



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 243 608**

⑤① Int. Cl.?: **C12N 15/11**  
**A61K 31/713**

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **02003683 .6**

⑧⑥ Fecha de presentación : **29.01.2000**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **1214945**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **19.06.2002**

⑤④ Título: **Procedimiento y medicamento para la inhibición de la expresión de un gen predeterminado.**

③⑩ Prioridad: **30.01.1999 DE 199 03 713**  
**24.11.1999 DE 199 56 568**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.12.2005**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.12.2005**

⑦③ Titular/es: **Alnylam Europe AG.**  
**Fritz-Hornschuch-Strasse, 9**  
**95326 Kulmbach, DE**

⑦② Inventor/es: **Kreutzer, Roland y**  
**Limmer, Stefan**

⑦④ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

**ES 2 243 608 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento y medicamento para la inhibición de la expresión de un gen predeterminado.

5 La invención se refiere a procedimientos para la inhibición de la expresión de un gen predeterminado en una célula *in vitro*. Además se refiere a un medicamento y a un empleo de oligorribonucleótidos de hebra doble.

10 Tal procedimiento es conocido por la WO 99/32619 publicada posteriormente. El procedimiento conocido pretende la inhibición de la expresión de genes en células de invertebrados. A tal efecto es necesario que el oligorribonucleótido de hebra doble presente una secuencia idéntica al gen objetivo, con una longitud de al menos 50 bases. Para la consecución de una inhibición eficiente es necesaria una longitud de la secuencia idéntica de 300 a 1000 pares de bases. El gasto de obtención de tal oligorribonucleótido es elevado.

15 Por la WO 99/53050 es conocido un procedimiento para la inhibición de la expresión fenotípica de un ácido nucleico en una célula eucariótica. En la célula eucariótica se puede introducir una molécula de ARN quimérica. Un ARN de hebra doble (dsARN) se forma en células mediante transcripción de moléculas de ADN quiméricas introducidas en las células, o bien se introduce en las células como ARN de hebra simple con estructura de zigzag.

20 La WO 99/15682 se refiere a un procedimiento para la inhibición de la expresión de una secuencia de nucleótidos objetivo en una planta. A tal efecto se introduce en el citoplasma de una célula una estructura de ácido nucleico de hebra simple o de hebra doble constituido por ADN o ARN. La estructura de ácido nucleico codifica para una secuencia que es idéntica a la secuencia de nucleótidos objetivo o a la hebra complementaria a la misma. En este caso, la secuencia de nucleótidos objetivo está presente en una primera parte de la planta, mientras que la estructura de ácido nucleico se introduce en el citoplasma de una célula en una segunda parte de la planta.

25 Según Fire, A., "RNA-triggered gene silencing", TIG September 1999, vol. 15, n° 9, páginas 358 a 363 es improbable que los protocolos simples empleados para sistemas invertebrados y vegetales sean eficaces en células de mamíferos. Los mamíferos muestran una reacción violenta sobre dsARN. Un componente de esta reacción es proteína-quinasa (PKR). Cada respuesta a dsARN específica de los genes debía tener lugar en mamíferos en la sombra de la respuesta total inducida por PKR, o en células, o bajo condiciones en las que PKR es menos eficaz. Para evitar una merma debida al sistema de PKR se proponen modificaciones químicas en el dsARN, que posibilitan aún una acción de dsARN en la interferencia específica de los genes, sin desencadenar la respuesta de PKR.

30 Los mecanismos celulares desencadenados mediante el activado de PKR a través de dsARN son conocidos, por ejemplo, por Clemens, J. A., PKR-A Protein Kinase Regulated by Double-stranded RNA, Int. J. Biochem. Cell. Biol. (1997) tomo 29, n° 7, páginas 945-949.

35 La WO 92/19732 da a conocer un agente antisentido con estructura de hebra doble cerrada desde el punto de vista topológico. Dentro de esta estructura se puede dar una zona autocomplementaria de hebra doble. Esta zona puede actuar mediante una interacción con proteínas, que presentan una afinidad con esta zona.

La WO 98/05770 da a conocer un ARN antisentido de hebra simple con estructura de zigzag.

40 La DE 196 31 919 C2 describe un ARN antisentido con estructuras secundarias especiales, presentándose el antisentido en forma de un vector que codifica las mismas. En el caso del ARN antisentido se trata de una molécula de ARN que es complementaria a zonas de mARN. Mediante enlace en estas zonas se provoca una inhibición de la expresión génica. Esta inhibición se puede emplear en especial para el diagnóstico y/o terapia de enfermedades, por ejemplo enfermedades tumorales, o infecciones virales. De modo desventajoso, se debe introducir el ARN antisentido en la célula en una cantidad que presenta al menos la misma magnitud que la cantidad de mARN. La eficacia de los procedimientos antisentido conocidos no es especialmente elevada.

45 Se conoce por la US 5,712,257 un medicamento que contiene ARN (dsARN) de hebra doble de pares defectuosos, y fragmentos biológicamente activos de pares defectuosos de dsARN en forma de un complejo ternario con un agente tensioactivo. El dsARN empleado en este caso está constituido por hebras simples de ácido nucleico obtenidas sintéticamente sin secuencia de bases definida. Las hebras simples efectúan entre sí apareamientos de bases irregulares, los denominados "Nict-h-Watson-Crick", de modo que se forman hebras dobles de pares defectuosos. El dsARN conocido sirve para la inhibición de la propagación de retrovirus, como HIV. Se puede inhibir la propagación del virus si se introduce en las células dsARN de secuencia no específica. En este caso se llega a una inducción de interferona, mediante lo cual se debe inhibir la propagación de virus. El efecto inhibitor, o bien la eficacia de este procedimiento, es reducido.

50 Se conoce por Fire, A. *et. al*, NATURE, Vol. 391, página 806, que el dsARN, una de cuyas hebras es complementaria por secciones aún gen a inhibir de un nematodo, inhibe la expresión de este gen con una eficacia elevada. Sostendrá el concepto que la eficacia especial del dsARN empleado en células del nematodo no se basa en el principio antisentido, sino posiblemente en propiedades catalíticas del dsARN, o bien se puede atribuir a enzimas inducidos por el mismo. En este artículo no se dice nada sobre la eficacia de dsARN específico con relación a la inhibición de la expresión génica, en especial en células de mamíferos y células humanas.

## ES 2 243 608 T3

Es tarea de la presente invención eliminar los inconvenientes según el estado de la técnica. Se debía indicar en especial un procedimiento, medicamento, o bien principio activo lo más eficiente posible, y un empleo lo más eficiente posible para la obtención de un medicamento, o bien un principio activo, con el cual se pueda provocar una inhibición especialmente eficaz de la expresión de un gen objetivo predeterminado.

5

Se soluciona este problema mediante las características de las reivindicaciones 1, 28 y 56. Resultan acondicionamientos ventajosos de las reivindicaciones 2 a 27, 29 a 55 y 57 a 84.

Según la invención, para la inhibición de la expresión de un gen objetivo predeterminado en una célula de mamífero *in vitro* está previsto introducir en la célula de mamífero un oligorribonucleótido que presenta 15 a 49 pares de bases con estructura de hebra doble (dsARN), presentando una hebra del dsARN una zona I complementaria al gen objetivo al menos por secciones, que presenta a lo sumo 49 pares de nucleótidos sucesivos, y formándose una zona II complementaria dentro de la estructura de hebra doble a partir de dos hebras simples de ARN separadas. El oligorribonucleótido presenta una secuencia de nucleótidos definida al menos por secciones. La sección definida puede estar limitada a la zona I complementaria. No obstante, también puede ser que el oligorribonucleótido de hebra doble presente en total una secuencia de nucleótidos definida. El dsARN puede ser más largo que la zona I complementaria al gen objetivo. La zona I complementaria puede presentar disposición terminal, o estar insertada en el ds ARN. Tal dsARN se puede obtener por vía sintética, o bien enzimática, con procedimientos de uso común.

20 Sorprendentemente, se ha mostrado que ya con una longitud de zona complementaria I de un máximo de 49 pares de nucleótidos sucesivos, se puede conseguir una inhibición eficaz de la expresión del gen objetivo. Se pueden poner a disposición oligorribonucleótidos correspondientes con gasto de obtención más reducido.

25 En especial el dsARN con una longitud de más de 50 pares de nucleótidos induce determinados mecanismos celulares en células de mamíferos y células humanas, por ejemplo la proteína quinasa dependiente de dsARN, o el sistema 2-5a. Esto conduce a la desaparición del efecto de interferencia ocasionado por el dsARN que presenta una secuencia definida. De este modo se bloquea la biosíntesis de proteínas en la célula. En especial se elimina este inconveniente mediante la presente invención.

30 Además se facilita claramente la absorción de dsARN con longitud de cadena reducida en la célula, o bien en el núcleo celular, frente a dsARN de cadena más larga.

35 Se ha mostrado ventajoso que el dsARN se presente en estructuras micelares, preferentemente en liposomas. El dsARN puede estar incluido igualmente en cápsidas virales naturales, o en cápsidas sintéticas obtenidas por vía química o enzimática, o estructuras derivadas de las mismas. Las características citadas anteriormente posibilitan una inclusión del dsARN en células objetivo predeterminadas.

40 Convenientemente se exprime el gen a inhibir en células eucariotas. El gen objetivo puede ser seleccionado a partir del siguiente grupo: oncogén, gen de citoquina, gen de proteína Id, gen de desarrollo, gen prión. También se puede expresar en organismos patógenos, preferentemente en plasmodios. Puede ser componente de un virus o viroide, preferentemente patógeno humano. El procedimiento propuesto posibilita la obtención de agentes para la terapia de enfermedades controladas genéticamente, por ejemplo cáncer, enfermedades virales o enfermedad de Alzheimer.

45 El virus o viroide puede ser también un virus o viroide patógeno animal o vegetal. En este caso, el procedimiento según la invención permite también la puesta a disposición de agentes para el tratamiento de enfermedades animales o vegetales.

50 Según otra característica de acondicionamiento, el dsARN presenta configuración de hebra doble por secciones. Los extremos del dsARN pueden estar modificados para contrarrestar una degradación en la célula o una disociación en las hebras simples. Se presenta una disociación en especial en el caso de empleo de bajas concentraciones o longitudes de cadena reducidas. Para la inhibición especialmente eficaz de la disociación se puede aumentar la cohesión de la estructura de hebra doble provocada por los pares de nucleótidos a través de al menos 1, preferentemente 2 enlaces químicos adicionales. Un dsARN según la invención, cuya disociación está reducida, presenta una estabilidad más elevada contra la degradación enzimática y química en la célula, o bien en el organismo.

55

Convenientemente se forma enlace químico mediante un enlace covalente o iónico, un enlace por puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas, preferentemente interacciones de van-der-Waals o de apilado, o mediante coordinación de iones metálicos. Según una característica de acondicionamiento especialmente ventajosa, se puede obtener el mismo al menos en 1, preferentemente en ambos extremos de la zona complementaria II.

60

65 Además se ha mostrado ventajoso formar el enlace químico por medio de uno o varios grupos de enlace, siendo los grupos de enlace preferentemente cadenas de poli-(oxifosfinicooxi-1,3-propanodiol) y/o polietilenglicol. Se puede formar el enlace químico también mediante análogos de purina utilizados en lugar de purinas en las zonas complementarias II. Además es ventajoso que el enlace químico se forme a través de unidades azabenceno introducidas en las zonas complementarias II. Además se puede formar el mismo mediante análogos de nucleótidos modificados utilizados en lugar de nucleótidos en las zonas complementarias II.

## ES 2 243 608 T3

Para la obtención del enlace químico se ha mostrado conveniente utilizar al menos uno de los siguientes grupos: azul de metileno; grupos bifuncionales, preferentemente bis-(2-cloroetil)-amina; N-acetil-N'-(p-glioxilbenzoil)-cistamina; 4-tiouracilo; psoraleno. Además se puede formar el enlace químico mediante los grupos tiofosforilo introducidos en los extremos de la zona de hebra doble. Preferentemente se obtiene el enlace químico en los extremos de la zona de hebra doble mediante enlaces de triple hélice.

Se puede inducir el enlace químico convenientemente mediante luz ultravioleta.

Los nucleótidos de dsARN pueden estar modificados. Esto provoca un activado de una proteína quinasa dependiente de ARN de hebra doble, PKR en la célula. Ventajosamente, al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos del dsARN en la zona complementaria II está reemplazado por un grupo químico, preferentemente un grupo 2'-amino o un grupo 2'-metilo. Al menos un nucleótido en al menos una hebra de la estructura de hebra doble puede ser también un denominado "locked nucleotide" con un anillo sacárico modificado químicamente, de modo preferente a través de un puente 2'-O, 4'-C-metileno. Ventajosamente, varios nucleótidos son "locked nucleotides".

Según otro acondicionamiento especialmente ventajoso está previsto que el dsARN esté enlazado, asociado, o rodeado por al menos una proteína envolvente viral procedente de un virus, derivada del mismo, u obtenida sintéticamente. La proteína envolvente puede ser derivada del virus de polioma. La proteína envolvente puede contener la proteína viral 1 (VP1) y/o la proteína viral 2 (VP2) del virus de polioma. Se conoce el empleo de tales proteínas envolventes, por ejemplo, por la DE 196 18 797 A1. Las características citadas anteriormente facilitan de manera esencial la introducción de dsARN en la célula.

Preferentemente, en el caso de formación de una cápsida o de una estructura de tipo cápsida a partir de la proteína envolvente, uno de los lados está orientado al interior de la cápsida o de la estructura de tipo cápsida. La estructura formada es especialmente estable.

El dsARN puede ser complementario al elemento de transcripción de ARN primario o procesado del gen obtenido. La célula puede ser una célula de vertebrado o una célula humana.

Se pueden introducir al menos dos dsARN diferentes entre sí en la célula, siendo una hebra de cada dsARN complementaria, al menos por secciones, respectivamente a uno de al menos dos genes objetivo diferentes. De este modo es posible inhibir simultáneamente la expresión de al menos dos genes objetivo diferentes. Para suprimir la expresión de una proteína quinasa dependiente de ARN de hebra doble PKR, en la célula, uno de los genes objetivo es ventajosamente el gen PKR. De este modo se puede suprimir eficazmente la actividad de PKR en la célula.

Según la invención, además está previsto un medicamento con al menos un oligorribonucleótido que presenta 15 a 49 pares de bases con estructura de hebra doble (dsARN) para la inhibición de la expresión de un gen objetivo predeterminado en células de mamíferos, presentando una hebra del dsARN una zona I complementaria al gen objetivo al menos por secciones, que presenta a lo sumo 49 pares de nucleótidos sucesivos, y una zona II complementaria dentro de la estructura de hebra doble, constituida por dos hebras simples de ARN separadas. Sorprendentemente se ha mostrado que tal dsARN es apropiado como medicamento para la inhibición de la expresión de un gen predeterminado en células de mamíferos. En comparación con el empleo de oligorribonucleótidos de hebra simple, la inhibición se provoca ya en concentraciones que son más reducidas al menos en un orden de magnitud. El medicamento según la invención es altamente eficaz. Son de esperar efectos secundarios más reducidos. Sorprendentemente se ha mostrado que se puede conseguir una inhibición eficiente de la expresión del gen objetivo ya con una longitud de la zona I complementaria de un máximo de 49 pares de bases. Se pueden poner a disposición oligorribonucleótidos correspondientes con gasto de obtención más reducido.

Adicionalmente, según la invención está previsto un empleo de un oligorribonucleótido que presenta 15 a 49 pares de bases con estructura de hebra doble (dsARN) para la obtención de un medicamento para la inhibición de la expresión de un gen objetivo predeterminado en células de mamíferos, presentando una hebra del dsARN una zona I complementaria al gen objetivo al menos por secciones, que presenta a lo sumo 49 pares de nucleótidos sucesivos, y una zona II complementaria dentro de la estructura de hebra doble, constituida por dos hebras simples de ARN separadas. Sorprendentemente, tal dsARN es apropiado para la obtención de un medicamento para la inhibición de la expresión de un gen predeterminado. En el caso de empleo dsARN se provoca la inhibición ya en concentraciones más reducidas en un orden de magnitud, en comparación con el empleo de oligorribonucleótidos de hebra simple. Por lo tanto, el procedimiento según la invención posibilita la obtención de medicamentos especialmente eficaces.

Con respecto a acondicionamientos ventajosos del medicamento, y al empleo, se remite a la descripción de las características precedentes.

A continuación se explica más detalladamente ejemplos de realización de la invención por medio de las figuras. Muestran:

la figura 1 la representación esquemática de un plásmido para la transcripción *in vitro* con polimerasa T7 y SP6, la figura 2 ARN según electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% y coloración de bromuro de etidio,

## ES 2 243 608 T3

la figura 3 una representación de elementos de transcripción de ARN radioactivos según la electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% con urea 7 M por medio de un "Instant Imagers", y

las figuras 4a-e fluorescencia de Texas-Rot y YPF en fibroblastos murinos.

5

Ejemplo de realización 1

Se identificó la inhibición de la transcripción mediante dsARN de secuencias homólogas en un sistema de transcripción *in vitro* con un extracto nuclear a partir de células HeLa humanas. La matriz de ADN para este ensayo era el plásmido linealizado por medio de BamHI pCMV1200.

10

*Obtención de los plásmidos matriz*

Para el empleo en la síntesis enzimática de dsARN se construyó el plásmido representado en la figura 1. A tal efecto se llevó a cabo en primer lugar una reacción en cadena de polimerasa (PCR) con el kit de transcripción "positive control DNA" de HeLaScribe® Nuclear Extract *in vitro* de la firma Promega, Madison, USA como matriz de ADN. Uno de los cebadores empleados contenía la secuencia de un punto de corte EcoRI y del promotor de polimerasa T7-ARN según el protocolo de secuencia número 1. El otro cebador contenía la secuencia de un punto de corte BamHI y del promotor de polimerasa SP6-ARN según el protocolo de secuencia número 2. Además, ambos cebadores presentan en sus extremos 3' zonas idénticas, o bien complementarias, respecto a la matriz ADN. Se llevó a cabo el PCR por medio del "Taq PCE Core Kit" de la firma Qiagen, Hilden, Alemania, según datos del fabricante. En un volumen de 100  $\mu$ l se emplearon como matriz MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, respectivamente dNTP 200  $\mu$ M, respectivamente cebador 0,5  $\mu$ M, 2,5 U de Taq-ADN-polimerasa, y aproximadamente 100 ng de "positive control DNA" como matriz en tampón de PCR. Tras el desnaturalizado inicial del ADN matriz mediante calentamiento a 94°C durante 5 minutos, se efectuó la amplificación en 30 ciclos de 60 segundos respectivamente de desnaturalizado a 94°C, condensación de 60 segundos a 5°C por debajo de la temperatura de fusión calculada del cebador, y 1,5-2 minutos de polimerización a 72°C. Tras una polimerización final de 5 minutos a 72°C se analizaron 5  $\mu$ l de la carga de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa. La longitud del fragmento de ADN amplificado de este modo ascendía a 400 pares de bases, correspondiendo 340 pares de bases al "positive control DNA". Se purificó el producto de PCR, se hidrolizó con EcoRI y BamHI, y tras nueva purificación se empleó para la unión con un vector pUC18, igualmente hidrolizado por medio de EcoRI y BamHI. Se efectuó la transformación de azul de *E. Coli* XL1. El plásmido obtenido (pCMV5) porta un fragmento de ADN, que es flanqueado en el extremo 5' por el promotor T7, y en el extremo 3' por el promotor SP6. Mediante linealizado del plásmido con BamHI, se puede emplear *in vitro* con la T7-ARN-polimerasa para la transcripción run-off de un ARN de 340 nucleótidos de longitud, representado en el protocolo de secuencia número 3, de hebras simple. Si se linealiza el plásmido con EcoRI, se puede emplear para la transcripción run-off con la SP6-ARN-polimerasa, produciéndose la hebra complementaria. Correspondientemente al procedimiento representado anteriormente se sintetizó también un ARN más largo en 23 nucleótidos. A tal efecto se unió un ADN representado en el protocolo de secuencia n° 4, a través de los puntos de corte EcoRI y BamHI, con el vector pUC18.

Como matrices de ADN para la transcripción *in vitro* con extracto nuclear HeLa se construyó el plásmido pCMV1200. A tal efecto se amplificó un fragmento EcoRI/BamHI de 1191 bp de tamaño con el ADN de control positivo obtenido en el kit de transcripción HeLaScribe® Nuclear Extract *in vitro*, por medio de PCR. El fragmento amplificado comprendía el promotor CMV de 828 bp de tamaño "inmediatamente anterior", y un fragmento de ADN transcribible de 363 bp de tamaño. Se ligó el producto de PCR a través de un ligamiento "parte sobresaliente T" con el vector pGEM-T. En el extremo 5' del fragmento se encuentra un punto de corte BamHI. Se linealizó el plásmido mediante hidrólisis con BamHI, y se empleó como matriz para la transcripción run-off.

*Transcripción in vitro de las hebras dobles complementarias*

Se linealizó ADN de plásmido pCMV5 con EcoRI, o bien BamHI. Se empleó el mismo como matriz de ADN para una transcripción *in vitro* de las hebras simples de ARN complementarias con SP6, o bien T7-ARN-polimerasa. A tal efecto se empleó el sistema "Riboprobe *in vitro* Transcription" de la firma Promega, Madison, USA. Según los datos del fabricante se incubaron 2  $\mu$ g de ADN de plásmido linealizado en 100  $\mu$ l de tampón de transcripción y 40 U T7- o SP6-ARN- polimerasa 5 a 6 horas a 37°C. A continuación se degradó la matriz de ADN mediante adición de 2,5  $\mu$ l de DNasa RQ1 exento de RNasa, e incubación durante 30 minutos a 37°C. Se completó la carga de transcripción con H<sub>2</sub>O a 300  $\mu$ l, y se purificó mediante extracción con fenol. Se precipitó el ARN mediante adición de 150  $\mu$ l de acetato amónico 7 M, y 1125  $\mu$ l de etanol, y se conservó a -65°C para la hibridación.

*Obtención de las hebras dobles de ARN*

60

Para la hibridación se centrifugaron 500  $\mu$ l del ARN de hebras simple conservado en etanol y precipitado. Se secó el comprimido resultante, y se absorbió en 30  $\mu$ l de tampón PIPES, pH 6,4, en presencia de un 80% de formamida, 400 mM NaCl y 1 mM EDTA. Se reunieron respectivamente 15  $\mu$ l de hebras simples complementarias, y se calentaron durante 10 minutos a 85°C. A continuación se incubaron las cargas a 50°C durante la noche, y se enfriaron a temperatura ambiente.

65

En la hibridación se emplearon sólo cantidades aproximadamente equimolares de ambas hebras simples. De este modo, las preparaciones de dsARN contenían ARN (ssARN) de hebra simple como contaminación. Para eliminar estas

## ES 2 243 608 T3

contaminaciones de ssARN, se trataron las cargas tras la hibridación con las ribonucleasas específicas de hebras simple RNasaA de páncreas de vaca, y RNasaT1 de *Aspergillus oryzae*. RNasaA es una endorribonucleasa específica para pirimidinas. RNasaT1 es una endorribonucleasa, que corta preferentemente en el lado 3' de guanosinas. dsARN no es un sustrato para estas ribonucleasas. Para el tratamiento de RNasa se añadió a las cargas en 300  $\mu$ l Tris, pH 7,4, NaCl 300 mM y EDTA 5 mM, 1,2  $\mu$ l RNasaA en una concentración de 10 mg/ml y 2  $\mu$ l de RNasaT1 en una concentración de 290  $\mu$ g/ml. Se incubaron las cargas 1,5 horas a 30°C. Después se desnaturalizaron las RNasas mediante adición de 5  $\mu$ l de proteinasaK en una concentración de 20 mg/ml, así como 10  $\mu$ l de SDS al 20%, e incubación durante 30 minutos a 37°C. Se purificó el dsARN mediante extracción con fenol, y se precipitó con etanol. Para poder verificar la integridad de la digestión de RNasa, se trataron dos cargas de control con ssARN análogamente a las cargas de hibridación.

Se absorbió el comprimido desecado en 15  $\mu$ l de tampón TE, pH 6,5, y se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida nativa en un gel al 8%. A continuación se tiñó el gel de acrilamida en una disolución de bromuro de etidio, y se lavó en un baño de agua. La figura 2 muestra el ARN visibilizado en un transiluminador UV. Los ARN sentido aplicados en la vía 1, y antisentido aplicados en la vía 2, mostraban bajo las condiciones seleccionadas un comportamiento de dilución diferente que los dsARN de la carga de hibridación aplicados en la vía 3. El ARN sentido, o bien antisentido aplicado en las vías 4, o bien 5, tratado con RNasa no generaba ninguna banda visible. Esto muestra que los ARNs de hebra simple se degradaron completamente. El dsARN aplicado en la vía 6, tratado con RNasa de la carga de hibridación, es resistente frente al tratamiento con RNasa. La banda de migración más rápida en el gel nativo en comparación con el dsARN aplicado en la vía 3, resulta de dsARN, que está exento de ssARN. Además de las bandas principales dominantes, tras el tratamiento con RNasa se presentan bandas más débiles, de migración más rápida.

### Test de transcripción *in vitro* con extracto nuclear celular humano

Bajo empleo del kit de transcripción HeLaScribe® Nuclear Extract *in vitro* de la firma Promega, Madison, USA se determinó la eficiencia de transcripción del fragmento de ADN indicado anteriormente, obtenido en el plásmido pCMV1200, homólogo al “positive control DNA”, en presencia del dsARN (dsARN-CMV5) de secuencias homólogas. Además se analizó la influencia de dsARN (dsARN-YFP) de secuencias no homólogas, correspondiente al gen (YFP) “proteína fluorescente amarilla”. Este dsARN se había obtenido análogamente al dsARN de secuencias homólogas.

La secuencia de una hebra de este dsARN se puede extraer del protocolo de secuencia número 5. Como matriz para la transcripción run-off sirvió el plásmido pCMV1200. Este porta el promotor “inmediatamente anterior” del virus de citomegalia, que es identificado por las polimerasas de ARN eucariotas II, y un fragmento de ADN transcribible. La transcripción se efectuó por medio del extracto nuclear HeLa, que contenía todas las proteínas necesarias para una transcripción. Mediante adición de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]rGTP a la carga de transcripción se obtuvo un elemento de transcripción marcado radioactivamente. El [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]rGTP empleado tenía una actividad específica de 400 Ci/mmol, 10 mCi/ml. Por carga se emplearon MgCl<sub>2</sub> 3 mM, respectivamente rATP, rCTP, rUTP 400  $\mu$ M, rGTP 16  $\mu$ M, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] rGTP 0,4  $\mu$ M, y según ensayo, un mol de ADN de plásmido linealizado, y diferentes cantidades de dsARN en el tampón de transcripción. Cada carga se completó con H<sub>2</sub>O a un volumen de 8,5  $\mu$ l se mezclaron cuidadosamente las cargas. Para la iniciación de la transcripción se añadieron 4 U de extracto nuclear HeLa en un volumen de 4  $\mu$ l y se incubaron durante 60 minutos a 30°C. Se concluyó la reacción mediante adición de 87,5  $\mu$ l al Stopp-Mix calentado a 30°C. Para la eliminación de las proteínas se mezclaron las cargas con 100  $\mu$ l de fenol/cloroformo, alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v), saturado con tampón TE, pH 5,0, y se mezclaron intensivamente 1 minuto. Para la separación de fases se centrifugó aproximadamente 1 minuto a 12.000 rpm, y se trasladó la fase superior a un nuevo recipiente de reacción. Se añadieron a cada carga 250  $\mu$ l de etanol. Se mezclaron convenientemente las cargas y se incubaron durante al menos 15 minutos en hielo seco/metanol. Para la precipitación de ARN se centrifugaron las cargas 20 minutos a 12.000 rpm y 4°C. Se desechó el exceso. Se secó el comprimido 15 minutos en vacío, y se resuspendió en 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. Se añadieron a cada carga 10  $\mu$ l de tampón de muestra desnaturalizado. La separación del GTP libre del elemento de transcripción producido se efectuó por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante en un gel al 8% con urea 7 M. Los elementos de transcripción ARN formados en la transcripción con el extracto nuclear HeLa en tampón de muestra desnaturalizante, se calentaron 10 minutos a 90°C, e inmediatamente se aplicaron 10  $\mu$ l de los mismos en las bolsas de muestra recién lavadas. La electroforesis se efectuó a 40 mA. La cantidad de ssARN radioactivo formado en la transcripción se analizó tras la electroforesis con ayuda de un Instant Imager.

La figura 3 muestra el ARN radioactivo sintetizado por medio del Instant Imagers a partir de un test representativo. Se aplicaron muestras obtenidas a partir de las siguientes cargas de transcripción:

- traza 1: sin ADN matriz, sin dsARN;
- traza 2: 50 ng de ADN matriz, sin dsARN;
- traza 3: 50 ng de ADN matriz, 0,5  $\mu$ g de dsARN-YFP;
- traza 4: 50 ng de ADN matriz, 1,5  $\mu$ g de dsARN-YFP;

## ES 2 243 608 T3

traza 5: 50 ng de ADN matriz, 3  $\mu\text{g}$  de dsARN-YFP;

traza 6: 50 ng de ADN matriz, 5  $\mu\text{g}$  de dsARN-YFP;

5 traza 7: sin ADN matriz, 1,5 de dsARN-YFP;

traza 8: 50 ng de ADN matriz, sin dsARN;

traza 9: 50 ng de ADN matriz, 0,5  $\mu\text{g}$  de dsARN-CMV5;

10 traza 10: 50 ng de ADN matriz, 1,5  $\mu\text{g}$  de dsARN-CMV5;

traza 11: 50 ng de ADN matriz, 3  $\mu\text{g}$  de dsARN-CMV5;

15 traza 12: 50 ng de ADN matriz, 5  $\mu\text{g}$  de dsARN-CMV5;

Se mostró una clara reducción de la cantidad de elemento de transcripción en presencia de dsARN de secuencias homólogas en comparación con la carga de control sin dsARN, así como también respecto a las cargas con dsARN-YFP de secuencias no homólogas. El control positivo en la vía 2 muestra que, en la transcripción *in vitro* con extracto nuclear HeLa, se formó elemento de transcripción radioactivo. La carga sirve como comparación con las cargas de transcripción, que se habían incubado en presencia de dsARN. Las vías 3 a 6 muestran que la adición de dsARN-YFP de secuencias no específicas no ejerce ninguna influencia sobre la cantidad del elemento de transcripción formado. Las vías 9 a 12 muestran que la adición de una cantidad, situada entre 1,5 y 3  $\mu\text{g}$ , de dsARN-CMV5 de secuencias específicas, conduce a un descenso de la cantidad de elemento de transcripción formado. Para excluir que los efectos observados no se basen en el dsARN, sino en una contaminación arrastrada posiblemente de manera involuntaria en la obtención de dsARN, se llevó a cabo un control adicional. Se transcribió como se ha descrito anteriormente el ARN de hebra simple, y a continuación se sometió al tratamiento con RNasa. Por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida nativa se pudo mostrar que el ssARN se había degradado completamente. Esta carga se sometió, como las cargas de hibridación, a una extracción con fenol y una precipitación con etanol, y a continuación se absorbió en tampón TE. De este modo se obtuvo una muestra que no contenía ARN, pero que se había tratado con los mismos enzimas y tampones que el dsARN. La vía 8 muestra que la adición de esta muestra no tiene influencias sobre la transcripción. El descenso del elemento de transcripción en el caso de adición de dsARN de secuencias específicas, por lo tanto, se puede asignar claramente al propio dsARN. La reducción de la cantidad de elemento de transcripción de un gen en presencia de dsARN en el caso de un sistema de transcripción humano muestra una inhibición de la expresión del gen correspondiente. Este efecto se puede atribuir a un nuevo mecanismo, provocado por el dsARN.

### Ejemplo de realización 2

40 Como sistema de ensayo para estos experimentos *in vivo* sirvió la línea celular de fibroblastos murinos NIH3T3, ATCC, CRL-1658. Con ayuda de la microinyección se introdujo el gen del YFP en el núcleo celular. Se analizó la expresión de YFP bajo la influencia de dsARN de secuencias homólogas, transferidos de modo concomitante simultáneamente. Este dsARN-YFP es, a través de una longitud de 315 bp, homólogo a la zona 5' del gen de YFP. La secuencia de nucleótidos de una hebra de dsARN-YFP se representa en el protocolo de secuencia número 5. La valoración bajo el microscopio de fluorescencia se efectuó 3 horas después de inyección por medio de fluorescencia amarilla-verde de YFP formado.

### Construcción del plásmido matriz y obtención del dsARN

50 Como matriz para la obtención de YFP-dsARN por medio de transcripción T7 y SP6-*in vitro* se construyó un plásmido según el mismo principio que se describe en el ejemplo de realización 1. El fragmento génico deseado se amplificó bajo empleo del cebador Eco\_T7\_YFP según el protocolo de secuencia número 6, y Bam\_SP6\_YFP según el protocolo de secuencia número 7, por medio de PCR, y se empleó análogamente a la anterior descripción respecto a la obtención de dsARN. El dsARN-YFP obtenido es idéntico al dsARN empleado en el ejemplo de realización 1 como control de secuencias no específicas.

Se obtuvo un dsARN (L-dsARN) enlazado químicamente con el extremo 5' del ARN complementario en el extremo 3' del ARN según el protocolo de secuencia número 8 a través de un grupo cebador C18. A tal efecto se emplearon sintones modificados con puentes disulfuro. El sintón 3' terminal está unido al soporte sólido a través del carbono 3' con un grupo cebador alifático a través de un puente disulfuro. En el sintón 5' terminal del oligorribonucleótido complementario, complementario al sintón 3'-terminal de uno de los oligorribonucleótidos, el grupo protector 5'-trilito está enlazado a través de un cebador alifático adicional y un puente disulfuro. Tras la síntesis de ambas hebras simples, eliminación de grupos protectores e hibridación de los oligorribonucleótidos complementarios, los grupos tiol producidos llegan a la proximidad espacial entre sí. Mediante oxidación se enlazan entre sí las hebras simples a través de su cebador alifático y un puente disulfuro. A continuación se efectúa la purificación con ayuda de HPLC.

## ES 2 243 608 T3

### Preparación de cultivos celulares

Se incubaron las células en DMEM con 4,5 g/l de glucosa, 10% de suero vacuno fetal bajo un 7,5% de atmósfera de CO<sub>2</sub> a 37°C en cubetas de cultivo, y se pasaron antes de la consecución de la confluencia. El desprendimiento de las células se efectuó con tripsina/EDTA. Para la preparación de la microinyección se trasladaron las células a cubetas de petri, y se incubaron adicionalmente hasta la formación de microcolonias.

### Microinyección

Para la microinyección se extrajeron las cubetas de cultivo del incubador durante aproximadamente 10 minutos. Se inyectó de manera aislada en aproximadamente 50 núcleos celulares por carga dentro de una zona marcada bajo empleo del sistema de microinyección AIS de la firma Carl Zeiss, Göttingen, Alemania. A continuación se incubaron las células otras 3 horas. Para la microinyección se prepararon capilares de vidrio de silicato bórico de la firma Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Alemania, con un diámetro de punta por debajo de 0,5 µm. Se llevó a cabo la microinyección con un micromanipulador de la firma Narishige Scientific Instrument Lab., Tokio, Japón. El tiempo de inyección ascendía a 0,8 segundos, la presión aproximadamente a 100 hPa. Para la transfección se empleó el plásmido pCADN-YFP, que contenía un fragmento BamHI/EcoRI de aproximadamente 800 bp de tamaño con el gen de YFP en el vector pcADN3. Las muestras inyectadas en los núcleos celulares contenían 0,01 µg/µl de pCADN-YFP, así como Texas-Rot copulado en dextrano-70.000 en NaCl 14 mM, KCl 3 mM, KPO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7,5. Adicionalmente se añadieron unos 100 pl de ARN con una concentración de 1 µM, o bien 375 µM en el caso de L-dsARN.

Se analizaron las células por medio de un microscopio de fluorescencia en el caso de excitación con luz de longitudes de onda de excitación de Texas-Rot, 568 nm, o bien de YFP, 488 nm. Se documentaron células aisladas por medio de una cámara digital. Las figuras 4a-e muestran el resultado para células NIH3T3. En el caso de las células mostradas en la figura 4a se ha inyectado YFP-ssARN sentido, en la figura 4b YFP-ssARN antisentido, en la figura 4c dsARN-YFP, en la figura 4d no se ha inyectado ARN y en la figura 4e se ha inyectado LdsARN.

El campo izquierdo respectivamente muestra la fluorescencia de células que se excitaron con 568 nm. A la derecha se puede ver la fluorescencia de las mismas células en el caso de excitación con 488 nm. La fluorescencia de Texas-Rot de todas las células representadas muestran que la disolución de inyección se aplicó con éxito en los núcleos celulares, y las células afectadas estaban aún vivas después de 3 horas. Las células muertas ya no mostraban fluorescencia de Texas-Rot.

Los campos derechos respectivamente de las figuras 4a y 4b muestran que la expresión de YFP no se inhibió de manera visible en el caso de inyección de ARN de hebra simple en los núcleos celulares. El campo derecho de la figura 4c muestra células cuya fluorescencia de YFP ya no era identificable tras la inyección de dsARN-YFP. La figura 4d muestra como control células en las que no se había inyectado ARN. La célula representada en la figura 4e muestra, a través de la inyección de L-dsARN, que presenta zonas de secuencias homólogas al gen de YFP, una fluorescencia de YFP ya no identificable. Este resultado justifica que también los dsARN más cortos se pueden emplear para la inhibición específica de la expresión génica en mamíferos, si se estabilizan las hebras doble mediante enlace químico de las hebras simples.

### Literatura

**Asanuma, H., Ito, T., Yoshida, T., Liang, X. & Komiyama, M. (1999).** Photoregulation der Bildung und Dissoziation eines ADN-Duplexes durch cis-trans-Isomerisierung einer Azobenzoleinheit. *Angew. Chem.* **111**, 2547-2549.

**Azhayeva, E., Azhayev, A., Auriola, S., Tengvall, U., Urtili, A. & Lönnberg, H. (1997).** Inhibitory properties of double helix forming circular oligonucleotides. *Nucl. Acids Res.* **25**, 4954-4961.

**Castelli, J., Wood, K.A. & Youle, R.J. (1998).** The 2-5A system in viral infection and apoptosis. *Biomed. Pharmacother.* **52**, 386-390.

**Dolinnaya, N.G., Blumenfeld, M., Merenkova, I., Oretskaya, T.S., Krynetskaya, N.F., Ivanovskaya, M.G., Vasseur, M. & Shabarova, Z.A. (1993).** Oligonucleotide circularization by template-directed chemical ligation. *Nucl. Acids Res.* **21**, 5403-5407.

**Expert-Benzancon, A., Milet, M. & Carbon, P. (1983).** Precise localization of several covalent ARN-ARN cross-link in *Escherichia coli* 16S ARN. *Eur. J. Biochem.* **136**, 267-274.

**Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998).** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.

**Gao, H., Yang, M., Patel, R. & Cook, A.F. (1995).** Circularization of oligonucleotides by disulfide bridge formation. *Nucl. Acids Res.* **23** 2025-2029.

**Gryaznov, S.M. & Letsinger, R.L. (1993).** Template controlled coupling and recombination of oligonucleotide blocks containing thiophosphoryl groups. *Nucl. Acids Res.* **21**, 1403-1408.

## ES 2 243 608 T3

**Kaufman, R.J.** (1999). Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates virus-induced apoptosis: A new role for an old actor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11693-11695.

5 **Lipson, S.E. Hearst, J.E.** (1988). Psoralen cross-linking of ribosomal RNA. In *Methods in Enzymology Anonymous* pp. 330-341.

**Liu, Z.R., Sargueil, B. & Smith, C.W.** (1998). Detection of a novel ATP-dependent cross-linked protein at the 5' splice site-U1 small nuclear RNA duplex by methylene blue-mediated photo-cross-linking. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6910-6920.

10 **Micura, R.** (1999). Cyclic oligoribonucleotides (RNA) by solidphase synthesis. *Chem. Eur. J.* **5**, 2077-2082.

**Skripkin, E., Isel, C., Marquet, R., Ehresmann, B. & Ehresmann, C.** (1996). Psoralen crosslinking between human immunodeficiency virus type 1 RNA and primer tRNA<sub>3</sub><sup>Lys</sup>. *Nucl. Acids Res.* **24**, 509-514.

15 **Wang, S. & Kool, E.T.** (1994) Circular RNA oligonucleotides. Synthesis, nucleic acid binding properties, and a comparison with circular ADNs. *Nucl. Acids Res.* **22**, 2326-2333.

**Wang, Z. & Rana, T.M.** (1996). RNA conformation in the Tat-TAR complex determined by site-specific photo-cross-linking. *Biochem.* **35**, 6491-6499.

20 **Watkins, K.P. & Agabian, N.** (1991). *In vivo* UV cross-linking of U snRNAs that participate in trypanosome transsplicing. *Genes & Development* **5**, 1859-1869.

25 **Wengel, J.** (1999). Synthesis of 3'-C- and 4'-C-branched oligodeoxynucleotides and the development of locked nucleic acid (LNA). *Acc. Chem. Res.* **32**, 301-310.

**Zwieb, C., Ross, A., Rinke, J., Meinke, M. & Brimacombe, R.** (1978). Evidence for RNA-RNA cross-link formation in *Escherichia coli* ribosomes. *Nucl. Acids. Res.* **5**, 2705-2720.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la inhibición de la expresión de un gen objetivo predeterminado en una célula de mamífero *in vitro*, introduciéndose en la célula de mamífero un oligorribonucleótido de estructura de hebra doble (dsARN), presentando una hebra del dsARN una zona I complementaria al gen objetivo al menos por secciones, que presenta a lo sumo 49 pares de nucleótidos sucesivos, y formándose una zona II complementaria dentro de la estructura de hebra doble a partir de dos hebras simples de ARN separadas.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, presentando el dsARN 15 a 21 pares de bases.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, presentando el dsARN 21 a 49 pares de bases.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, presentando el dsARN 21 pares de bases.
- 15 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, incluyéndose el dsARN en estructuras micelares, preferentemente en liposomas.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, exprimiéndose el gen objetivo en células eucariotas.
- 20 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, siendo seleccionado el gen objetivo a partir del siguiente grupo: oncogén, gen de citoquina, gen de proteína Id, gen de desarrollo, gen prión.
- 25 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, siendo el gen objetivo componente de un virus o viroide.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, siendo el virus un virus o viroide patógeno humano.
- 30 10. Procedimiento según la reivindicación 8, siendo el virus o viroide un virus o viroide patógeno animal.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, modificándose los extremos del dsARN para contrarrestar una degradación en la célula o una disociación en las hebras simples.
- 35 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, aumentándose la cohesión de la zona II complementaria, provocada mediante los pares de nucleótidos, mediante al menos un enlace, preferentemente dos enlaces químicos adicionales.
- 40 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, formándose el enlace químico mediante un enlace covalente o iónico, un enlace por puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas, preferentemente interacciones en van-der-Waals, o interacciones de apilado, o mediante coordinación de iones metálicos.
- 45 14. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, obteniéndose el enlace químico en al menos uno, preferentemente en ambos extremos de la zona II complementaria.
- 50 15. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, formándose el enlace químico por medio de uno o varios grupos de enlace, siendo los grupos de enlace preferentemente cadenas de poli-(oxifosfinicooxi-1,3-propanodiol) y/o polietilenglicol.
16. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, formándose el enlace químico mediante análogos de purina utilizados en lugar de purinas en las zonas II complementarias.
17. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, formándose el enlace químico mediante unidades azabenceno introducidas en las zonas II complementarias.
- 55 18. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, formándose el enlace químico mediante análogos de nucleótidos ramificados utilizados en lugar de nucleótidos en las zonas II complementarias.
- 60 19. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, utilizándose para la obtención del enlace químico al menos uno de los siguientes grupos: azul de metileno; grupos bifuncionales, preferentemente bis-(2-cloroetil)-amina; N-acetil-N<sup>7</sup>-(p-glioxil-benzoil)-cistamina; 4-tiouracilo; psoraleno.
20. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, formándose el enlace químico mediante grupos tiofosforilo aplicados en los extremos de la zona de hebra doble.
- 65 21. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, estando substituido al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos del dsARN en la estructura de hebra doble por un grupo químico, preferentemente un grupo 2'-amino, o 2'-metilo.

## ES 2 243 608 T3

22. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, siendo al menos un nucleótido en al menos una hebra de la zona II complementaria un "locked nucleotide" con un anillo sacárico modificado químicamente, preferentemente por medio de un puente 2'-O, 4'-C- metileno.
- 5 23. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, enlazándose el dsARN al menos a una proteína envolvente viral procedente de un virus, derivado del mismo, u obtenida sintéticamente, asociándose con la misma, o envolviéndose por la misma.
24. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, siendo una hebra de dsARN complementaria al  
10 elemento de transcripción de ARN primario o procesado del gen objetivo.
25. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, siendo la célula una célula humana.
26. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, introduciéndose al menos dos dsARN o diferen-  
15 tes entre sí en la célula, siendo una hebra de cada dsARN complementaria, al menos por secciones, respectivamente a uno de al menos dos genes objetivo diferentes.
27. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, siendo uno de los genes objetivo el gen de PKR.
- 20 28. Medicamento con al menos un oligorribonucleótido de estructura de hebra doble formada a partir de dos hebras simples de ARN separadas (dsARN) para la inhibición de la expresión de un gen objetivo predeterminado, presentando una hebra de dsARN una zona I complementaria al gen objetivo al menos por secciones, que presenta a lo sumo 49 pares de nucleótidos sucesivos, y formándose una zona II complementaria dentro de la estructura de hebra doble a partir de dos hebras simples de ARN separadas.
- 25 29. Medicamento según la reivindicación 28, presentando el dsARN 15 a 21 pares de bases.
30. Medicamento según la reivindicación 28, presentando el dsARN 21 a 49 pares de bases.
- 30 31. Medicamento según la reivindicación 28, presentando el dsARN 21 pares de bases.
32. Medicamento según una de las reivindicaciones 28 a 31, presentándose el dsARN empaquetado en estructuras micelares, preferentemente en liposomas.
- 35 33. Medicamento según una de las reivindicaciones 28 a 32, siendo exprimible el gen objetivo en células eucariotas.
34. Medicamento según una de las reivindicaciones 28 a 33, siendo seleccionado el gen objetivo a partir de: oncogén, gen de citoquina, gen de proteína Id, gen de desarrollo, gen prión.
- 40 35. Medicamento según una de las reivindicaciones 28 a 34, siendo exprimible el gen objetivo en organismos patógenos, preferentemente en plasmodios.
36. Medicamento según una de las reivindicaciones 28 a 35, siendo el gen objetivo componente de un virus o viroide.  
45
37. Medicamento según la reivindicación 36, siendo el virus un virus o viroide patógeno humano.
38. Medicamento según la reivindicación 36, siendo el virus o viroide un virus o viroide patógeno animal.
- 50 39. Medicamento según una de las reivindicaciones 28 a 38, estando modificados los extremos del dsARN para contrarrestar una degradación en la célula o una disociación en las hebras simples.
40. Medicamento según una de las reivindicaciones 28 a 39, aumentándose la cohesión de la zona II complementaria provocada por los pares de nucleótidos complementarios mediante al menos uno, preferentemente dos enlaces  
55 químicos adicionales.
41. Medicamento según una de las reivindicaciones 28 a 40, formándose el enlace químico mediante un enlace covalente o iónico, un enlace por puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas, preferentemente interacciones en van-der-Waals, o interacciones de apilado, o mediante coordinación de iones metálicos.  
60
42. Medicamento según una de las reivindicaciones 28 a 41, obteniéndose el enlace químico en al menos uno, preferentemente en ambos extremos de la zona II complementaria.
43. Medicamento según una de las reivindicaciones 28 a 42, formándose el enlace químico por medio de uno o va-  
65 rios grupos de enlace, siendo los grupos de enlace preferentemente cadenas de poli-(oxifosfinicooxi-1,3-propanodiol) y/o polietilenglicol.

## ES 2 243 608 T3

44. Medicamento según una de las reivindicaciones 28 a 43, formándose el enlace químico mediante análogos de purina utilizados en lugar de purinas en las zonas II complementarias.
45. Medicamento según una de las reivindicaciones 28 a 44, formándose el enlace químico mediante unidades azabenceno insertadas en las zonas II complementarias.
46. Medicamento según una o varias de las reivindicaciones 28 a 45, formándose el enlace químico mediante análogos de nucleótidos ramificados utilizados en lugar de nucleótidos en las zonas II complementarias.
47. Medicamento según una de las reivindicaciones 28 a 46, utilizándose para la obtención del enlace químico al menos uno de los siguientes grupos: azul de metileno; grupos bifuncionales, preferentemente bis-(2-cloroetil)-amina; N-acetil-N'-(p-glioxil-benzoil)-cistamina; 4-tiouracilo; psoraleno.
48. Medicamento según una de las reivindicaciones 27 a 48, formándose el enlace químico mediante grupos tiofosforilo previstos en los extremos de la zona de hebra doble.
49. Medicamento según una de las reivindicaciones 28 a 48, estando substituido al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos del dsARN en la zona II complementaria por un grupo químico, preferentemente un grupo 2'-amino, o 2'-metilo.
50. Medicamento según una de las reivindicaciones 28 a 49, siendo al menos un nucleótido en al menos una hebra de la zona II complementaria un "locked nucleotide" con un anillo sacárico modificado químicamente, preferentemente por medio de un puente 2'-O, 4'-C-metileno.
51. Medicamento según una de las reivindicaciones 28 a 50, enlazándose el dsARN a al menos una proteína envolvente viral procedente de un virus, derivado del mismo, u obtenida sintéticamente, asociándose con la misma, o envolviéndose por la misma.
52. Medicamento según una de las reivindicaciones 28 a 51, siendo el dsARN complementario al elemento de transcripción de ARN primario o procesado del gen objetivo.
53. Medicamento según una de las reivindicaciones 28 a 52, siendo la célula una célula humana.
54. Medicamento según una de las reivindicaciones 28 a 53, estando contenidos al menos dos dsARN o diferentes entre sí en la célula, siendo una hebra de cada dsARN complementaria, al menos por secciones, respectivamente a uno de al menos dos genes objetivo diferentes.
55. Medicamento según la reivindicación 54, siendo uno de los genes objetivo el gen de PKR.
56. Empleo de un oligorribonucleótido que presenta 15 a 49 pares de bases con estructura de hebra doble (dsARN) para la obtención de un medicamento, presentando una hebra del dsARN una zona I complementaria a un gen objetivo predeterminado en células de mamíferos, al menos por secciones, que presenta a lo sumo 49 pares de nucleótidos sucesivos, y formándose una zona II complementaria dentro de la estructura de hebra doble a partir de dos hebras simples de ARN separadas.
57. Empleo según la reivindicación 56, presentando el dsARN 15 a 21 pares de bases.
58. Empleo según la reivindicación 56, presentando el dsARN 21 a 49 pares de bases.
59. Procedimiento según la reivindicación 56, presentando el dsARN 21 pares de bases.
60. Empleo según una de las reivindicaciones 56 a 59, presentándose el dsARN empaquetado en estructuras micelares, preferentemente en liposomas.
61. Empleo según una de las reivindicaciones 56 a 60, siendo exprimible el gen objetivo en células eucariotas.
62. Empleo según una de las reivindicaciones 56 a 61, siendo seleccionado el gen objetivo a partir de: oncogén, gen de citoquina, gen de proteína Id, gen de desarrollo, gen prión.
63. Empleo según una de las reivindicaciones 56 a 62, siendo exprimible el gen objetivo en organismos patógenos, preferentemente en plasmidios.
64. Empleo según una de las reivindicaciones 56 a 63, siendo el gen objetivo componente de un virus o viroide.
65. Empleo según la reivindicación 64, siendo el virus un virus o viroide patógeno humano.
66. Empleo según la reivindicación 64, siendo el virus o viroide un virus o viroide patógeno animal.

## ES 2 243 608 T3

67. Empleo según una de las reivindicaciones 56 a 66, estando modificados los extremos del dsARN para contrarrestar una degradación en la célula o una disociación en las hebras simples.

5 68. Empleo según una de las reivindicaciones 56 a 67, aumentándose la cohesión de la zona II complementaria provocada por los pares de nucleótidos complementarios mediante al menos uno, preferentemente dos enlaces químicos adicionales.

10 69. Empleo según una de las reivindicaciones 56 a 68, formándose el enlace químico mediante un enlace covalente o iónico, un enlace por puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas, preferentemente interacciones en van-der-Waals, o interacciones de apilado, o mediante coordinación de iones metálicos.

70. Empleo según una de las reivindicaciones 56 a 69, obteniéndose el enlace químico en al menos uno, preferentemente en ambos extremos de la zona II complementaria.

15 71. Empleo según una de las reivindicaciones 56 a 70, formándose el enlace químico por medio de uno o varios grupos de enlace, siendo los grupos de enlace preferentemente cadenas de poli-(oxifosfinicoxi-1,3-propanodiol) y/o polietilenglicol.

20 72. Empleo según una de las reivindicaciones 56 a 71, formándose el enlace químico mediante análogos de purina utilizados en lugar de purinas en las zonas II complementarias.

73. Empleo según una de las reivindicaciones 56 a 72, formándose el enlace químico mediante unidades azabenceno insertadas en las zonas II complementarias.

25 74. Empleo según una de las reivindicaciones 56 a 73, formándose el enlace químico mediante análogos de nucleótidos ramificados utilizados en lugar de nucleótidos en las zonas II complementarias.

30 75. Empleo según una de las reivindicaciones 56 a 74, utilizándose para la obtención del enlace químico al menos uno de los siguientes grupos: azul de metileno; grupos bifuncionales, preferentemente bis-(2-cloroetil)-amina; N-acetil-N'-(p-glioxil-benzoil)-cistamina; 4-tiouracilo; psoraleno.

76. Empleo según una de las reivindicaciones 56 a 75, formándose el enlace químico mediante grupos tiofosforilo aplicados en los extremos de la zona de hebra doble.

35 77. Medicamento según una de las reivindicaciones 56 a 76, estando substituido al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos del dsARN en la zona II complementaria por un grupo químico, preferentemente un grupo 2'-amino, o 2'-metilo.

40 78. Empleo según una de las reivindicaciones 56 a 77, siendo al menos un nucleótido en al menos una hebra de la zona II complementaria un "locked nucleotide" con un anillo sacárico modificado químicamente, preferentemente por medio de un puente 2'-O, 4'-C-metileno.

45 79. Empleo según una de las reivindicaciones 56 a 78, enlazándose el dsARN a al menos una proteína envolvente viral procedente de un virus, derivado del mismo, u obtenida sintéticamente, asociándose con la misma, o envolviéndose por la misma.

80. Empleo según una de las reivindicaciones 56 a 79, siendo el dsARN complementario al elemento de transcripción de ARN primario o procesado del gen objetivo.

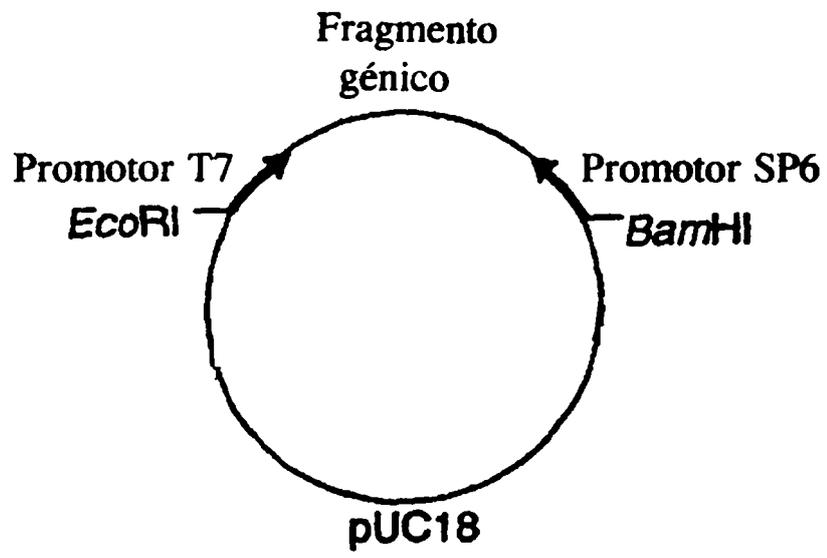
50 81. Empleo según una de las reivindicaciones 56 a 80, siendo la célula una célula humana.

82. Empleo según una de las reivindicaciones 56 a 81, empleándose al menos dos dsARN diferentes entre, siendo una hebra de cada dsARN complementaria, al menos por secciones, respectivamente a uno de al menos dos genes objetivo diferentes.

55 83. Empleo según la reivindicación 82, siendo uno de los genes objetivo el gen de PKR.

60 84. Empleo según una de las reivindicaciones 56 a 83, siendo inyectable el medicamento en la vía sanguínea o el intersticio del organismo a someter terapia.

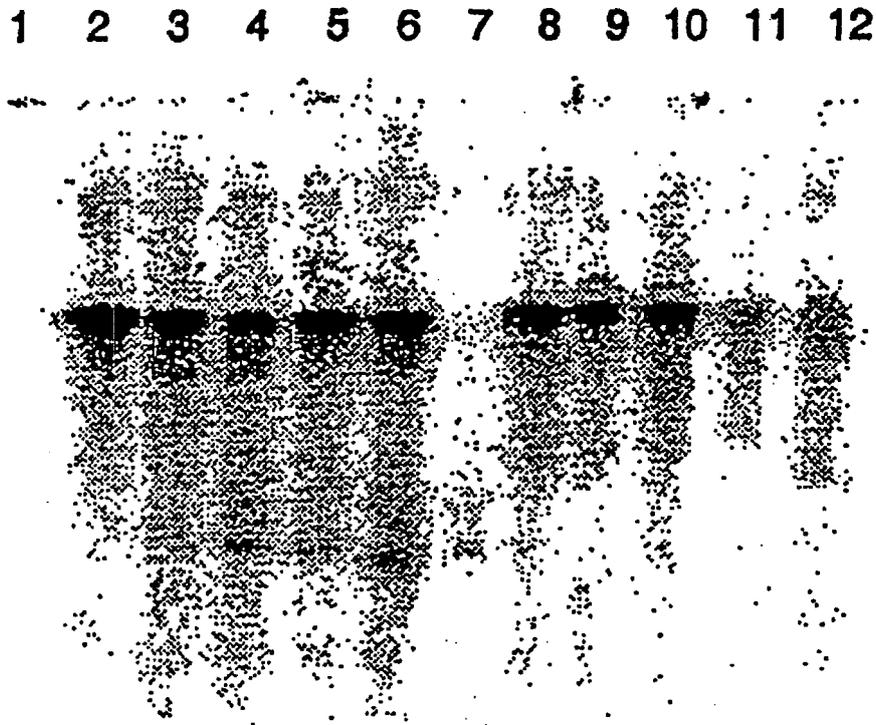
65



**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**

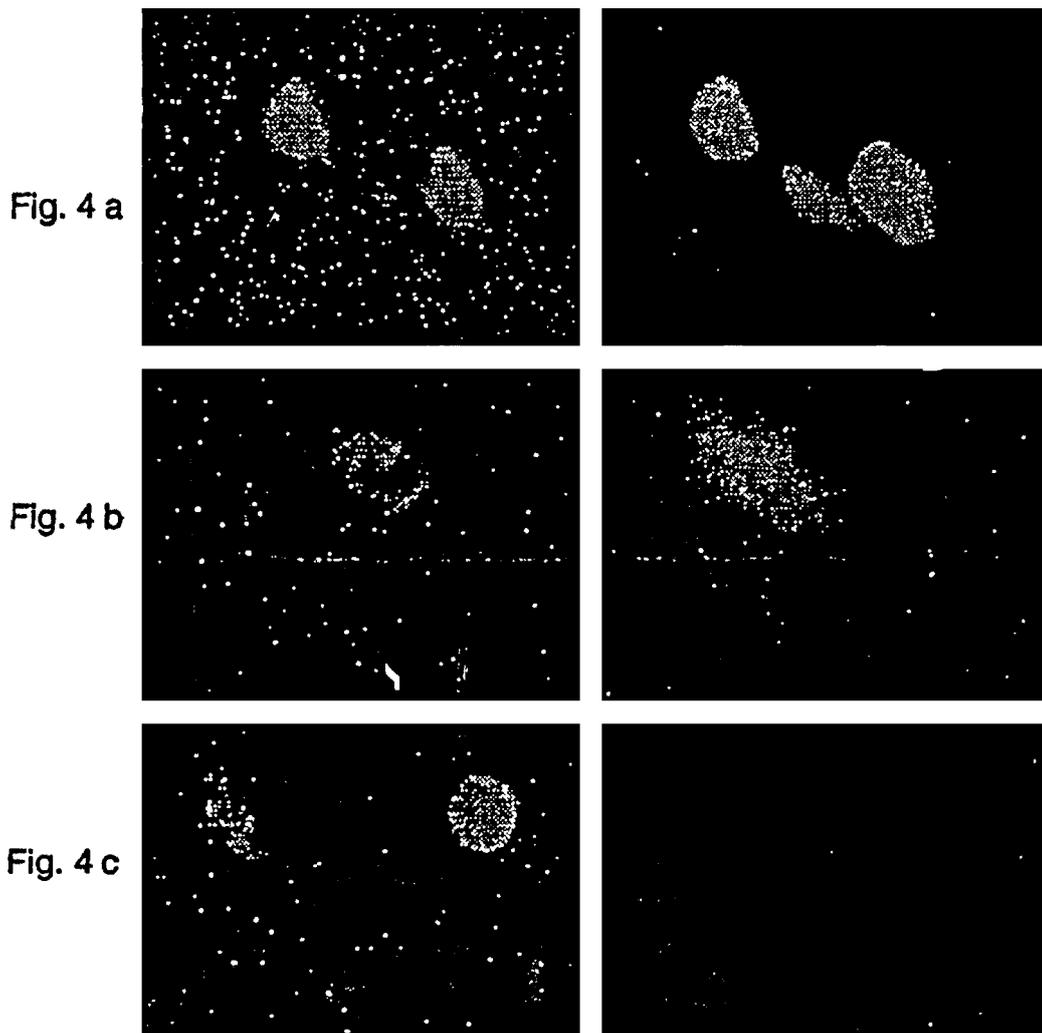


Fig. 4 d

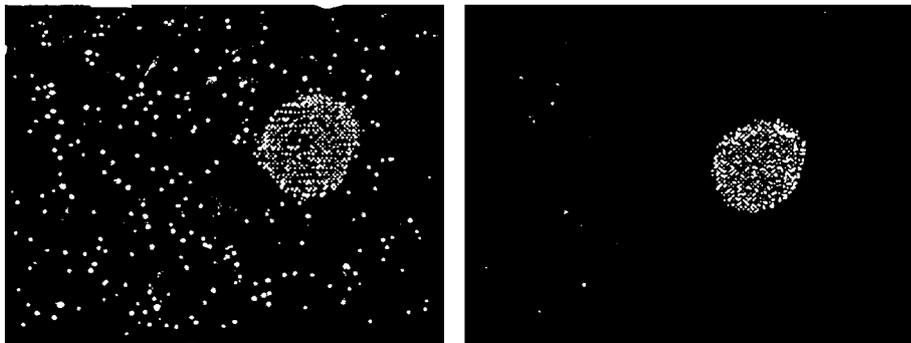
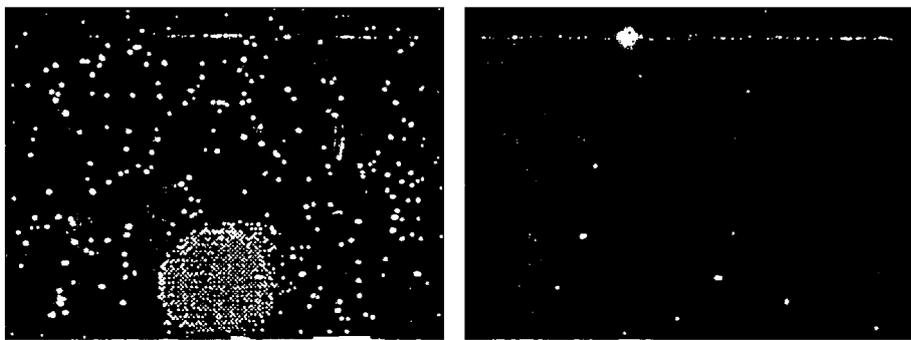


Fig. 4 e



# ES 2 243 608 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Kreutzer Dr., Roland  
Limmer Dr., Stephan  
5
- <120> Procedimiento y medicamento para la inhibición de la expresión de un gen predeterminado
- <130> 400968  
10
- <140>  
<141>
- <150> 199 03 713.2  
<151> 1999-01-30  
<150> 199 56 568.6  
<151> 1999-11-24  
20
- <160> 8
- <170> PatentIn Ver. 2.1  
25
- <210> 1  
<211> 45  
<212> ADN  
30 <213> Secuencia artificial
- <220>  
35 <223> Descripción de la secuencia artificial: punto de corte EcoRI, promotor de polimerasa T7-ARN
- <400> 1  
40 ggaattctaa tacgactcac tatagggcga tcagatctct agaag 45
- <210> 2  
<211> 50  
<212> ADN  
45 <213> Secuencia artificial
- <220>  
50 <223> Descripción de la secuencia artificial:punto de corte BamHI, promotor de polimerasa SP6-ARN
- <400> 2  
55 gggatccatt tagtgacac tatagaatac ccatgatgagc gtagtcgata 50
- <210> 3  
<211> 340  
<212> ARN  
60 <213> Secuencia artificial
- <220>  
65 <223> Descripción de la secuencia artificial: ARN, que corresponde a una secuencia de “positive control DNA” del kit de transcripción HeLaScribe Nuclear Extract *in vitro* de la firma Promega

## ES 2 243 608 T3

<400> 3

|    |   |            |
|----|---|------------|
|    | <b>ucagaucucu agaagcuuua augcgguagu uuaucaacagu uaaaungcua acgcagucag</b> | <b>60</b>  |
| 5  | <b>gcaccgugua ugaaaucuaa caaugcguc aucgucaucc ueggcaccgu caccuggau</b>    | <b>120</b> |
|    | <b>gcuguaggca uaggcuuggu uaugccgua cugccggcc ucuugcggga uaucguccau</b>    | <b>180</b> |
|    | <b>uccgacagca uegccaguca cuauggcgug cugcuagcgc uauaugcguu gaugcauuu</b>   | <b>240</b> |
| 10 | <b>cuaugcgcac ccguucucgg agcacugucc gaccguuug gccgcgcgcc aguccugcuc</b>   | <b>300</b> |
|    | <b>gcuuugcuac uuggagccac uaucgacuac gcgaucaugg</b>                        | <b>340</b> |

<210> 4

15 <211> 363

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ARN, que corresponde a una secuencia de “positive control DNA” del kit de transcripción HeLaScribe Nuclear Extract *in vitro* de la firma Promega

25 <400> 4

|    |  |            |
|----|--|------------|
|    | <b>tcagatctct agaagcttta atgcggtagt ttatcacagt taaattgcta acgcagtcag</b> | <b>60</b>  |
|    | <b>gcaccgtgta tgaaatctaa caatgcctc ategtcatec tggcaccgt caccctggat</b>   | <b>120</b> |
| 30 | <b>gctgtaggca taggcttggg tatgccgga ctgccggcc tcttcggga tctctccat</b>     | <b>180</b> |
|    | <b>tccgacagca tgcagtcata ctatggctg ctgctagcgc tatatcgctt gatgcaattt</b>  | <b>240</b> |
|    | <b>ctatgcgcac cgtctctgg agcactgtcc gaccgcttg gccgcgcgcc agtctctc</b>     | <b>300</b> |
| 35 | <b>gcttctctac ttggagccac tctgactac ggcgatctgg cgaccacacc cgtctctg</b>    | <b>360</b> |
|    | <b>atc</b>   | <b>363</b> |

40 <210> 5

<211> 315

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del gen YFP

50 <400> 5

|    |  |            |
|----|--|------------|
|    | <b>auggugagca agggcgagga gcuguucacc gggguggugc ccauccuggu cgagcuggac</b> | <b>60</b>  |
|    | <b>ggcgacguua acggccacaa guucagcgug uccggcgagg gcgagggcga ugccaccuac</b> | <b>120</b> |
| 55 | <b>ggcaagcuga ccugaaguu caucugcacc accggcaage ugcccugcc cuggeccacc</b>   | <b>180</b> |
|    | <b>cucgugacca ccugaccua cggcgugcag ugcuucagcc gcuaccccga ccacaugaag</b>  | <b>240</b> |
|    | <b>cagcagacu ucuucaaguc cgccaugccc gaaggcuacg uccaggagcg caccaucuuc</b>  | <b>300</b> |
| 60 | <b>uucaaggacg acggc</b>  | <b>315</b> |

<210> 6

<211> 52

65 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

## ES 2 243 608 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: punto de corte EcoRI, promotor de polimerasa T7-ARN, zona complementaria al gen YFP

5

<400> 6

ggaattctaa tacgactcac tatagggcga atggtgagca agggcgagga gc

52

10

<210> 7

<211> 53

<212> ADN

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Punto de corte BamHI, promotor de polimerasa SP6-ARN, zona complementaria al gen YFP

20

<400> 7

gggatccatt taggtgacac tatagaatac gccgtcgtcc tgaagaaga tgg

53

25

<210> 8

<211> 21

<212> ARN

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ARN, que corresponde a una secuencia del gen YFP

35

<400> 8

ucgagcugga cggcgacgua a

21

40

45

50

55

60

65