

Gene de construcție CAT activă s-a născut pe plasmida desemnată pCAT7+. Ea a derivat prin fuziunea unei secvențe 25 de genă CAT (din plasmida pCM4, așa cum este cunoscut din literatura de specialitate) în plasmida pJ35SN (derivată din p35SN, de asemenea, cunoscută din literatura de specialitate), astfel, 30 încât, genele de construcție au fost:



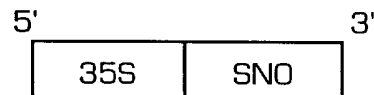
35

35S se referă la CaMV 35S (virusul de conopidă mozaicat) promotor, NOS la semnalul de nopalina sintetază poliadenilare, T/C la transcris. 40

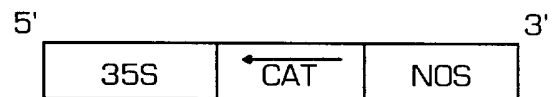
Împreună cu 0,2 μg de pCAT7+ au fost adăugate diverse gene de construcție în exces, așa cum este descris mai jos. Genele de construcție s-au găsit

în interiorul plasmidelor cu următoarele denumiri:

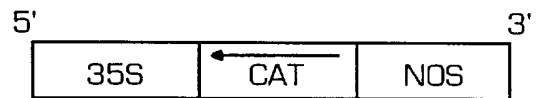
pJ35SN = Acest vector plasmidic, a cărui schiță este prezentată în fig. 16, conține un promotor 35S CaMV și un semnal de nopalina sintetază 3' adenilare din plantă, care poate fi reprezentat după cum urmează:



pCAT7- = Aceasta conține secvența de genă CAT inserată în pJ35 SN, astfel, încât transcripția va duce la obținerea CAT ARN antisens, care poate fi reprezentat după cum urmează:



pCAT19- = Aceasta conține gena CAT cu patru domenii catalitice ribozimice incluse în ea, (vezi exemplul 4 și fig. 9), inserată în pJ35SN, astfel, încât transcripția va duce la producerea de CAT ARN antisens, care poate fi reprezentată după cum urmează:



inserțiile domeniului catalitic

Rezultate

Următorul tabel prezintă activitățile relative ale CAT în celule, după 20 h, de la electroporare. Activitatea este exprimată ca o conversie procentuală a substratului de cloramfenicol într-un test de o oră.

Tratament	µg de plasmidă electroporată				Conversie %
	pCAT7+	pJ35SN	pCAT7-	pCAT19-	
1A	-	-	-	-	0
1B	-	-	-	-	0
2A	0,2	18	-	-	21
2B	0,2	18	-	-	46
3A	0,2	9	9	-	28
3B	0,2	9	9	-	32
4A	0,2	-	18	-	26
4B	0,2	-	18	-	19
5A	0,2	9	-	9	19
5B	0,2	-	-	9	22
6A	0,2	-	-	18	14
6B	0,2	-	-	18	16

(pentru fiecare tratament "A" și "B", sunt duplicate).

Următoarele concluzii pot fi trase din aceste rezultate: 25

(a). Introducerea genei CAT de construcție conduce la o activitate CAT nesemnificativă - de comparat 2A,B cu 1A,B. Între duplicate există o variație. Din tendințele observate în celelalte probe (vezi "b" și "c" mai jos) este probabil că 2A prezintă o activitate anormal de scăzută. 30

(b). Introducerea concomitentă a unei gene de construcție antisens duce la o descreștere a nivelului activității - de comparat 3A,B și 4A,B. Mărimea descreșterii este în directă relație cu nivelul genei antisens adăugate ca plasmidă - de comparat 3A,B și 4A,B. 40

(c). Introducerea concomitentă a genei de construcție combinate antisens/ribozimă conduce la o descreștere a activității genei - de comparat 5A,B și 6A,B. În afară de aceasta, descreșterea este mai marcată decât pentru nivelurile corespunzătoare ale genei de construcție antisens - de comparat 5A,B cu 3A,B și 6A,B cu 4A,B. 45 50

Rezultatele medii pentru patru experimente *in vivo* sunt prezentate în fig. 17. În această figură, "control" înseamnă tratament 2. "Antisens" semnifică tratament 4. "Catalitic" reprezintă tratament 6 și "fundament" reprezintă tratament 1.

Ribozima catalitică inhibă activitatea CAT într-o proporție de 47%, comparativ cu o proporție de 34% pentru o ribozimă antisens.

Introducerea genelor purtătoare de ribozime în celulele de plantă inhibă activitatea genelor împotriva cărora au fost ațintite. În plus, inhibarea este mai mare pentru moleculele ARN antisens corespunzătoare.

Aceste rezultate arată că ribozimele vor fi active în celule, la animale, la plante sau microbi împotriva unui șir de molecule ARN țintă.

Mecanismul acțiunii ribozimelor în acest exemplu este neclar. De exemplu, ribozima antisens poate hibridiza ireversibil la o țintă ARN și cataliza scindarea legăturii fosfodiester la unul sau mai multe situsuri țintă selectate de-a lungul

țintei ARN. Alternativ, enzimele celulare pot desface ARN antisens de secvența sa țintă, astfel, încât ținta ARN este scindată în două sau mai multe fragmente.

**Exemplul 9. Activitatea ribozimelor in vivo în celulele animale**

În acest exemplu este demonstrată activitatea ribozimelor în inactivarea unei ținte ARN din celulele mamifere.

*Materiale și metode*

Genele active de construcție codificând ribozime au fost transfectate într-o linie de celule din rinichi de maimuță larg accesibile. În această metodă, au fost contactate  $3 \times 10^6$ /ml celule COS1 suspendate într-o soluție tampon salină cu 10% ser de vițel fetal, cu diferite gene de construcție. Pentru a efectua electroporarea ADN-ului din celule a fost aplicată o descărcare electrică. Celulele transfectate au fost incubate la temperatura de 37°C, timp de 48 h, în mediu de cultură și înainte de testare pentru activitatea CAT și a luciferazei.

Genele CAT de construcție au

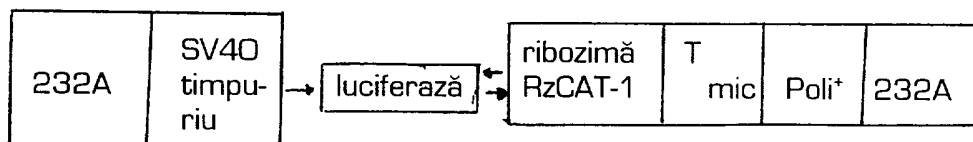
apărut în plasmida desemnată pTK CAT (așa cum este cunoscut din literatura de specialitate). Această plasmidă este derivată prin introducerea unei secvențe de genă CAT, în plasmida pSV2, astfel, încât este sub controlul promotorului timidinchinază al virusului *Herpes simplex*.

Gena de construcție codificând a apărut în plasmida pSV232A (cunoscut din literatura de specialitate) conținând gena luciferază fuzionată cu promotorul timpuriu SV40. ADN-ul codificând ribozimele a fost ligat în situsul Xbal la capătul 3' al genei luciferază, conform metodelor standard, care sunt cunoscute din literatura de specialitate (Maniatis și al.).

Următoarele constructe au fost preparate utilizând tehnicile standard cunoscute (Maniatis și al.):

PFC58 = Acest vector plasmidic conține ADN codificând ribozima RzCAT-1 fuzionată la capătul 3' al genei luciferază într-o orientare nefuncțională.

Acesta poate fi descris după cum urmează:



unde: 232A se referă la secvența pSV232A, SV40 timpuriu se referă la promotorul timpuriu SV40 și T mic este ADN, codificând secvența T mic de intervenție a SV40. Acest construct rezultă în producerea unei molecule codificând luciferază și ribozima RzCAT-1, ultima fiind într-o astfel de orientare încât, nu se așteaptă să fie catalitică.

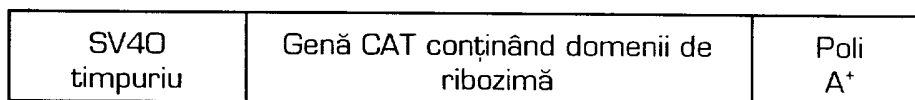
pFC4 = Acest plasmid este același ca pFC58, cu excepția că RzCAT-1 este înlocuit cu RzCAT-3.

pFC1-6 = Acest plasmid este același ca pFC58, cu excepția că RzCAT-1 este înlocuit cu RzCAT-3, în sensul orientării (5'-3').

pFC20 = Acest plasmid este același ca pFC1-6 cu excepția că, RzCAT-3 este înlocuit cu RzCAT-2 secvențe de flanc de opt nucleotide.

pFC12 = Acest plasmid este același ca și pFC20, cu excepția că ribozima RzCAT-2 conține secvențe de flanc de douăsprezece nucleotide.

pFC50 = Acest plasmid conține gena CAT cu patru domenii catalitice de ribozimă incluse în el (vezi exemplul 4 și fig. 9) în sensul orientării (5'-3'), care pe transcris dă naștere unei ribozime inactive. Acest plasmid poate fi descris cum urmează:



ARN necatalitic

pFC54 = Acest plasmid este același ca și pFC50, cu excepția că gena CAT și domeniile ribozimei sunt în orientarea antisens(3'-5').

pFC64 = Acest plasmid împarte promotorul SV40 și semnalele poliadenilării cu pFC50 și conține gena CAT de tip sălbatic cu domenii de ribozimă neinse-  
rate. Această genă este într-o orientare  
antisens și astfel, nu produce proteină  
CAT.

pFC65 = Acest plasmid este același ca și pFC64, cu excepția că gena CAT-de tip sălbatic este în sensul (5'-3')  
de orientare și, astfel, este producă-  
toare de proteină CAT.

*Teste*

Activitatea luciferazei a fost testată conform metodelor cunoscute din literatura de specialitate. Pe scurt, ce-  
lulele COS au fost lizate, la 48 h, după  
transfectare și lizatul de celulă a fost in-  
cubat cu luciferină, substratul liciferazei,  
și liminiscenta detectată utilizând un  
contor de scintilație.

Activitatea CAT a fost măsurată, de asemenea, utilizând lizate de celule COS (lizatele de celule au fost divizate în două, și fiecare porțiune testată pentru

activitatea luciferazei sau a CAT), conform metodei care este cunoscută din literatura de specialitate.

În testele *in vivo*, pFC58 și pFC4 nu a efectuat activitatea CAT în celulele transfectate. Această activitate a fost desemnată ca, activitate CAT 100% și 0% supresie CAT. Activitatea CAT în celulele transfectate cu alte plasmide a fost măsurată relativ la pFC58. Procentul de supresie CAT a fost măsurat ca:

$$100 - \left( \frac{cat_{test}}{cat_{control}} \right) \times 100$$

normalizat la producția de luciferază. CAT<sub>test</sub>-CAT testează rezultatul pentru constructe test. CAT<sub>control</sub>-CAT testează pentru controlul constructelor (pFC4 și pFC58).

Producția de luciferează este un control intern pentru electroporare și dă o măsură a producției de ribozimă în interiorul fiecărei plăci de cultură de țesut electroporată individual.

*Rezultate  
Experimentul (i)*

*μg plasmid electroporat/1,5 x 10<sup>6</sup> celule*

Tratament	pTKCAT	pFC58	pFC20	pFC1-6	pFC12	Supresia % CAT
1	5	-	2	-	-	56
2	5	-	1	1	-	53
3	5	-	-	-	2	40
4	5	2	-	-	-	0

Toate tratamentele experimentale au fost conduse în dublu exemplar și s-a dat o valoare medie.

*Experimentul (ii)*

*μg plasmid electroporat/1,5 x 10<sup>6</sup> celule*

Tratament	pTKCAT	pFC1-6	pFC20	pFC12	pFC4	Supresia % CAT
5	5	2	-	-	-	75
6	5	-	2	-	-	75
7	5	-	4	-	-	62
8	5	1	1	-	-	70
9	5	-	-	4	-	51
10	5	-	-	-	2	0

Tratamentele de la 5 la 10 au fost efectuate în dublu exemplar, și s-a dat o valoare medie.

Experimentul (iii)

*μg plasmid electroporat/1,5 x 10<sup>6</sup> celule*

Tratament	pTKCAT	pFC1-6	pFC4	Supresia % CAT
11	5	2	-	66
12	5	-	2	0

Tratamentele au fost efectuate în dublu exemplar și s-a dat o valoare medie.

Experimentul (iv)

*μg plasmid electroporat*

Tratament	pTKCAT	pFC50	pFC54	pFC64	pFC65	Supresia % CAT
13	5	2	-	-	-	0
14	5	-	2	-	-	26
15	5	-	-	2	-	2
16	0	-	-	-	2	NA

Fiecare din tratamentele de la 13 la 16 au fost efectuate în patru exemplare.

Constructul de sens CAT (tratamentul 16) a produs niveluri înalte ale activității CAT. Prin urmare, % de supresie nu este aplicabil (NA).

Un număr de experimente au fost conduse înlocuind promotorul TK al pTKCAT cu promotor metalotionein uman. Când acest construct a fost co-transfectat în celule COS1 cu plasmide codificând una sau mai multe ribozime, s-a observat o marcată descreștere a activității CAT.

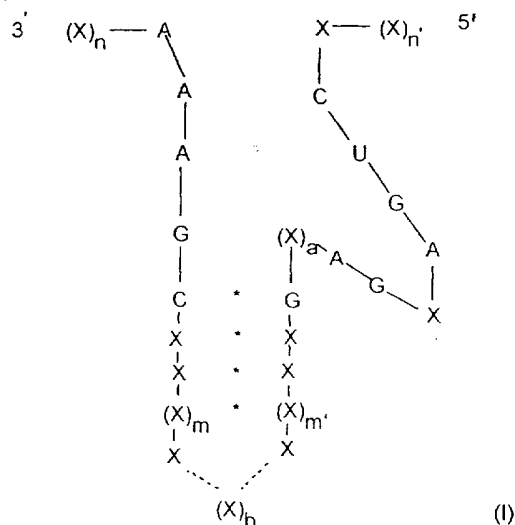
Rezultatele de mai sus demonstrează clar inactivitatea activității *in vivo* a ribozimelor în celulele umane.

Pe când eficiența ribozimelor *in vivo* se crede că ar fi cauzată de una sau mai multe regiuni catalitice, care sunt capabile de scindarea unei ținte ARN, prezența de astfel de regiuni în ribozimele de tip ARN "Antisens" poate să nu conducă, de fapt, la scindarea *in vivo* dacă întreaga moleculă ARN/ARN-antisens nu se prăbușește. Totuși, indiferent dacă molecula se prăbușește sau nu, exemplele precedente demonstrează eficacitatea ribozimei în inactivarea țintei ARN. Astfel, invenția este aplicabilă pentru toate ribozimele având o zonă catalitică capabilă să producă scindarea și o

zonă de hibridizare, indiferent unde are de fapt loc scindarea în ținta ARN. Zona de hibridizare poate fi, atât de largă, încât să facă ca, combinația ARN/ribozima să stea împreună și să prevină scindarea țintei ARN în componente separate, chiar dacă zona catalitică, ea însăși, este capabilă să producă scindare.

**Revendicări**

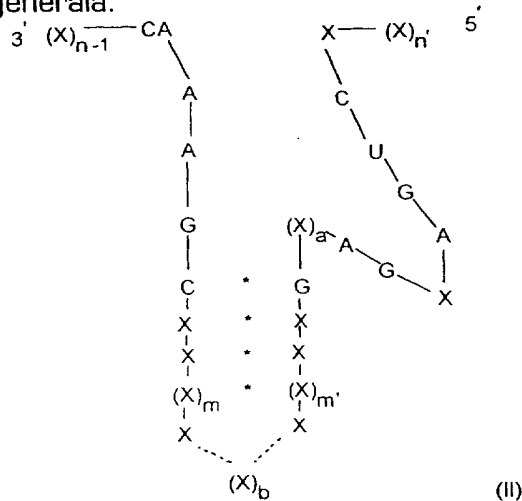
1. Compus oligoribonucleotidic, caracterizat prin aceea că are formula generală:



în care: fiecare X reprezintă o ribonucleotidă care poate fi aceeași sau diferită; în care fiecare (X)<sub>n</sub> și (X)<sub>n'</sub> reprezintă o oligoribonucleotidă (a) aptă de hibridizare cu o secvență de scindare ARN

țintă și (b) definită printr-o secvență pre-  
 determinată, care nu se leagă covalent  
 în mod firesc la secvențele A-A-A-G-C și,  
 respectiv, X-C-U-G-A-, o astfel de sec-  
 vență ARN țintă nefiind prezentă în compus; în care fiecare dintre  $n$  și  $n'$  repre-  
 zintă un număr întreg care definește nu-  
 mărul de ribonucleotide în oligonucleotidă  
 cu condiția ca suma  $n+n'$  să fie suficientă  
 pentru a permite compusului să interacționeze stabil cu secvența de ARN țintă  
 prin împerecherea de baze; în care fie-  
 care \* reprezintă împerecherea de baze  
 dintre ribonucleotidele localizate de fie-  
 care parte a acestuia; în care fiecare  
 linie continuă reprezintă o legătură chi-  
 mică ce realizează legături covalente în-  
 tre ribonucleotidele localizate pe oricare  
 parte a acestuia; în care  $a$ , reprezintă un  
 număr întreg ce definește un număr de  
 ribonucleotidele cu condiția că  $a$  poate fi  
 0 sau 1 și dacă este 0, atunci A în  
 poziția 5' față de  $(X)_a$  este legat de G, în  
 poziția 3', față de  $(X)_a$ ; în care fiecare  
 dintre  $m$  și  $m'$  reprezintă un număr în-  
 treg, care este mai mare sau egal cu 1;  
 în care fiecare dintre liniile punctate re-  
 prezintă independent, fie o legătură chi-  
 mică realizând legături covalente între  
 ribonucleotidele dispuse de fiecare parte  
 a acestuia, fie lipsa unei astfel de legături  
 chimice; și în care  $(X)_b$  reprezintă o  
 oligoribonucleotidă, care poate fi prezentă  
 sau absentă, cu condiția că  $b$  reprezintă  
 un număr întreg, mai mare sau egal cu  
 2, dacă  $(X)_b$  este prezent.

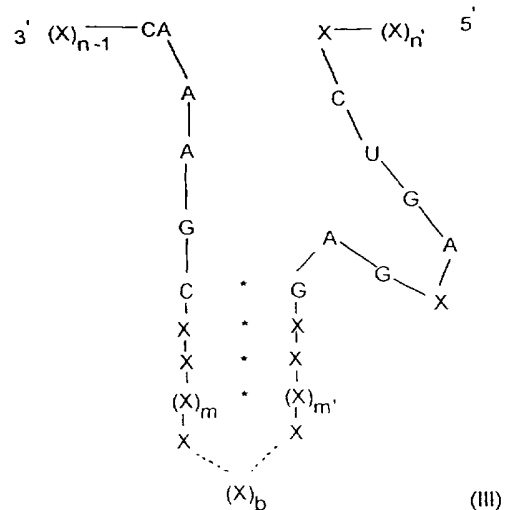
2. Compus oligoribonucleotidic,  
 caracterizat prin aceea că are formula  
 generală:



în care: fiecare X reprezintă o ribonucleo-  
 tidă, care poate fi aceeași sau diferită; în  
 care fiecare  $(X)_{n-1}$  și  $(X)_{n'}$ , reprezintă o

oligoribonucleotidă (a) aptă de hibridizare  
 cu o secvență de scindare ARN țintă și  
 (b) definită printr-o secvență predeter-  
 minată, care secvență nu poate forma fi-  
 resc o legătură covalentă la secvențele  
 C-A-A-G-C și, respectiv, X-C-U-G-A-, o  
 astfel de secvență ARN țintă nefiind pre-  
 zentă în compus; în care fiecare dintre  $n$   
 și  $n'$  reprezintă un număr întreg, care de-  
 finește numărul de ribonucleotide în oli-  
 gonucleotidă cu condiția ca suma  $n+n'$  să  
 fie suficientă pentru a permite compusu-  
 lui să interacționeze stabil cu secvența  
 de ARN țintă prin împerecherea de baze;  
 în care fiecare \* reprezintă împereche-  
 rea de baze dintre ribonucleoti-dele loca-  
 lizate de fiecare parte a acestuia; în care  
 fiecare linie continuă reprezintă o legă-  
 tură chimică ce realizează legături cova-  
 lente între ribonucleotidele localizate pe  
 oricare parte a acestuia; în care  $a$ , repre-  
 zintă un număr întreg ce definește un  
 număr de ribonucleotidele cu condiția că  
 $a$  poate fi 0 sau 1 și dacă este 0, atunci  
 A în poziția 5' față de  $(X)_a$  este legat de G  
 în poziția 3' față de  $(X)_a$ ; în care fiecare  
 dintre  $m$  și  $m'$  reprezintă un număr în-  
 treg, care este mai mare sau egal cu 1;  
 în care fiecare dintre liniile punctate re-  
 prezintă independent, fie o legătură chi-  
 mică care realizează legături covalente  
 între ribonucleotidele dispuse de oricare  
 parte a acestuia, fie lipsa unei astfel de  
 legături chimice; și în care  $(X)_b$  reprezintă  
 o oligoribonucleotidă, care poate fi pre-  
 zentă sau absentă, cu condiția că  $b$  re-  
 prezintă un număr întreg, mai mare sau  
 egal cu 2, dacă  $(X)_b$  este prezent.

3. Compus oligoribonucleotidic,  
 caracterizat prin aceea că are formula  
 generală:



în care: fiecare X reprezintă o ribonucleotidă care poate fi aceeași sau diferită; în care fiecare  $(X)_{n-1}$  și  $(X)_n$ , reprezintă o oligoribonucleotidă (a) aptă de hibridizare cu o secvență de scindare ARN țintă și (b) definită printr-o secvență predefinită, care secvență, nu poate forma, în mod firesc, o legătură covalentă la secvențele C-A-A-G-C și, respectiv, X-C-U-G-A-, o astfel de secvență țintă ARN nefiind prezentă în compus; în care, fiecare dintre  $n$  și  $n'$  reprezintă un număr întreg, care definește numărul de ribonucleotide în oligonucleotidă cu condiția ca, suma  $n+n'$  să fie suficientă pentru a permite compusului să interacționeze stabil cu secvența de ARN țintă prin împerecherea de baze; în care fiecare \* reprezintă împerecherea de baze dintre ribonucleotidele localizate de fiecare parte a acestuia; în care fiecare linie continuă reprezintă o legătură chimică ce realizează legături covalente între ribonucleotidele localizate pe oricare parte a acestuia; în care fiecare dintre  $m$  și  $m'$  reprezintă un număr întreg, care este mai mare sau egal cu 1; în care fiecare dintre liniile punctate reprezintă independent, fie o legătură chimică realizând legături covalente între ribonucleotidele dispuse de fiecare parte a acestuia, fie lipsa unei astfel de legături chimice; și în care  $(X)_b$  reprezintă o oligoribonucleotidă, care poate fi prezentă sau absentă, cu condiția că  $b$  reprezintă un număr întreg, mai mare sau egal cu 2, dacă  $(X)_b$  este prezent.

4. Compus oligoribonucleotidic, conform cu oricare dintre revendicările 1, 2 sau 3, **caracterizat prin aceea că** suma  $n+n'$  este mai mare sau egală cu 14.

5. Compus oligoribonucleotidic, conform cu oricare dintre revendicările 1, 2, 3 sau 4, **caracterizat prin aceea că** fiecare  $n$  și  $n'$  este mai mare decât 6.

6. Compus oligoribonucleotidic, conform cu oricare dintre revendicările 1, 2, 3, 4 sau 5, **caracterizat prin aceea că** secvența țintă ARN de scindare este

o secvență virală.

7. Procedeu de obținere a compusului, conform cu oricare dintre revendicările 1, 2, 3, 4, 5 sau 6, **caracterizat prin aceea că**, cuprinde etapele de: a) legare într-un vector de transfer cuprins în ADN, ARN sau o combinație a acestora, a unei secvențe nucleotidice corespunzând compusului respectiv; b) transcriptia secvenței nucleotidice din etapa (a) cu o ARN polimerază; și c) recuperarea compusului.

8. Metodă de inactivare a ARN țintă într-o celulă, **caracterizată prin aceea că**, cuprinde contactarea ARN țintă din celulă cu compusul conform cu oricare dintre revendicările 1, 2, 3, 4, 5 sau 6, compusul fiind capabil să interacționeze prin împerechere de baze cu secvența ARN țintă în astfel de condiții, încât compusul interacționează stabil prin împerechere de baze cu ARN țintă, iar ARN țintă este scindat.

9. Metodă, conform revendicării 8, **caracterizată prin aceea că** ARN țintă este o transcriptie a unei gene care este endogenă față de celulă.

10. Metodă, conform revendicării 8, **caracterizată prin aceea că** ARN țintă este o transcriptie a unei gene care este exogenă față de celulă.

11. Metodă, conform cu oricare dintre revendicările 8, 9 sau 10, **caracterizată prin aceea că**, celula este procarionată sau eucariotă.

12. Metodă, conform revendicării 11, **caracterizată prin aceea că** celula este o celulă vegetală sau animală.

13. Metodă, conform revendicării 12, **caracterizată prin aceea că**, celula vegetală este o componentă a unei plante.

14. Metodă, conform revendicării 8, **caracterizată prin aceea că**, compusul este format în interiorul celulei.

15. Metodă, conform revendicării 8, **caracterizată prin aceea că**, compusul este format în exteriorul celulei.



# RO 114469 B1

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> C 12 N 9/22;  
C 12 P 19/34;

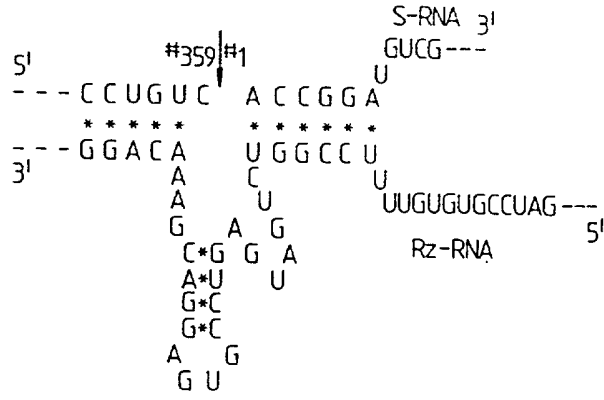


Fig. 2a

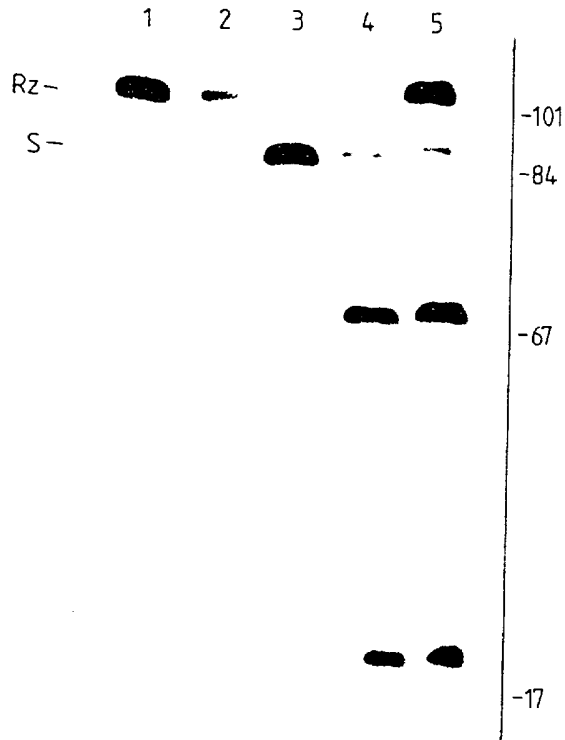


Fig. 2b

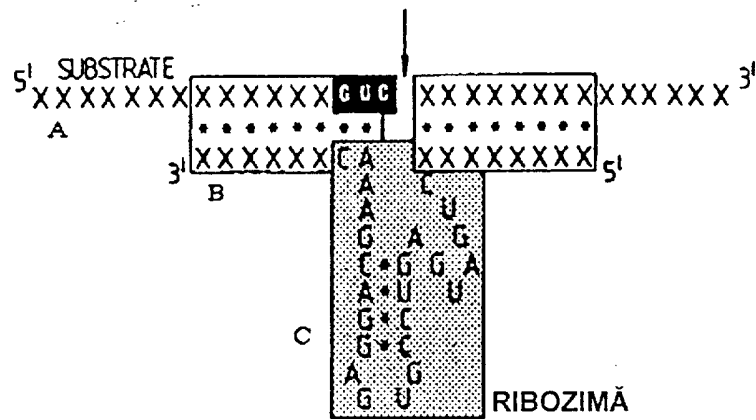


Fig. 3

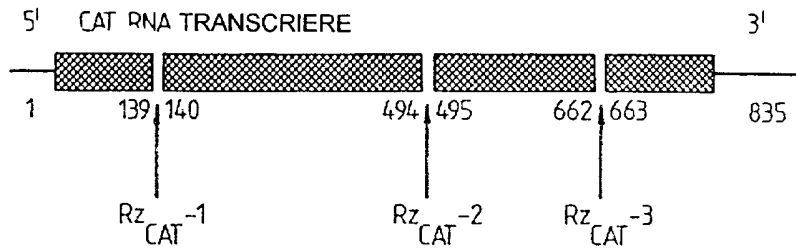


Fig. 4a

ZONA RzCAT-1

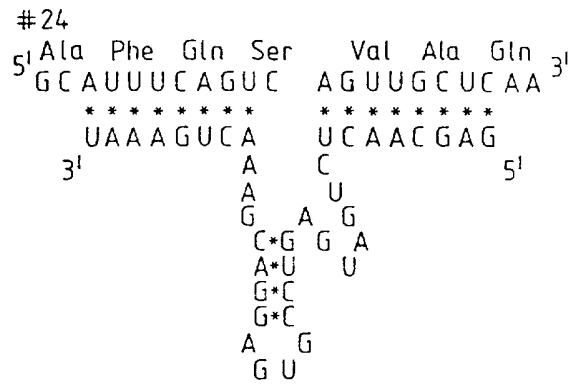
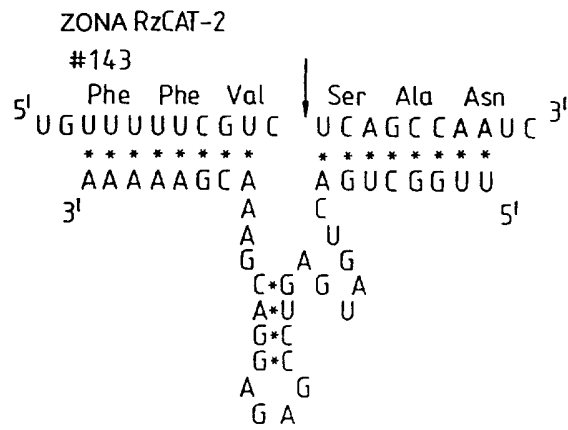


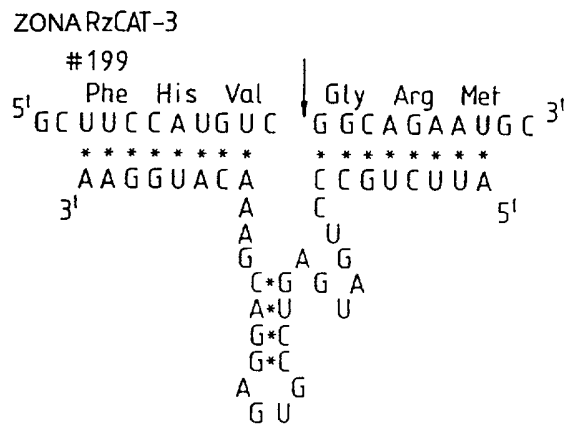
Fig. 4b

# RO 114469 B1

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> C 12 N 9/22;  
C 12 P 19/34;



*Fig. 4c*



*Fig. 4d*

# RO 114469 B1

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> C 12 N 9/22;  
C 12 P 19/34;

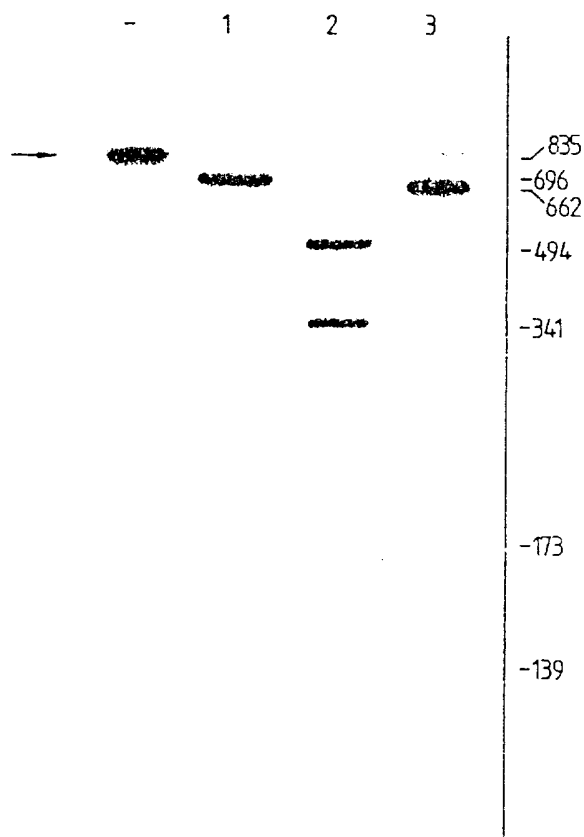


Fig. 5a

RO 114469 B1

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> C 12 N 9/22;  
C 12 P 19/34;

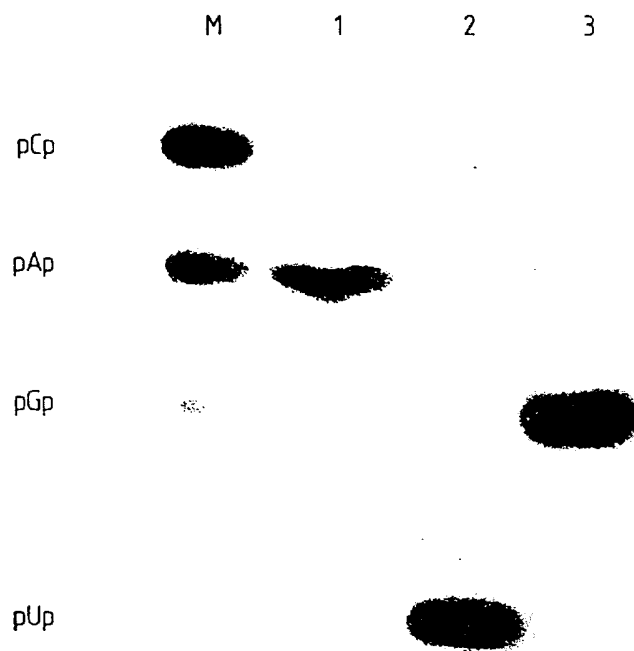


Fig. 5b

# RO 114469 B1

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> C 12 N 9/22;  
C 12 P 19/34;

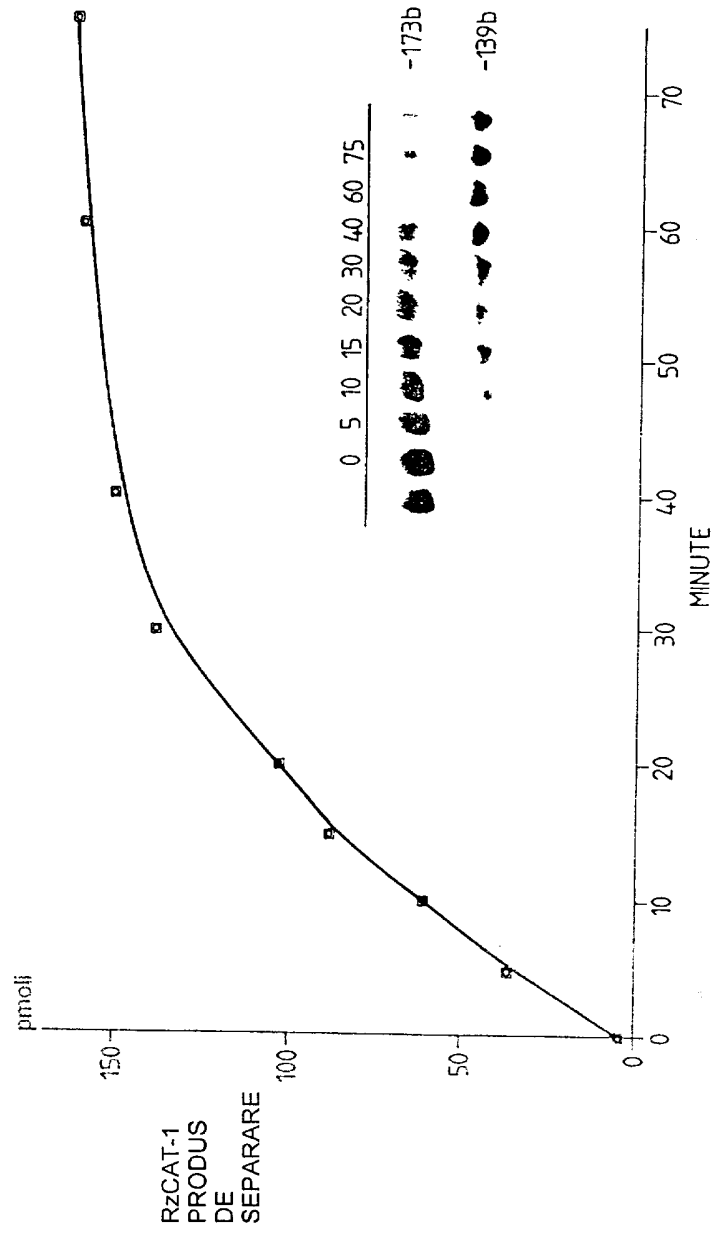


Fig. 6

# RO 114469 B1

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> C 12 N 9/22;  
C 12 P 19/34;

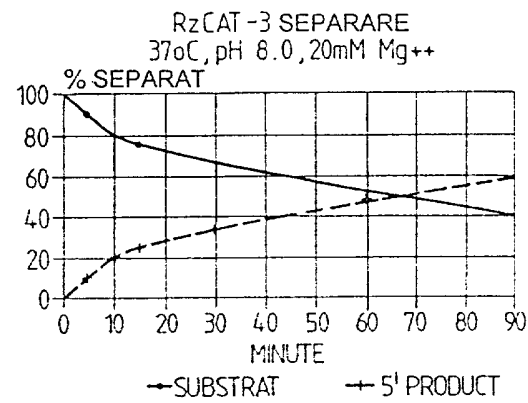
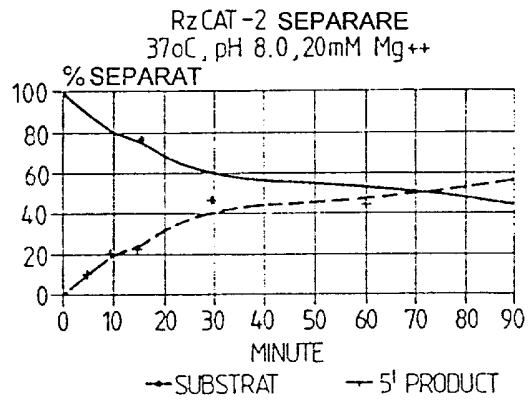
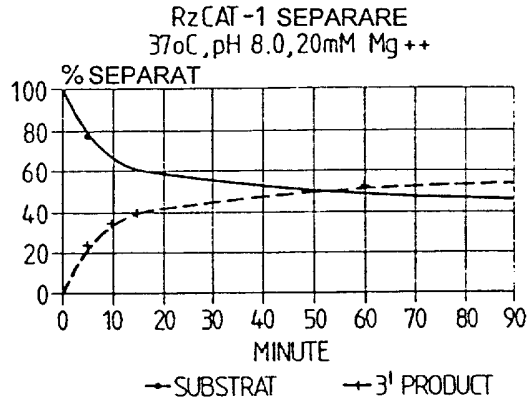


Fig.7

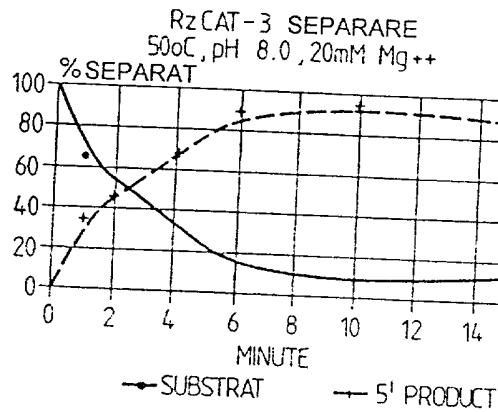
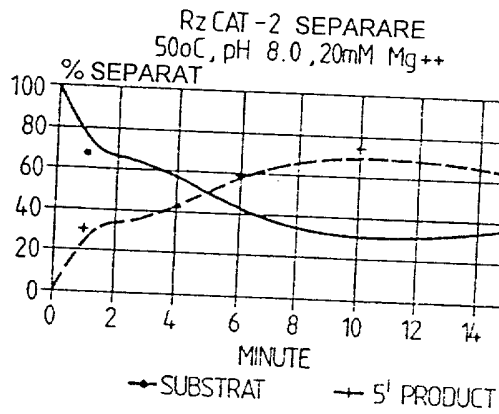
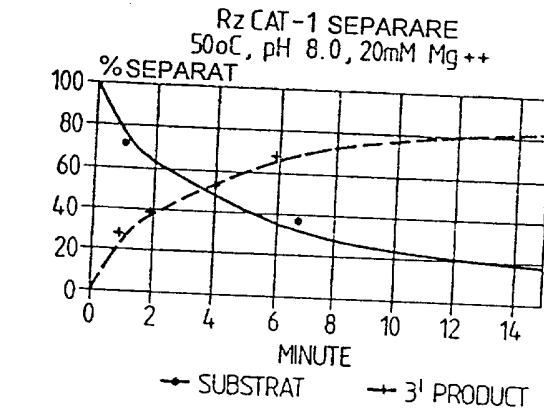


Fig. 7(cont.)

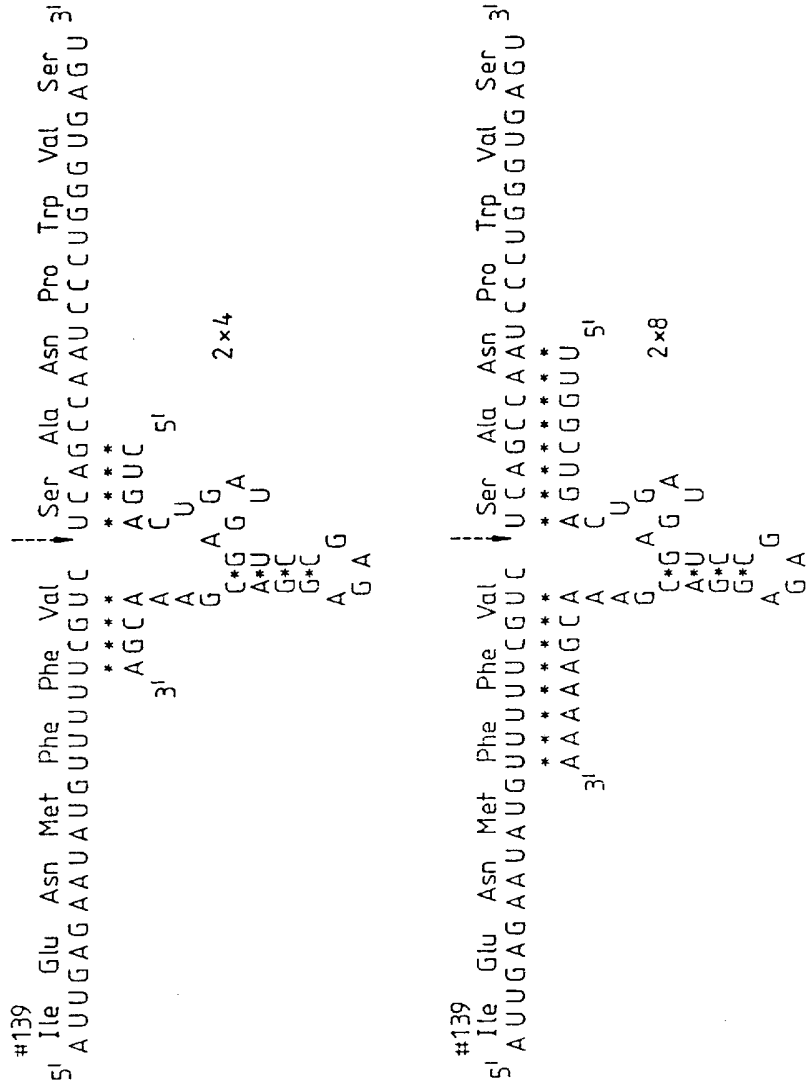


Fig. 8a



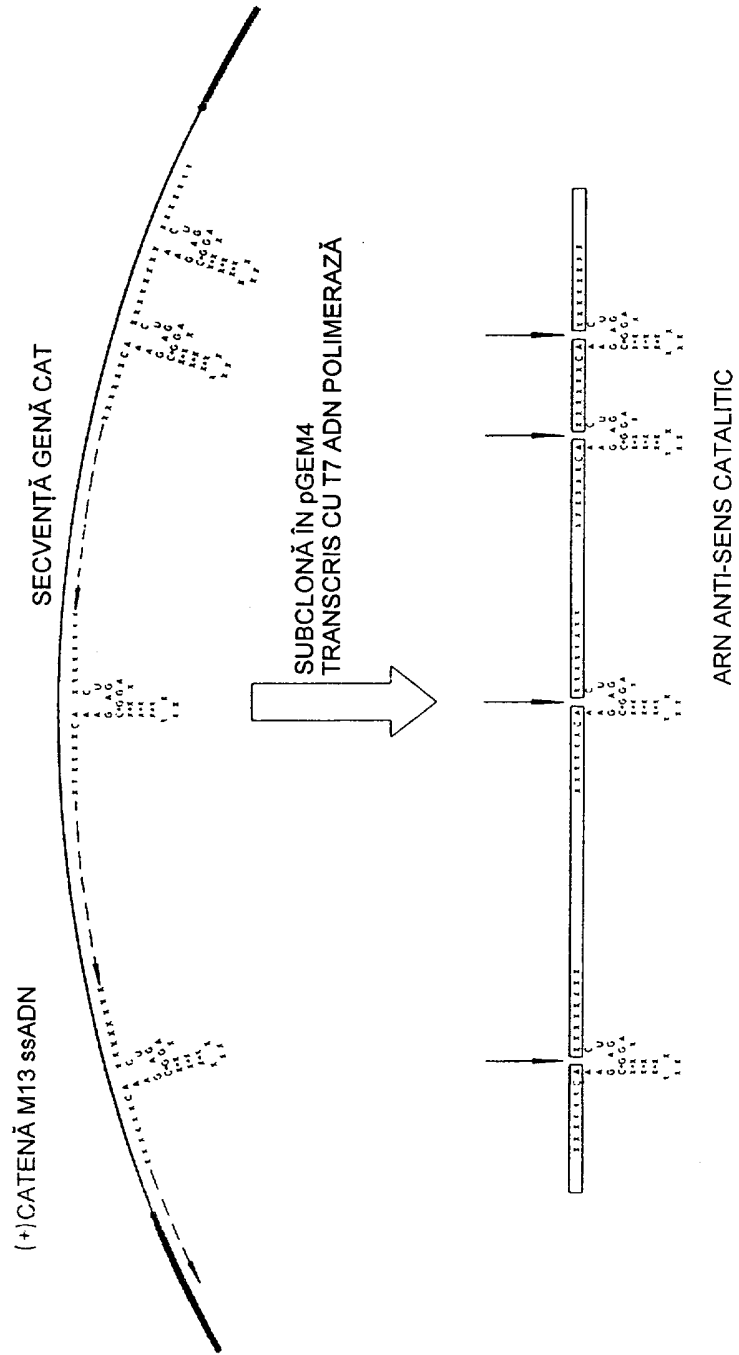


Fig. 9



RIBOZIMĂ CEV9x(+) 5' GAAGUCCUUCAG 3'  
 RIBOZIMĂ CEV9x(-) 5' AGGGUCAGGUGA 3'  
 RIBOZIMĂ CEV25x(+) 5' GAAGUCCGAGGUC 3'

Fig. 11

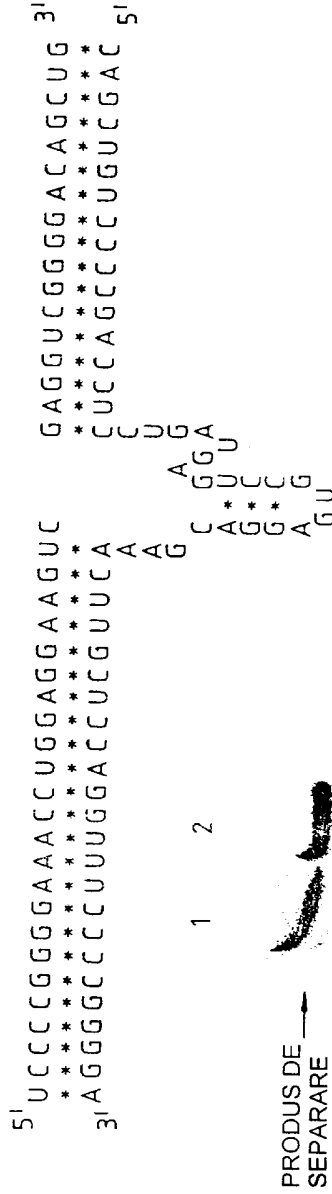
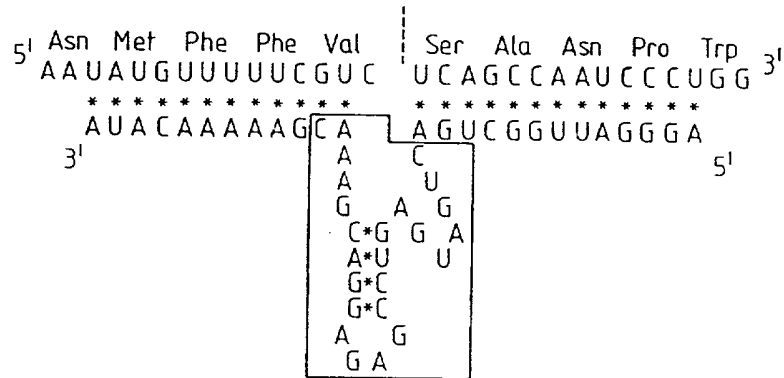


Fig. 12b

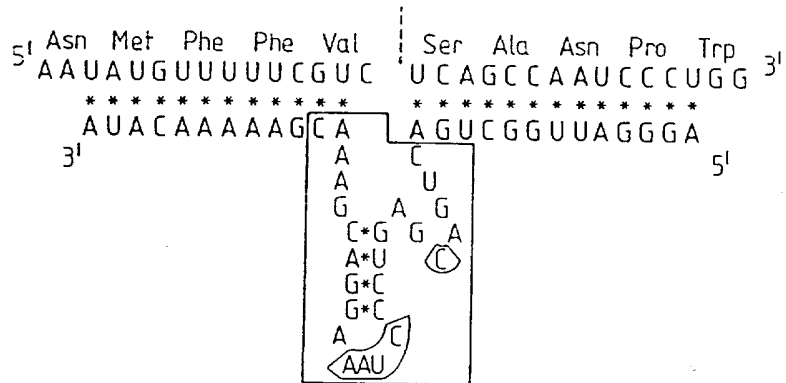
Fig. 12a

# RO 114469 B1

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> C 12 N 9/22;  
C 12 P 19/34;



**Fig. 13a**



**Fig. 13b**

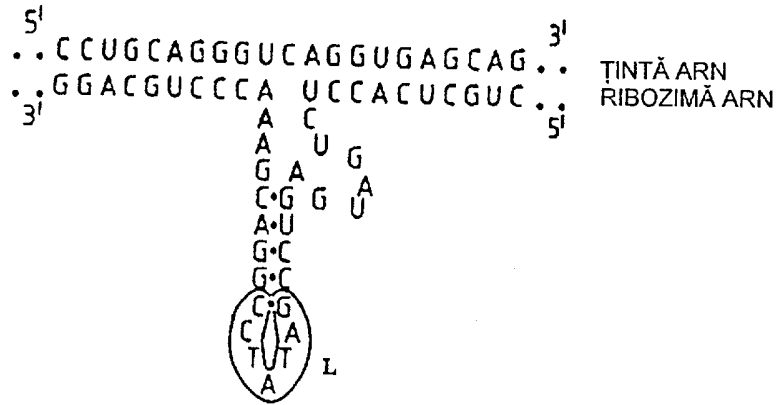


Fig. 14a

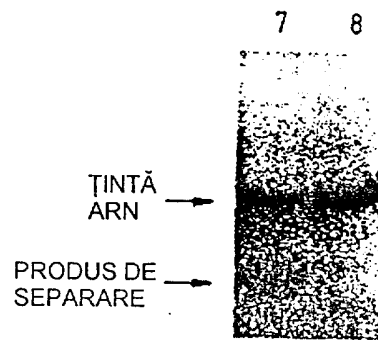


Fig. 14b

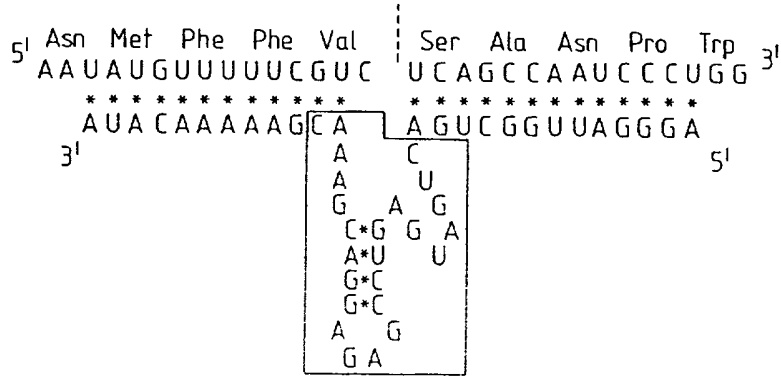


Fig. 15a

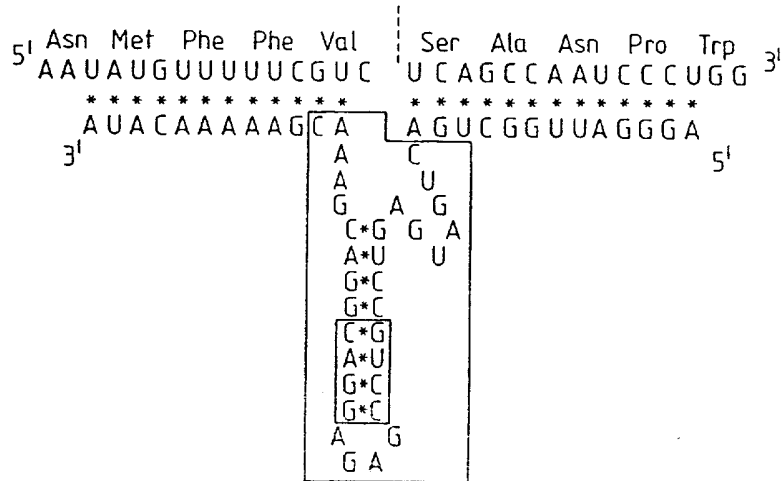


Fig. 15 b

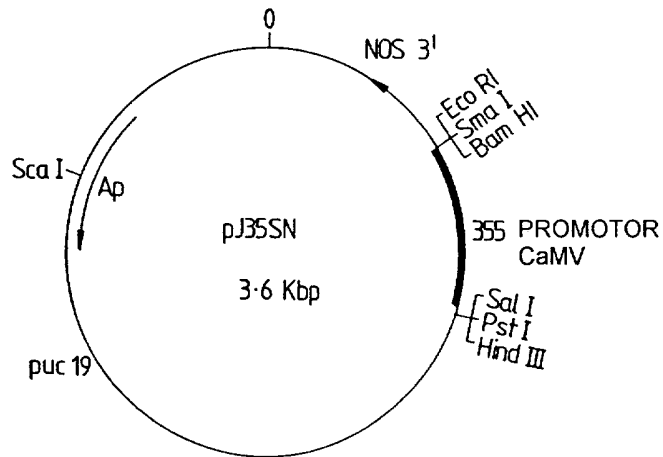


Fig. 16

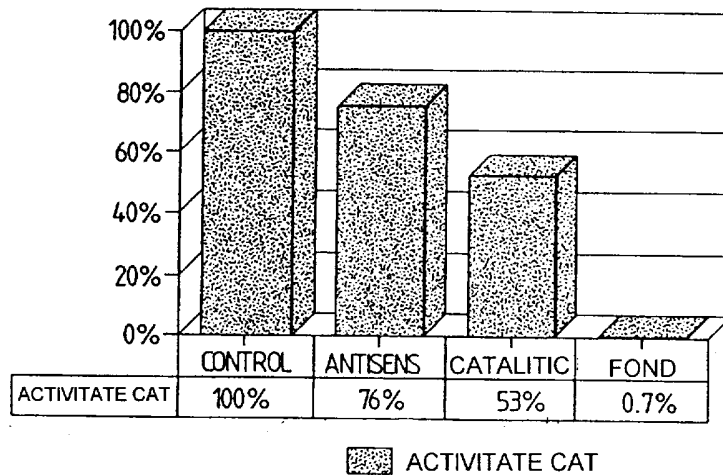


Fig. 17