



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 215 494**

⑤① Int. Cl. 7: **C12Q 1/68**

⑫

TRADUCCIÓN DE REIVINDICACIONES DE SOLICITUD
DE PATENTE EUROPEA

T1

⑧⑥ Número de solicitud: **01985833 .1**

⑧⑥ Fecha de presentación de la solicitud: **29.11.2001**

⑧⑦ Número de presentación de la solicitud: **1407044**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2004**

③⑩ Prioridad: **01.12.2000 EP 00126325**
30.03.2001 US 279661 P
30.03.2001 WO PCT/US01/10188

④③ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2004

④⑥ Fecha de publicación de la traducción de las
reivindicaciones: **16.10.2004**

⑦① Solicitante/s: **MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.**
Hofgartenstrasse, 8
80539 München, DE
EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR
MOLEKULARBIOLOGIE

⑦② Inventor/es: **Tuschl, Thomas;**
Elbashir, Sayda;
Lendeckel, Winfried y
Wilm, Matthias

⑦④ Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

⑤④ Título: **Moléculas pequeñas de RNA que median la interferencia de RNA.**

ES 2 215 494 T1

REIVINDICACIONES

1. Molécula de RNA bicatenario aislada, en la cual cada cadena de RNA tiene una longitud de 19-25 nucleótidos, en la cual cada molécula de RNA es capaz de modificaciones de ácido nucleico específicas en cuanto a la diana.

2. La molécula de RNA de la reivindicación 1, en la cual al menos una cadena tiene un saliente 3' de 1-5 nucleótidos.

3. La molécula de RNA de la reivindicación 1 ó 2, capaz de interferencia de RNA específica en cuanto a la diana y/o metilación del DNA.

4. La molécula de RNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la cual cada cadena tiene una longitud de 19-23, particularmente de 20-22 nucleótidos.

5. La molécula de RNA de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en la cual el saliente 3' es de 1-3 nucleótidos.

6. La molécula de RNA de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en la cual el saliente 3' está estabilizado contra la degradación.

7. La molécula de RNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que contiene al menos un análogo de nucleótido modificado.

8. La molécula de RNA de la reivindicación 7, en la cual el análogo de nucleótido modificado se selecciona de ribonucleótidos modificados en el azúcar o en la cadena principal.

9. La molécula de RNA de acuerdo con la reivindicación 7 ó 8, en la cual el análogo de nucleótido es un ribonucleótido modificado en el azúcar, en el cual el grupo 2'-OH está reemplazado por un grupo seleccionado de H, OR, R, halo, SH, SR¹, NH₂, NHR, NR² o CN, en el cual R es C₁-C₆ alquilo, alqueno o alquino y halo es F, Cl, Br o I.

10. La molécula de RNA de la reivindicación 7 u 8, en la cual el análogo de nucleótido es un ribonucleótido modificado en la cadena principal que contiene un grupo fosforilado.

11. La molécula de RNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que tiene una secuencia que tiene una identidad de al menos 50 por ciento con una molécula diana de mRNA predeterminada.

12. La molécula de RNA de la reivindicación 11, en la cual la identidad es al menos 70 por ciento.

13. Un método de preparación de una molécula de RNA bicatenario de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 que comprende los pasos:

(a) sintetizar dos cadenas de RNA cada una de las cuales tiene una longitud de 19-25 nucleótidos, siendo dichas cadenas de RNA capaces de formar una molécula de RNA bicatenario,

(b) combinar las cadenas de RNA sintetizadas en condiciones en las cuales se forma una molécula de RNA bicatenario, que es susceptible de modificaciones de ácido nucleico específicas en cuanto a la diana.

14. El método de la reivindicación 13, en el cual las cadenas de RNA se sintetizan químicamente.

15. El método de la reivindicación 13, en el cual las cadenas de RNA se sintetizan enzimáticamente.

16. Un método de mediación de modificaciones de ácido nucleico específicas en cuanto a la diana en una célula o un organismo que comprende los pasos de:

(a) poner en contacto dicha célula u organismo con la molécula de RNA bicatenario de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 en condiciones en las cuales pueden producirse modificaciones de ácido nucleico específicas en cuanto a la diana, y

(b) mediar una modificación de ácido nucleico específica en cuanto a la diana efectuada por el RNA bicatenario hacia un ácido nucleico diana que tiene una porción de secuencia que corresponde sustancialmente al RNA bicatenario.

17. El método de la reivindicación 16, en el cual la modificación de ácido nucleico es interferencia de RNA y/o metilación de DNA.

18. El método de la reivindicación 16 y 17 en el cual dicha puesta en contacto comprende introducir dicha molécula de RNA bicatenario en una célula diana en la cual puede producirse la modificación de ácido nucleico específica en cuanto a la diana.

19. El método de la reivindicación 18, en el cual la introducción comprende un suministro o inyección mediado por un vehículo.

20. Uso del método de una cualquiera de las reivindicaciones 16-19 para determinar la función de un gen en una célula o un organismo.

21. Uso del método de una cualquiera de las reivindicaciones 16-19 para modulación de la función de un gen en una célula o un organismo.

22. El uso de la reivindicación 20 ó 21, en el cual el gen está asociado con una condición patológica.

23. El uso de la reivindicación 22, en el cual el gen es un gen asociado con un patógeno.

24. El uso de la reivindicación 23, en el cual el gen es un gen vírico.

25. El uso de la reivindicación 22, en el cual el gen es un gen asociado con un tumor.

26. El uso de la reivindicación 22, en el cual el gen es un gen asociado a una enfermedad autoinmune.

27. Composición farmacéutica que contiene como agente activo al menos una molécula de RNA bicatenario de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y un vehículo farmacéutico.

28. La composición de la reivindicación 27 para aplicaciones de diagnóstico.

29. La composición de la reivindicación 27 para aplicaciones terapéuticas.

30. Una célula eucariota o un organismo eucariota no humano que exhibe un fenotipo mutado por modificación génica ("knockout") específico en cuanto al gen diana en la cual dicha célula u organismo está transfectada con al menos una molécula de RNA bicatenario capaz de inhibir la expresión de un gen diana endógeno o con un DNA que codifica al menos una molécula de RNA bicatenario capaz de inhibir la expresión de al menos un gen diana endógeno.

31. La célula u organismo de la reivindicación 30, que es una célula de mamífero.

32. La célula u organismo de la reivindicación 31 que es una célula humana.

33. La célula u organismo de una cualquiera de las reivindicaciones 30-32 que está transfectada adicionalmente con al menos un ácido nucleico diana exógeno que codifica la proteína diana o una forma variante o mutada de la proteína diana, en la cual dicho ácido nucleico diana exógeno difiere del gen diana endógeno en el nivel de ácido nucleico de tal modo

que la expresión del ácido nucleico diana exógeno se ve sustancialmente menos inhibida por la molécula de RNA bicatenario que la expresión del gen diana endógeno.

34. La célula o el organismo de la reivindicación 33 en la cual el ácido nucleico diana exógeno está fusionado con una secuencia de ácido nucleico adicional que codifica un péptido o polipéptido detectable.

35. Uso de la célula u organismo de una cualquiera de las reivindicaciones 30-34 para procedimientos analíticos.

36. El uso de la reivindicación 35 para el análisis de perfiles de expresión génica.

37. El uso de la reivindicación 35 para un análisis del proteoma.

38. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 35-37 en el cual se efectúa un análisis de una forma variante o mutante de la proteína diana codificada por un ácido nucleico diana exógeno.

39. El uso de la reivindicación 38 para identificar dominios funcionales de la proteína diana.

40. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 35-39 en el cual se efectúa una comparación de al menos dos células u organismos seleccionados de:

- (i) una célula de control u organismo de control sin inhibición del gen diana,
- (ii) una célula u organismo con inhibición del gen diana y
- (iii) una célula u organismo con inhibición del gen diana más complementación del gen diana por un ácido nucleico exógeno.

41. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 35-40 en el cual el análisis comprende un análisis funcional y/o fenotípico.

42. Uso de una célula de una cualquiera de las reivindicaciones 30-34 para procedimientos preparativos.

43. El uso de la reivindicación 41 para el aislamiento de proteínas o complejos proteínicos a partir de células eucariotas.

44. El uso de la reivindicación 43 para el aislamiento de complejos proteínicos de peso molecular alto que pueden contener opcionalmente ácidos nucleicos.

45. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 35-44 en un procedimiento para identificación y/o caracterización de agentes farmacológicos.

46. Un sistema para identificación y/o caracterización de un agente farmacológico que actúa sobre al menos una proteína diana que comprende:

- (a) una célula eucariota o un organismo eucariota no humano capaz de expresar al menos un gen diana que codifica dicha al menos una proteína diana,
- (b) al menos una molécula de RNA bicatenario capaz de inhibir la expresión de dicho al menos un gen diana endógeno, y
- (c) una sustancia de ensayo o un conjunto de sustancias de ensayo en lo(s) cual(es) deben identificarse y/o caracterizarse las propiedades farmacológicas de dicha sustancia de ensayo o dicho conjunto.

47. El sistema de la reivindicación 46 que comprende adicionalmente:

- (d) al menos un ácido nucleico diana exógeno que codifica la proteína diana o una forma variante o mutada de la proteína diana, en el cual dicho ácido nucleico diana exógeno difiere del gen diana endógeno en el nivel de ácido nucleico de tal modo que la expresión del ácido nucleico diana exógeno se ve sustancialmente menos inhibida por la molécula de RNA bicatenario que la expresión del gen diana endógeno.

FIGURA 1A

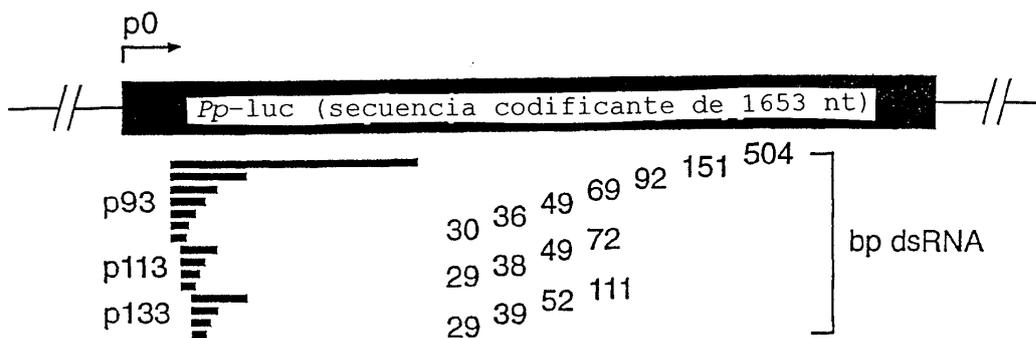


FIGURA 1B

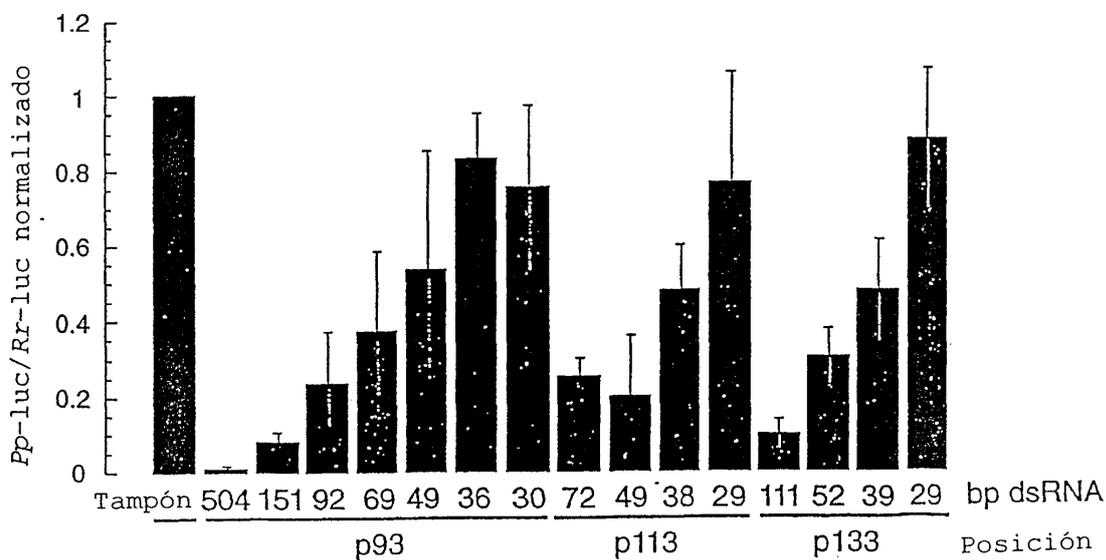


FIGURA 2

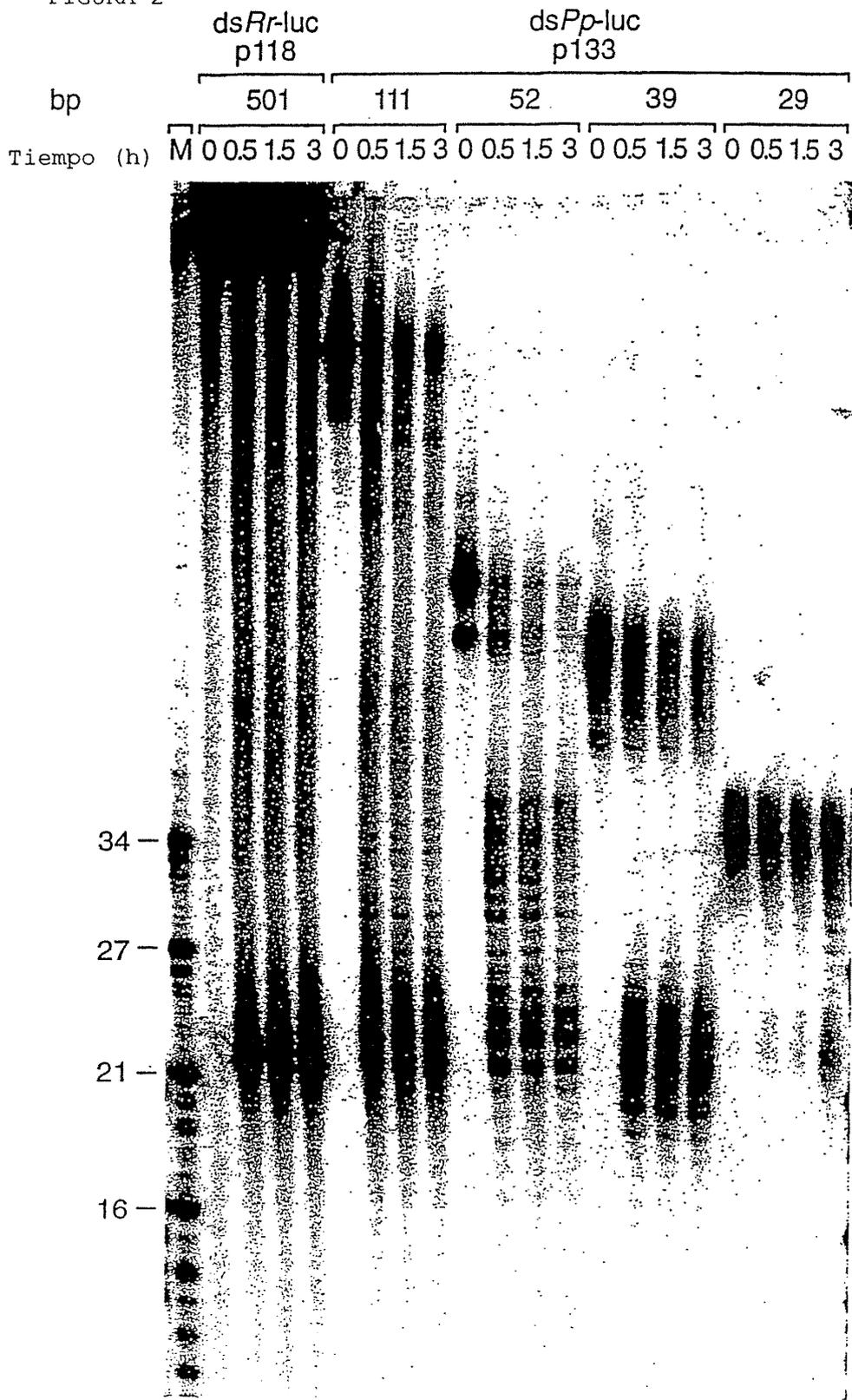


FIGURA 3A

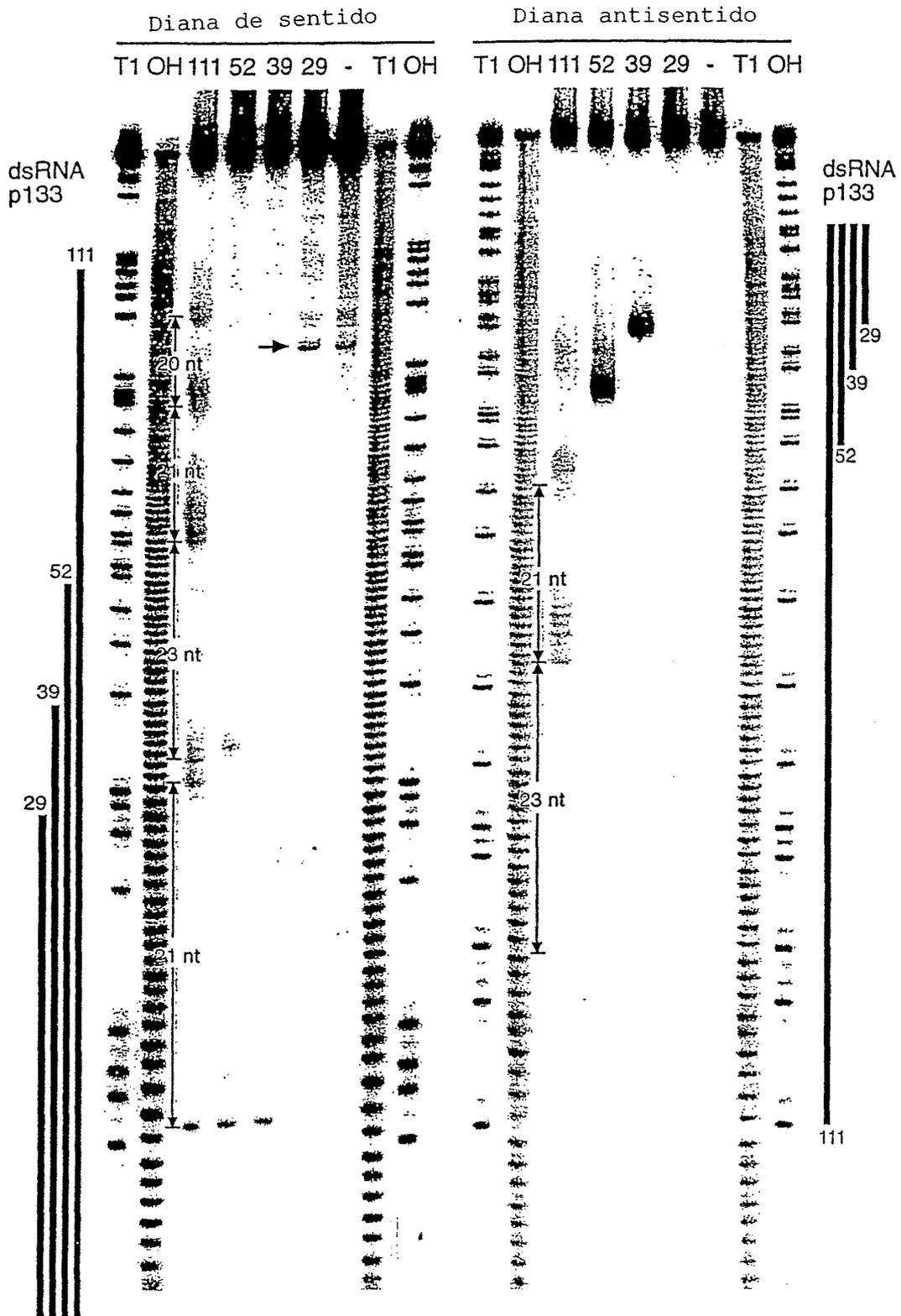
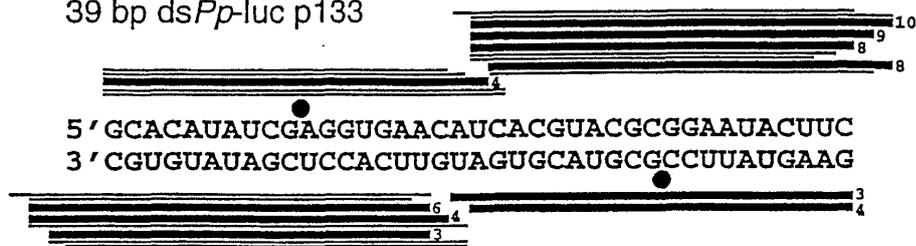
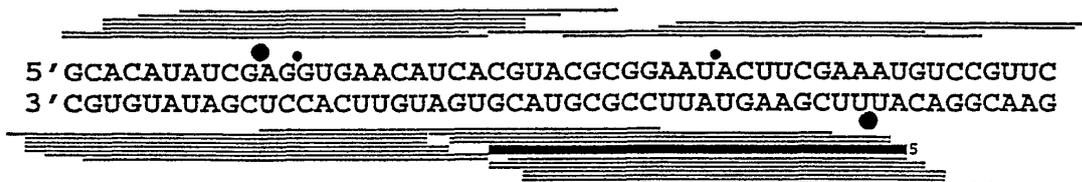


FIGURA 4A

39 bp ds*Pp*-luc p133



52 bp ds*Pp*-luc p133



111 bp ds*Pp*-luc p133

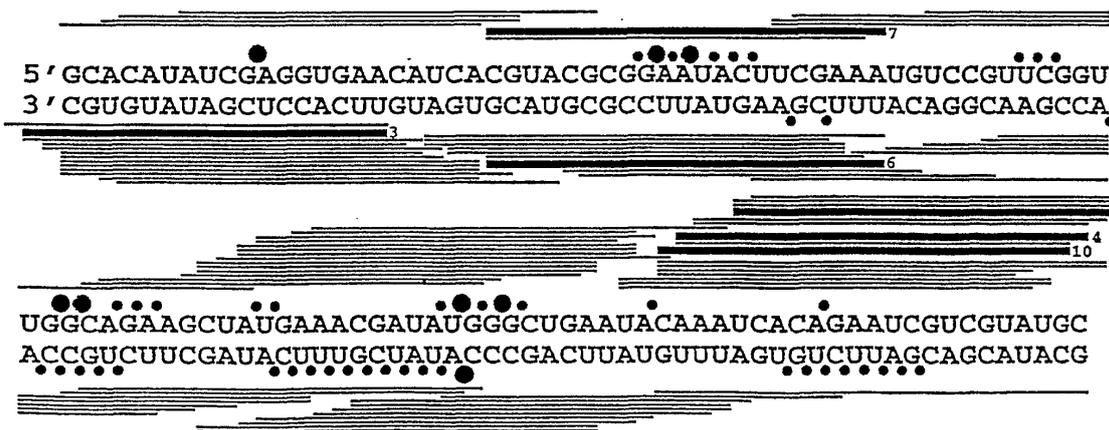


FIGURA 4B

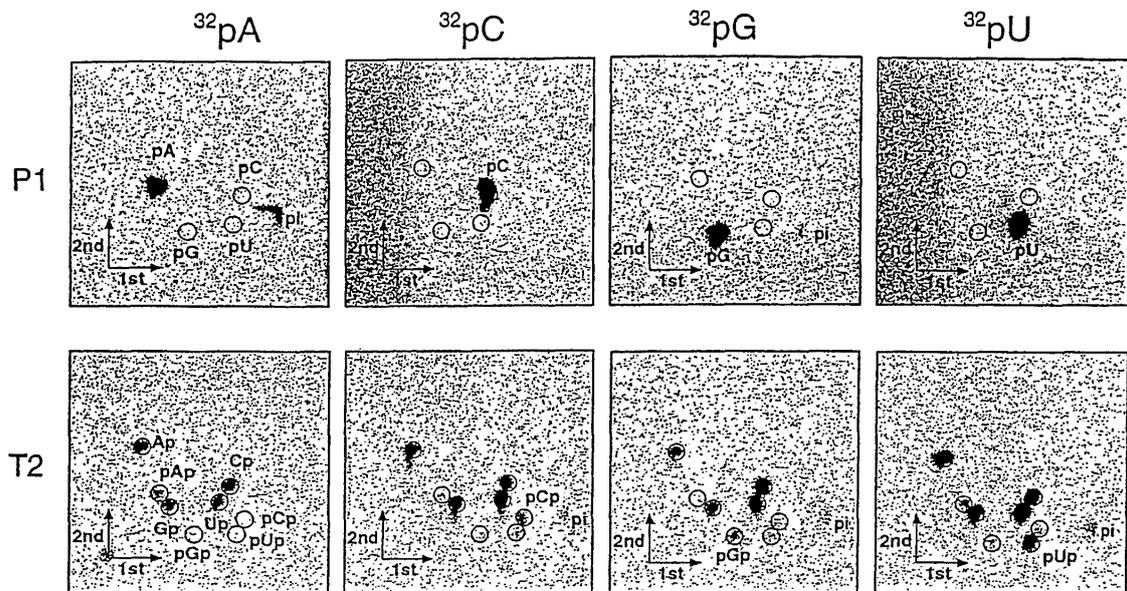


FIGURA 5A

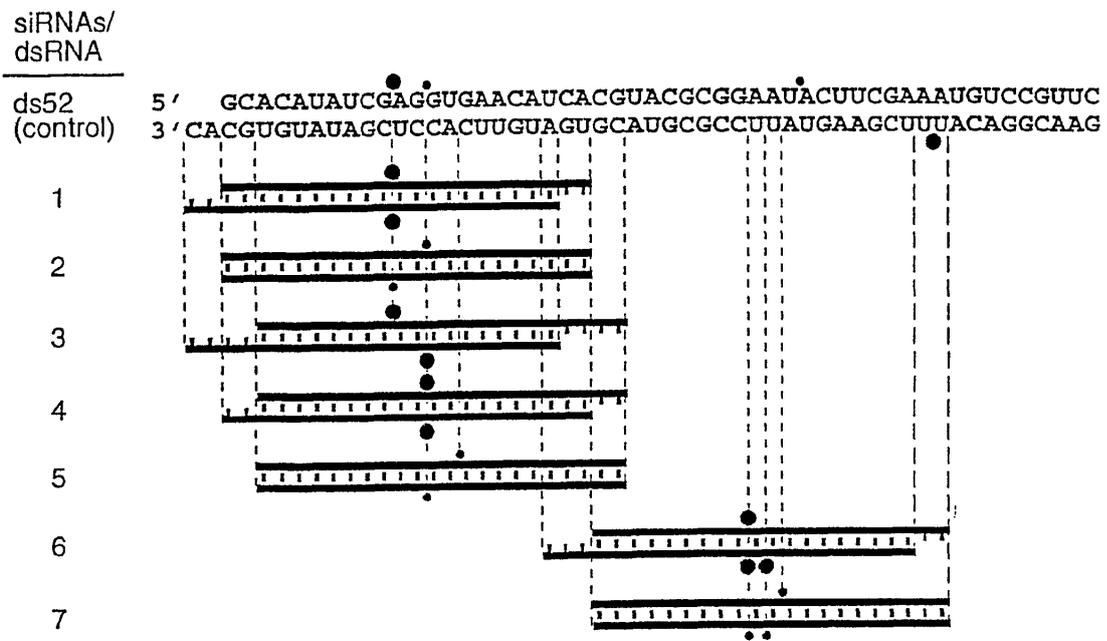


FIGURA 5B

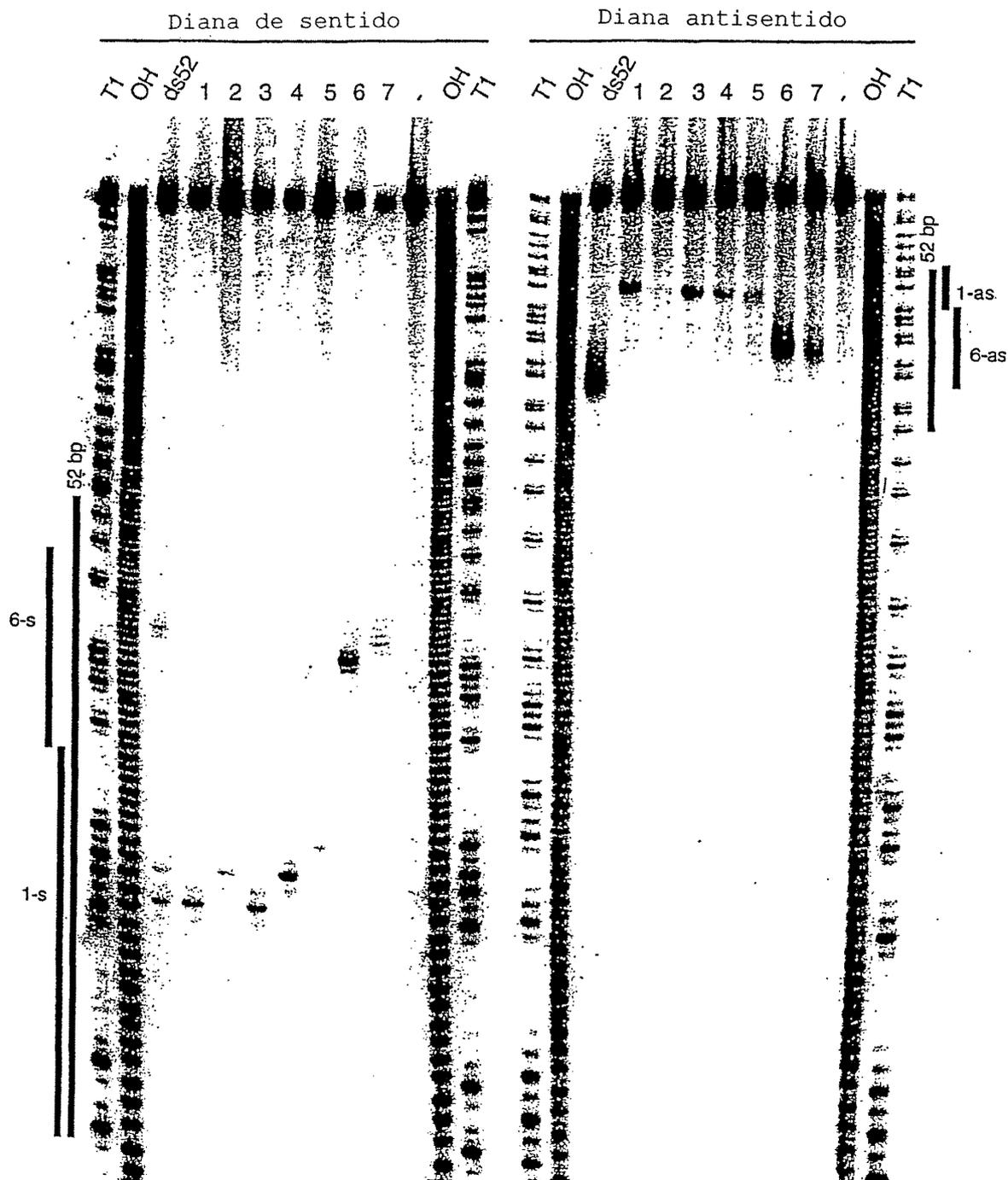


FIGURA 6A

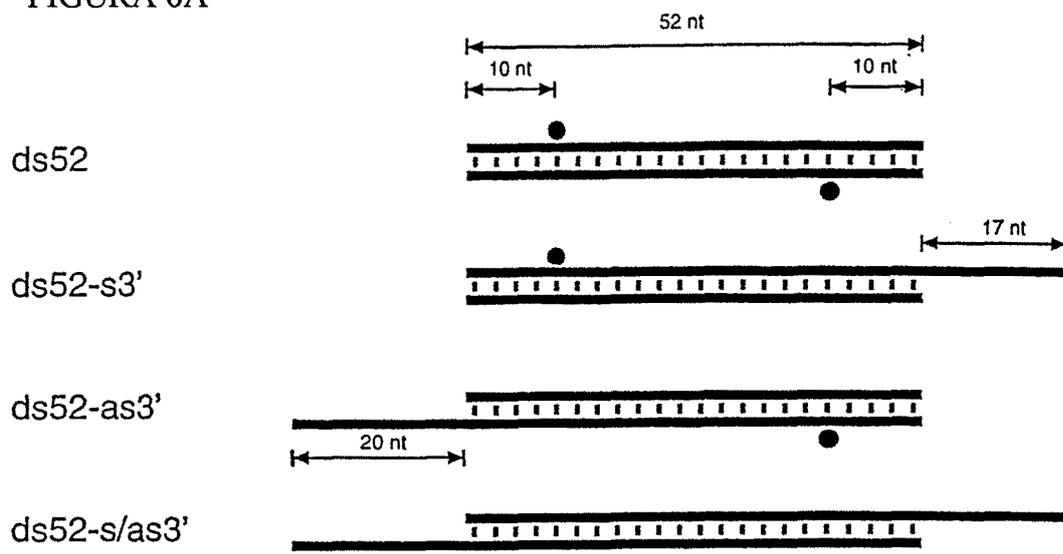
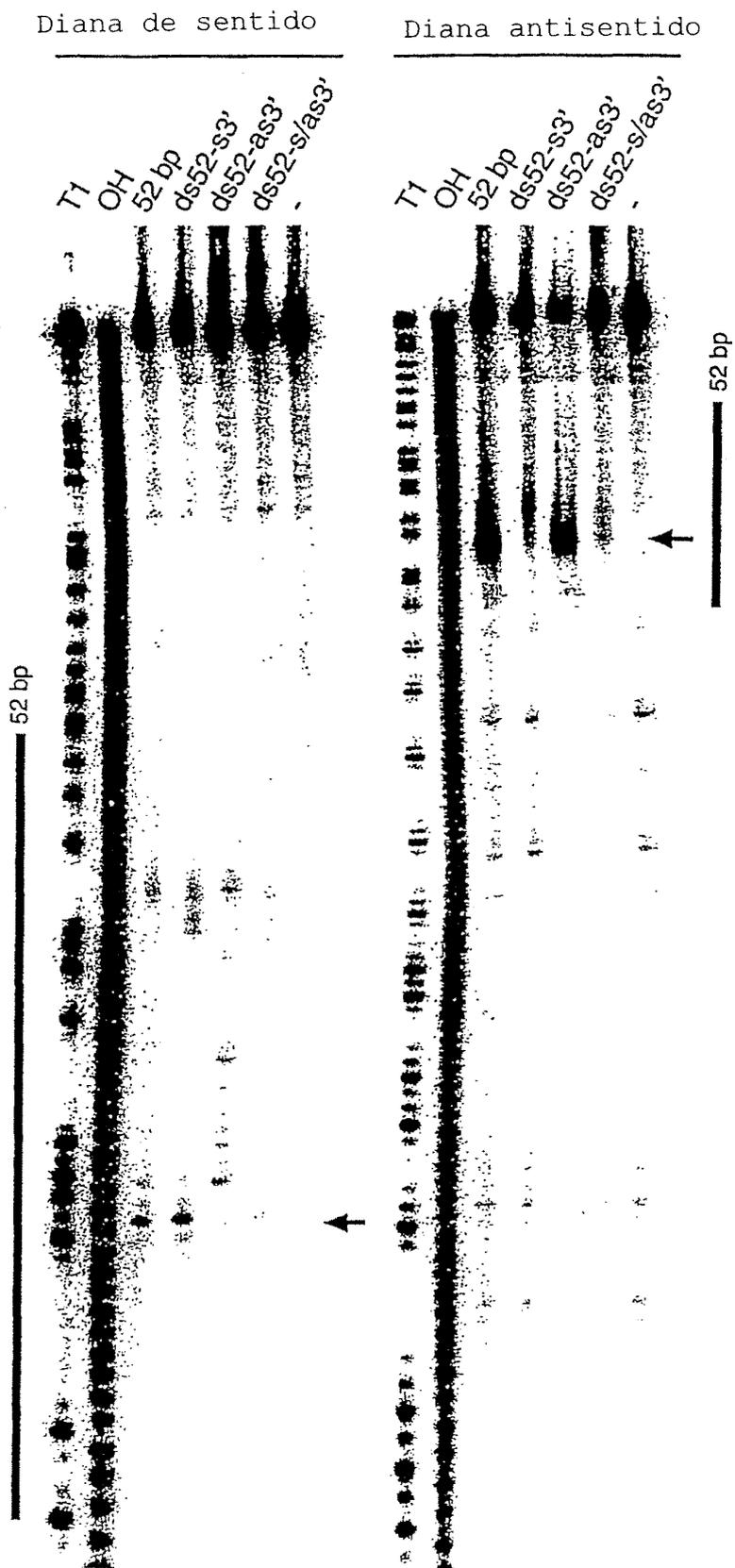


FIGURA 6B



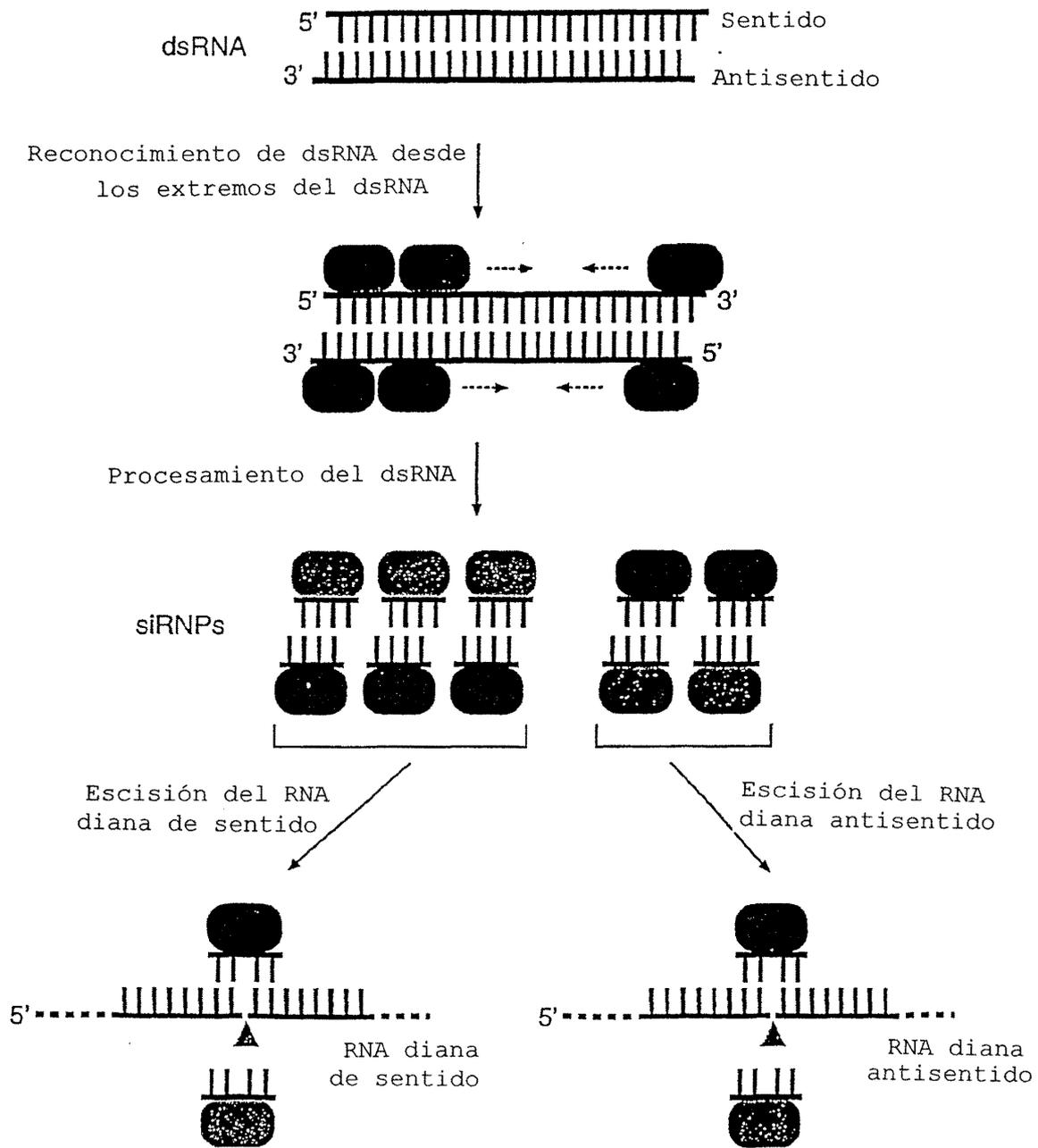
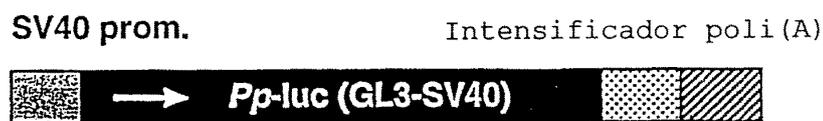
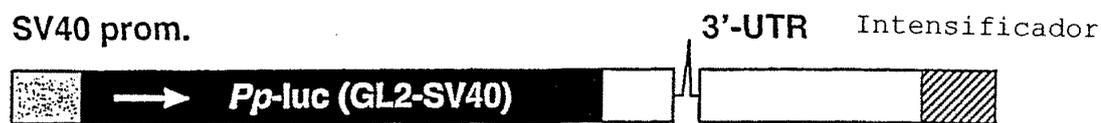


FIGURA 7

a



b

siRNA duplex

uGL2	5' CGUACGCGGAAUACUUCGAUU UUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'
GL2	5' CGUACGCGGAAUACUUCGATT TTGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'
GL3	5' CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU 5'
invGL2	5' AGCUUCAUAAGGCGCAUGCTT TTUCGAAGUAUCCGCGUACG 5'
RL	5' AAACAUGCAGAAAUGCUGTT TTUUUGUACGUCUUUUACGAC 5'

FIGURA 8

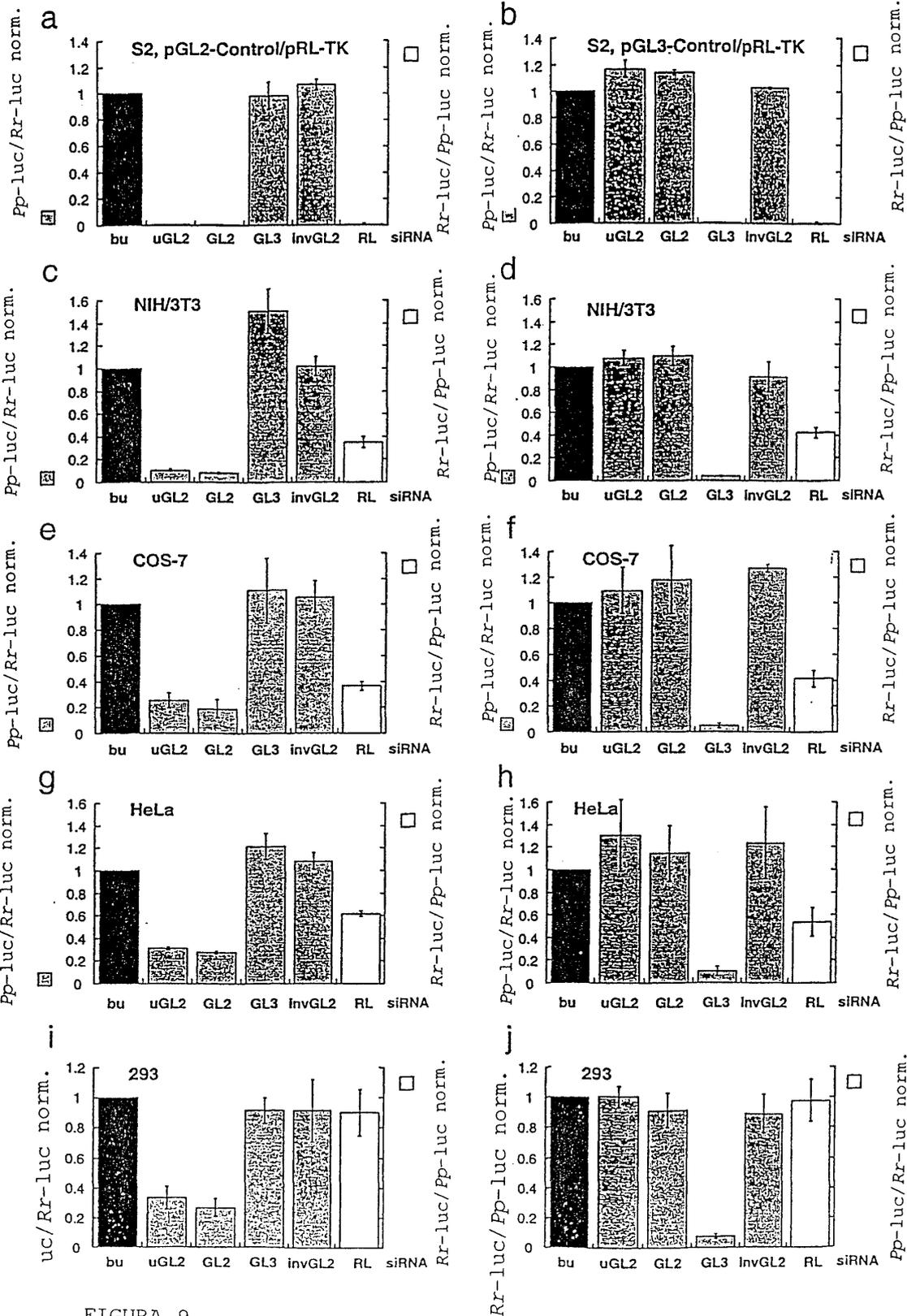


FIGURA 9

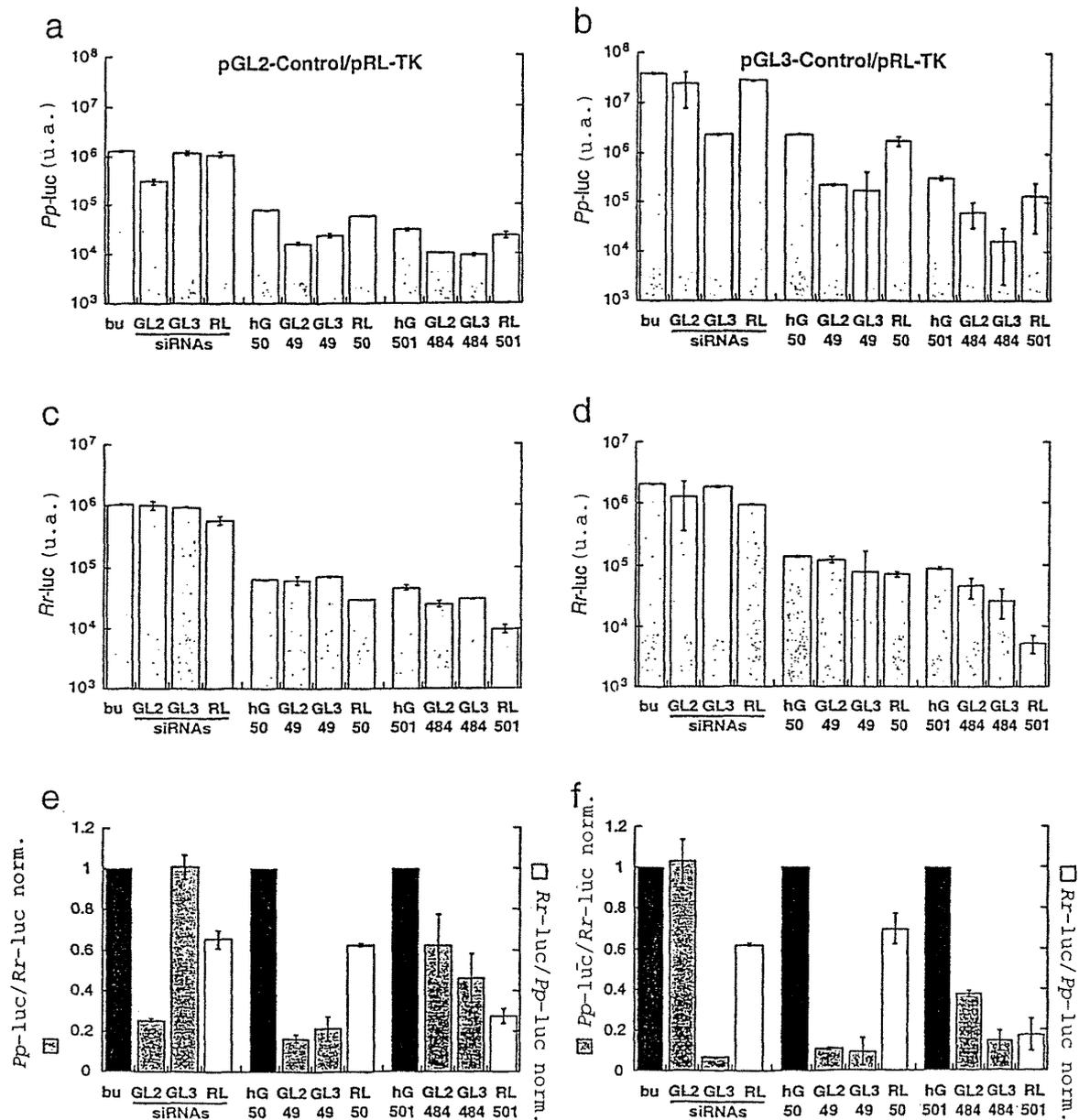
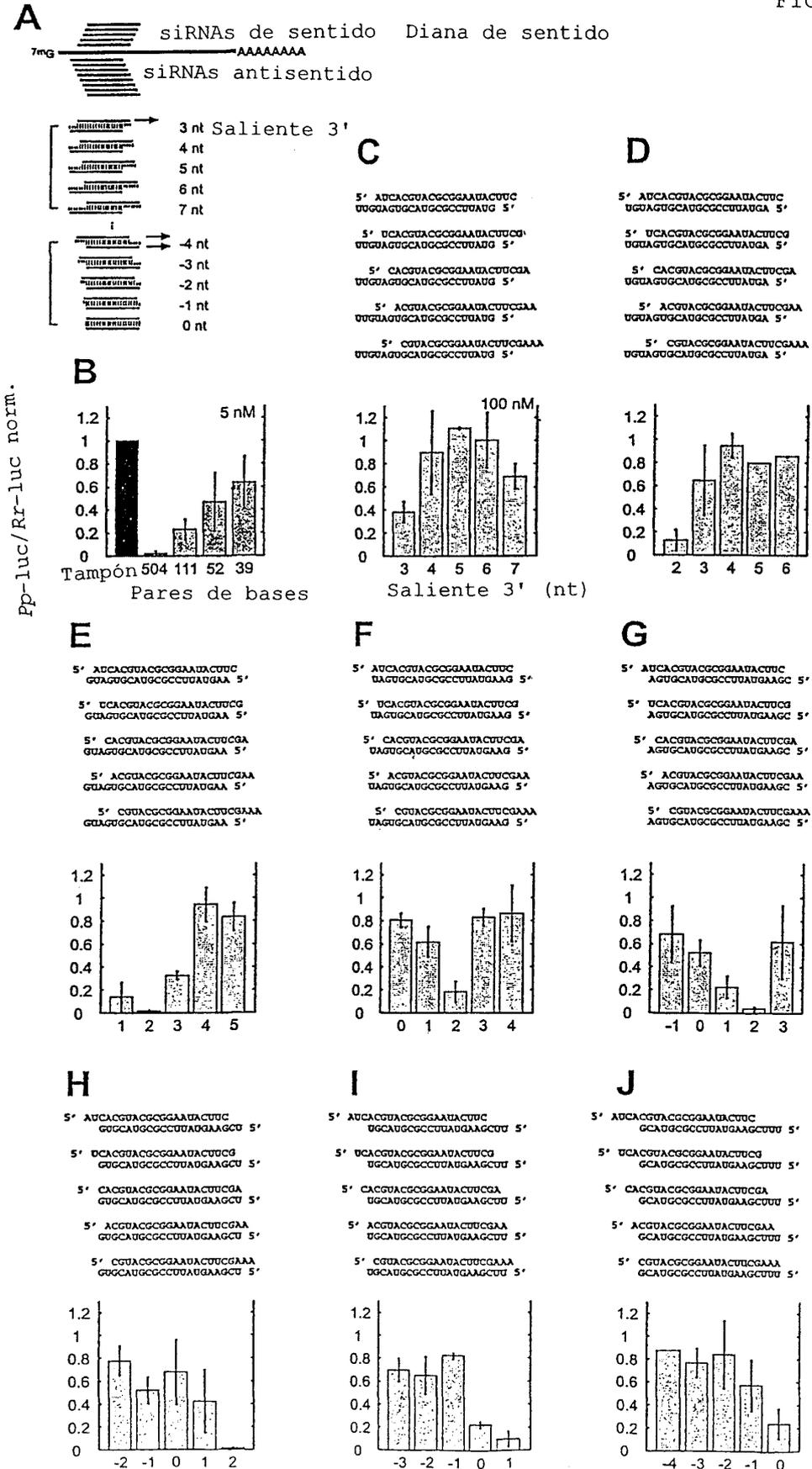
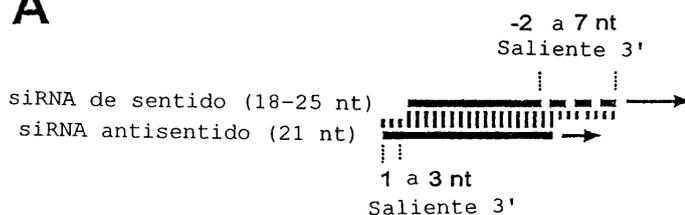


FIGURA 10

FIGURA 11



A



B

5' CGUACGCGGAAUACUUCG
UGCAUGCGCCUUUGAAGCUU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGA
UGCAUGCGCCUUUGAAGCUU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAA
UGCAUGCGCCUUUGAAGCUU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAA
UGCAUGCGCCUUUGAAGCUU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAU
UGCAUGCGCCUUUGAAGCUU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAUG
UGCAUGCGCCUUUGAAGCUU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGU
UGCAUGCGCCUUUGAAGCUU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGUC
UGCAUGCGCCUUUGAAGCUU 5'

C

5' CGUACGCGGAAUACUUCG
GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGA
GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAA
GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAA
GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAU
GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAUG
GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGU
GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGUC
GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'

D

5' CGUACGCGGAAUACUUCG
AGUGCAUGCGCCUUUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGA
AGUGCAUGCGCCUUUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAA
AGUGCAUGCGCCUUUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAA
AGUGCAUGCGCCUUUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAU
AGUGCAUGCGCCUUUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAUG
AGUGCAUGCGCCUUUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGU
AGUGCAUGCGCCUUUGAAGC 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGUC
AGUGCAUGCGCCUUUGAAGC 5'

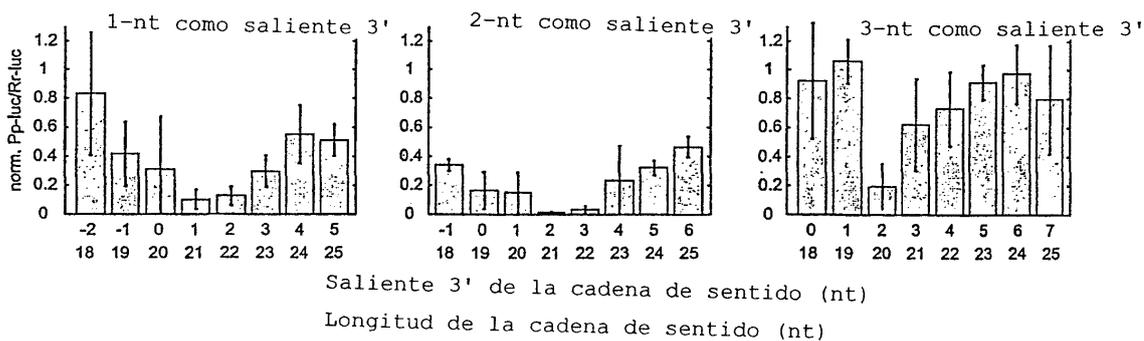
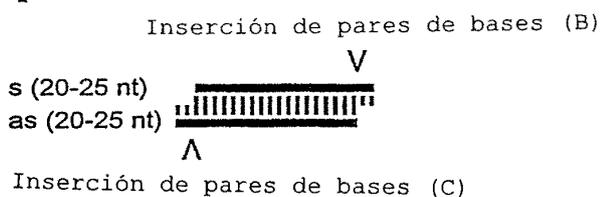


FIGURA 13

A



B

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAA
GUGCAUGCGCCUUUGAAGC 5'

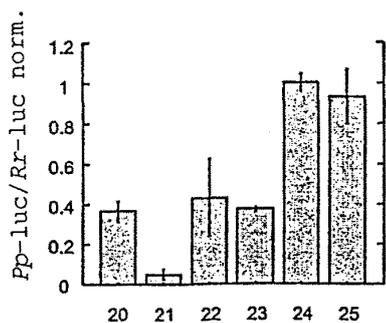
5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAA
GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAU
GUGCAUGCGCCUUUGAAGCUU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUG
GUGCAUGCGCCUUUGAAGCUUU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGU
GUGCAUGCGCCUUUGAAGCUUUA 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGUC
GUGCAUGCGCCUUUGAAGCUUUAAC 5'



Longitud de siRNAs (las dos veces)

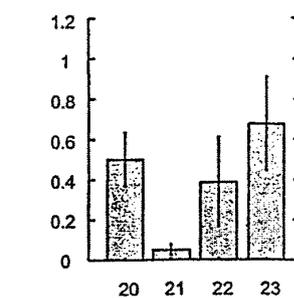
C

5' GUACGCGGAAUACUUCGAAA
UGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAA
GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'

5' ACGUACGCGGAAUACUUCGAAA
AGUGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'

5' CACGUACGCGGAAUACUUCGAAA
UAGUGCAUGCGCCUUUGAAGCU 5'



Longitud de siRNAs (las dos veces)

FIGURA 14

S 5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAA
 as GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

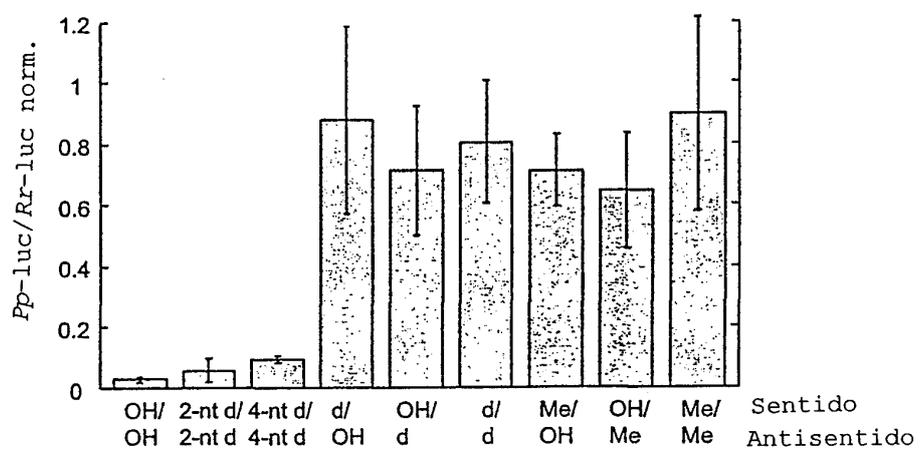
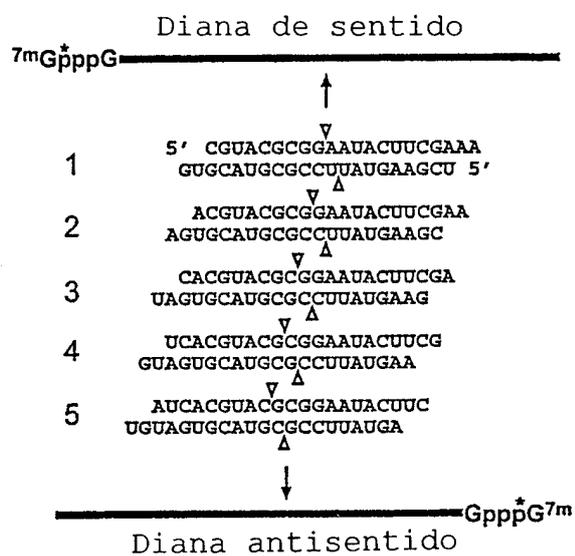


FIGURA 15

A



B

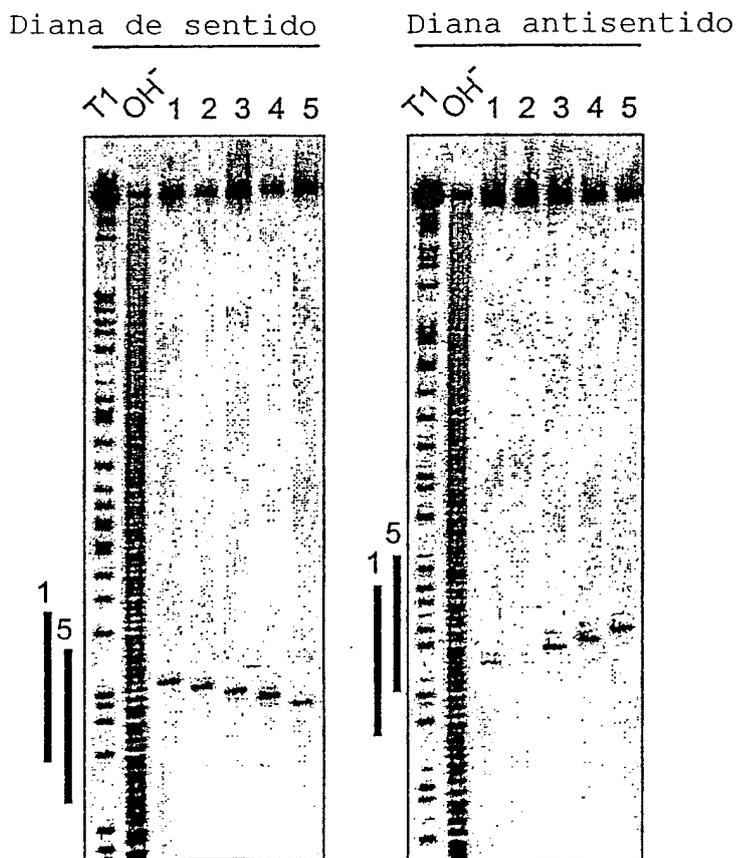
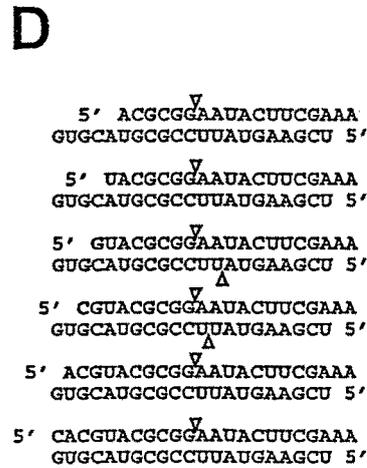
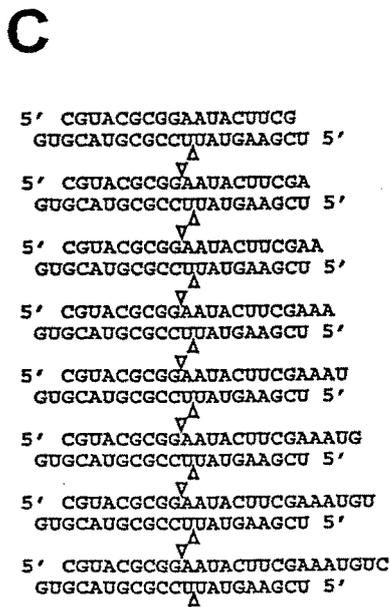
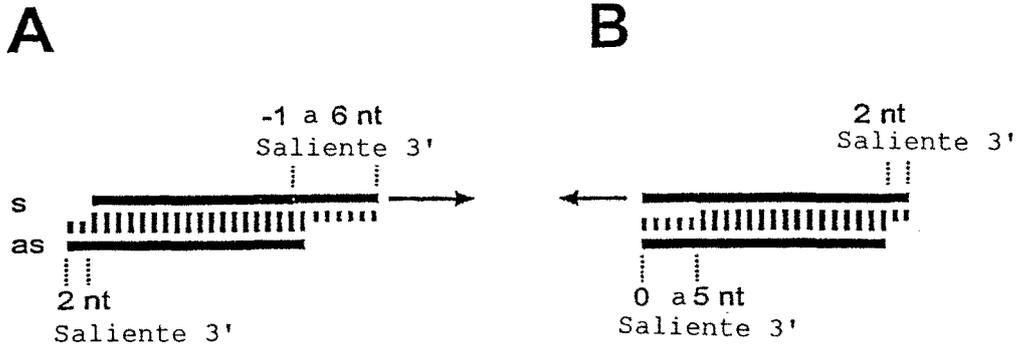
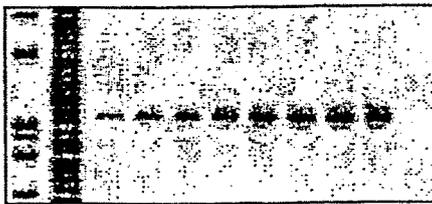


FIGURA 16

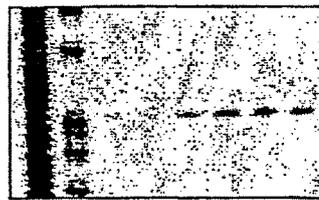


T¹ OH¹ 18 19 20 21 22 23 24 25 -



Diana de sentido

T¹ OH¹ 18 19 20 21 22 23



Diana antisentido

FIGURA 17

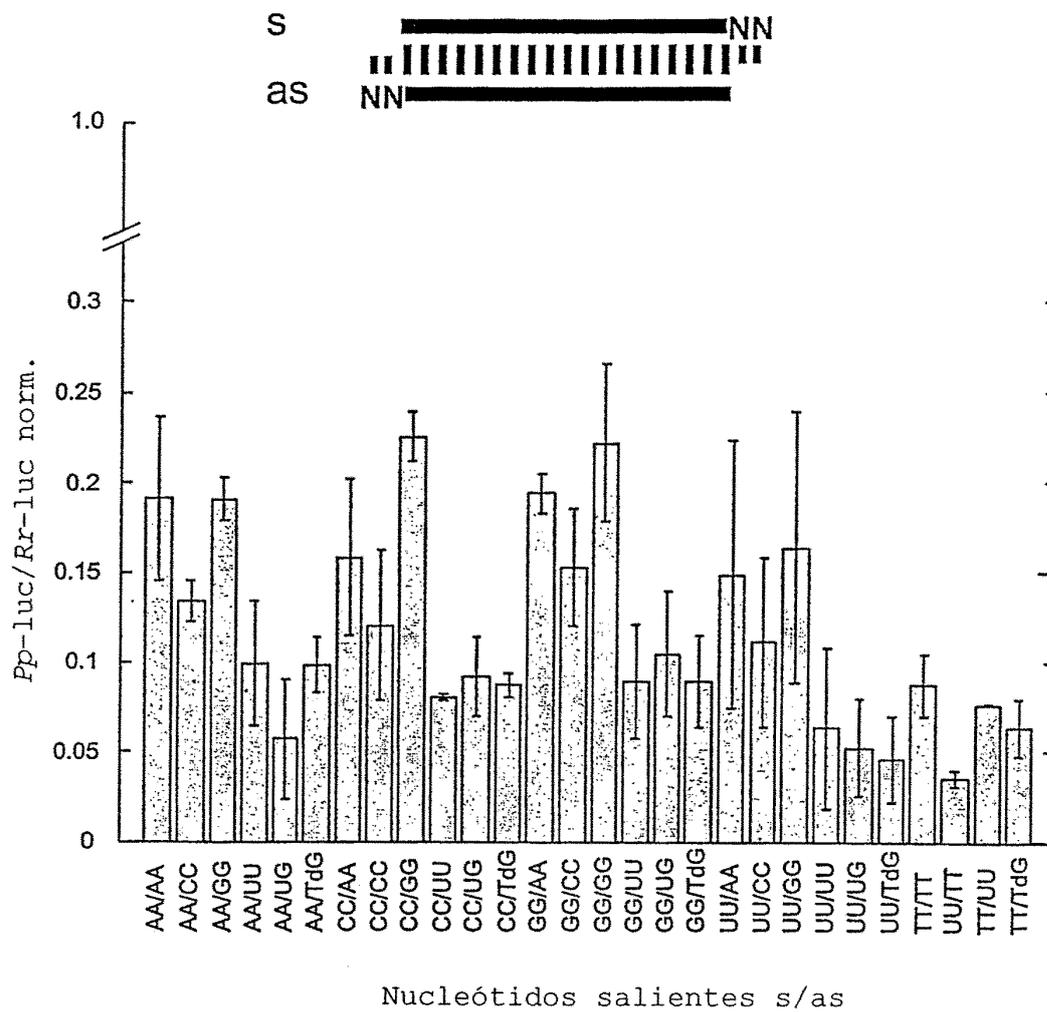


FIGURA 18

ref 5' CGUACGCGGAAUACUUCGATT
TTGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

1 5' AUGCGCGGAAUACUUCGATT
TTUACGGCGCCUUAUGAAGCU 5'

2 5' CGUAGGGCGAAUACUUCGATT
TTGCAUGGGCGCCUUAUGAAGCU 5'

3 5' CGUACGCGAGUAACUUCGATT
TTGCAUGCGCCUAUGAAGCU 5'

4 5' CGUACGCGGAAUUCACGATT
TTGCAUGCGCCUUAAGUGCU 5'

5 5' CGUACGCGGAAUACUUAAGCTT
TTGCAUGCGCCUUAUGAAUCC 5'

6 5' CGUACGCGGUAUACUUCGATT
TTGCAUGCGCCUAUGAAGCU 5'

7 5' CGUACGCGGAUACUUCGATT
TTGCAUGCGCCUAUGAAGCU 5'

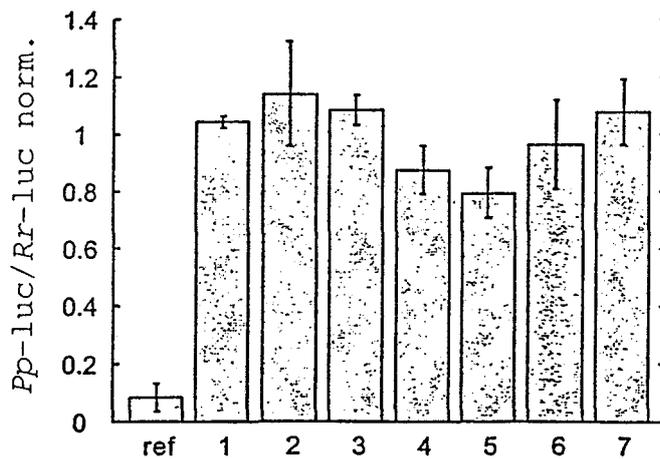


FIGURA 19

A

5' CGUACGCGGAAUACUUCGAA
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGC 5'
5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAA
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'
5' CGUACGCGGAAUACUUCGATT
TTGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'
5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAU
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCUU 5'
5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUG
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCUUU 5'
5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGU
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCUUUA 5'
5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAAUGUC
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCUUUAC 5'

B

5' GUACGCGGAAUACUUCGAAA
UGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'
5' CGUACGCGGAAUACUUCGAAA
GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'
5' ACGUACGCGGAAUACUUCGAAA
AGUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'
5' CACGUACGCGGAAUACUUCGAAA
UAGUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU 5'

