

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



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

51 Int. Cl.:

**C12N 15/11** (2006.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2000 E 02003683 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **10.10.2018 EP 1214945**

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

30 Prioridad:

**30.01.1999 DE 19903713**

**24.11.1999 DE 19956568**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:  
**21.03.2019**

73 Titular/es:

**ALNYLAM EUROPE AG (100.0%)**

**Fritz-Hornschuch-Strasse 9**

**95326 Kulmbach, DE**

72 Inventor/es:

**KREUTZER, ROLAND DR. y**

**LIMMER, STEFAN DR.**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 243 608 T5

## DESCRIPCIÓN

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

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.

5 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.

10 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.

15 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.

20 Según Fire, A., "RNA-triggered gene silencing", TIG September 1999, vol. 15, nº 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  
25 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.

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, nº 7, páginas 945-949.

30 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.

35 La DE 196 31 919 C2 describe un ARN antisentido con estructuras secundarias especiales, presentándose el ARN antisentido en forma de un vector que lo codifica. En el caso del ARN antisentido se trata de una molécula de ARN que es complementaria a zonas de mRNA. 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 mRNA. La eficacia de los  
40 procedimientos antisentido conocidos no es especialmente elevada.

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  
45 irregulares, los denominados "Nicht-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 interferón, 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 a un gen a inhibir de un nematodo, inhibe la expresión de este gen con una eficacia elevada. Se considera 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  
55 génica, en especial en células de mamíferos y células humanas.

Es tarea de la presente invención eliminar los inconvenientes según el estado de la técnica. Se debía indicar en especial un procedimiento, medicamento lo más eficiente posible, y un empleo lo más eficiente posible para la obtención de un medicamento 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, 24 y 48. Resultan configuraciones ventajosas de las reivindicaciones 2 a 23, 25 a 47 y 49 a 72.

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  
10 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, en cuyo caso la cohesión de la zona II que es causada por los pares de nucleótidos se incrementa por un enlace químico adicional y el enlace químico se produce en un extremo de la zona complementaria II. El oligorribonucleótido presenta una secuencia de nucleótidos definida al menos por secciones. La sección definida puede estar limitada a la zona I  
15 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 dsARN. 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.

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  
25 definida. De este modo se bloquea la biosíntesis de proteínas en la célula. En especial se elimina este inconveniente mediante la presente invención.

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.

30 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.

Convenientemente se expresa 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 prion. También se puede  
35 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.

40 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.

El dsARN puede presentar 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 zona complementaria II  
45 provocada por los pares de nucleótidos a través de al menos otro enlace químico. 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.

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  
50 coordinación de iones metálicos. Según la invención, se puede obtener el mismo al menos en 1, preferentemente en ambos extremos de la zona complementaria II.

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-(oxifosfinicoxi-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  
55 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.

- 5 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.
- 10 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 zona complementaria II 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".
- 15 Según otra forma de realización especialmente ventajosa, 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 polio. La proteína envolvente puede contener la proteína viral 1(VP1) y/o la proteína viral 2(VP2) del virus de polio. Se conoce el empleo de tales proteínas envolventes, por ejemplo, por la DE 19618 797 A1, cuyo contenido divulgado se incorpora a la presente descripción. Las características citadas anteriormente facilitan de manera esencial la introducción de dsARN en la célula.
- 20 Preferentemente, en el caso de formación de una cápside o de una estructura de tipo cápside a partir de la proteína envolvente, uno de los lados está orientado al interior de la cápside o de la estructura de tipo cápside. 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.
- 25 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.
- 30 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, en cuyo caso la cohesión de la zona complementaria II, causada por los pares de nucleótidos, se incrementa gracias a otro enlace químico y el enlace químico se produce en un extremo de la zona II complementaria. 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.
- 35 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, presentando una hebra del dsARN una zona I complementaria al menos por secciones a un gen objetivo predeterminado, en células de mamíferos, 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, en cuyo caso la cohesión de la zona complementaria II, causada por los pares de nucleótidos, se incrementa gracias a otro enlace químico y el enlace químico se produce en un extremo de la zona complementaria II.
- 40 - 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 de 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.
- 45 Con respecto a acondicionamientos ventajosos del medicamento, y al empleo, se remite a la descripción de las características precedentes.
- 50
- 55

A continuación, se explican más detalladamente los ejemplos 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,  
 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

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

**Ejemplo de referencia 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 la PCR por medio del "Taq PCE Core Kit" de la firma Qiagen, Hilden, Alemania, según datos del fabricante. En un volumen de 100 µl se emplearon como matriz MgCl<sub>2</sub> de 1,5 mM, respectivamente dNTP 200 µM, respectivamente cebador 0,5 µM, 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, hibridación 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 µl 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 hebra simple de 340 nucleótidos de longitud, representado en el protocolo de secuencia número 3. 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 nº 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 µg de ADN de plásmido linealizado en 100 µl 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 µl 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 µl, y se purificó mediante extracción con fenol. Se precipitó el ARN mediante adición de 150 µl de acetato amónico 7 M, y 1125 µl de etanol, y se conservó a -65°C para la hibridación.

Obtención de las hebras dobles de ARN:

Para la hibridación se centrifugaron 500 µl del ARN de hebra simple conservado en etanol y precipitado. Se secó el comprimido resultante, y se absorbió en 30 µl de tampón PIPES, pH 6,4, en presencia de un 80 % de formamida, 400 mM NaCl y 1 mM EDTA. Se reunieron respectivamente 15 µl 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.

5 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  
 10 contaminaciones de ssARN, se trataron las cargas tras la hibridación con las ribonucleasas específicas de hebra 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 µl Tris, pH  
 7,4, NaCl 300 mM y EDTA 5 mM, 1,2 µl RNasaA en una concentración de 10 mg/ml y 2 µl de RNasaT1 en una  
 15 concentración de 290 µg/ml. Se incubaron las cargas 1,5 horas a 30°C. Después se desnaturalizaron las RNasas mediante adición de 5 µl de proteinasa K en una concentración de 20 mg/ml, así como 10 µl de SDS al 20 %, e  
 20 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.

25 Se absorbió el comprimido desecado en 15 µl 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  
 30 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  
 35 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  
 40 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  
 30 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  
 35 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  
 40 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 µM, rGTP 16 µM, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]rGTP 0,4 µM, y según ensayo, un fmol 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 µl. Se mezclaron cuidadosamente las cargas. Para la iniciación  
 45 de la transcripción se añadieron 4 U de extracto nuclear HeLa en un volumen de 4 µl y se incubaron durante 60 minutos a 30°C. Se concluyó la reacción mediante adición de 87,5 µl al Stopp-Mix calentado a 30°C. Para la eliminación de las proteínas se mezclaron las cargas con 100 µl de fenol/cloroforno, 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  
 50 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 µl 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 µl de H<sub>2</sub>O. Se añadieron a cada carga 10 µl 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  
 55 tampón de muestra desnaturalizante, se calentaron 10 minutos a 90°C, e inmediatamente se aplicaron 10 µl 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 µg de dsARN-YFP;
traza 4:	50 ng de ADN matriz, 1,5 µg de dsARN-YFP;
traza 5:	50 ng de ADN matriz, 3 µg de dsARN-YFP;
traza 6:	50 ng de ADN matriz, 5 µg de dsARN-YFP;
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 µg de dsARN-CMV5;
traza 10:	50 ng de ADN matriz, 1,5 µg de dsARN-CMV5;
traza 11:	50 ng de ADN matriz, 3 µg de dsARN-CMV5;
traza 12:	50 ng de ADN matriz, 5 µg 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 µg, 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:**

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.

**30 Construcción del plásmido matriz y obtención del dsARN:**

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 enlazador 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 enlazador 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 enlazador 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 enlazador alifático y un puente disulfuro. A continuación, se efectúa la purificación con ayuda de HPLC.

#### 10 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.

#### 15 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 L-dsARN.

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 muestra 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 dobles mediante enlace químico de las hebras simples.

#### 45 Bibliografía:

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., Urtti, A. & Lönnberg, H. (1997). Inhibitory properties of double helix forming circular oligonucleotides. *Nucl. Acids Res.* 25, 4954-4961.

#### 50 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 un *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- 5 Gao, H., Yang, M., Patel, R. & Cook, A.F. (1995). Circulaization of oligonucleotidos 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.
- 10 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.
- 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 bluemediated photo-cross-linking. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6910-6920.
- 15 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.
- 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.
- 20 Wang, Z. & Rana, T.M. (1996). RNA conformation in the Tat-TAR complex determined by site-specific photo-cross-linking. *Biochem.* 35, 6491-6499.
- 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 oligodeoxinucleo-tides 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.

PROTOCOLO DE SECUENCIA

- <110> Kreuzer Dr., Roland
- 30 Limmer Dr., Stephan
- <120> Procedimiento y medicamento para la inhibición de la expresión de un gen predeterminado
- <130> 400968
- <140>
- <141>
- 35 <150> 199 03 713.2
- <151> 1999-01-30
- <150> 199 56 568.6
- <151> 1999-11-24
- <160> 8
- 40 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 45

## ES 2 243 608 T5

- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: punto de corte EcoRI, promotor de polimerasa T7-ARN
- 5 <400> 1
- ggaattctaa tacgactcac tatagggcga tcagatctct agaag 45
- <210> 2
- <211> 50
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial:  
punto de corte BamHI, promotor de polimerasa SP6-ARN
- <400> 2
- 15 gggatccatt tagtgacac tatagaatac ccatgatcgc gtagtcgata 50
- <210> 3
- <211> 340
- <212> ARN
- <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
- <400> 3
- ucagaucucu agaagcuuuu augcggugu uuaucacagu uaaauugcua acgcagucag 60
- 25 gcaccgugua ugaaaucuaa caaugcgcuc aucgucaucc ucggcaccgu caccucggau 120
- gcuguaggca uaggcuuggu uaugccgguu cugccgggcc ucuugcggga uaucguccau 180
- uccgacagca ucgccaguca cuauggcgug cugcuagcgc uauaugcguu gaugcauuu 240
- cuaugcgcac ccguucucgg agcacugucc gaccgcuuug gccgccgcc aguccugcuc 300
- gcuucgcuac uuggagccac uaucgacuac gcgaucaugg 340
- 30 <210> 4
- <211> 363
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 35 <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
- <400> 4

## ES 2 243 608 T5

	tcagatctct agaagcttta atgcggtagt ttatcacagt taaattgcta acgcagtcag	60
	gcaccgtgta tgaaatctaa caatgcgctc atcgcatcc tcggcaccgt caccctggat	120
	gctgtaggca taggcttggg tatgccggtg ctgccgggcc tctgcgga tatcgccat	180
	tccgacagca tcgccagtca ctatggcgtg ctgctagcgc tatatgctt gatgcaatt	240
5	ctatgcgcac ccgttctcgg agcactgtcc gaccgcttg gccgccgcc agtctctctc	300
	gcttctctac ttggagccac tatcgactac gcgatcatgg cgaccacacc cgtctgtgg	360
	atc	363
	<210> 5	
	<211> 315	
10	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del gen YFP	
	<400> 5	
15	auggugagca agggcgagga gcuguucacc gggguggugc ccauccuggu cgagcuggac	60
	ggcgagcguaa acggccacaa guucagcgug uccggcgagg gcgagggcga ugccaccuac	120
	ggcaagcuga ccugaaguu caucugcacc accggcaagc ugcccugucc cuggcccacc	180
	cucgugacca cccugaccua cggcgugcag ugcuuagcc gcuaccccga ccacaugaag	240
	cagcacgacu ucuucaaguc cgccaugccc gaaggcuacg uccaggagcg caccaucuuc	300
20	uucaaggacg acggc	315
	<210> 6	
	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: punto de corte EcoRI, promotor de polimerasa T7-ARN, zona complementaria al gen YFP	
	<400> 6	
	ggaattctaa tacgactcac tatagggcga atggtgagca agggcgagga gc	52
30	<210> 7	
	<211> 53	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Punto de corte BamHI, promotor de polimerasa SP6-ARN, zona complementaria al gen YFP	
	<400> 7	
	gggatccatt taggtgacac tatagaatac gccgtctcc tgaagaaga tgg	53

<210> 8

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

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

<400> 8

ucgagcugga cggcgacgua a

21

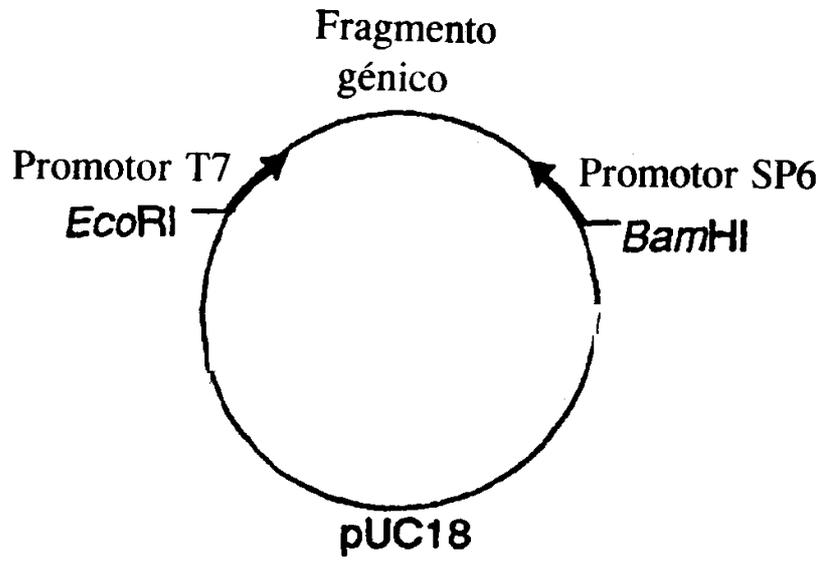
**REIVINDICACIONES**

- 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) que presenta 15 a 49 pares de bases, 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, en cuyo caso la cohesión de la zona complementaria II causada por los pares de nucleótidos se incrementa gracias a otro enlace químico y el enlace químico se produce en un extremo de la zona complementaria II.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el dsARN se incluye en estructuras micelares, de preferencia en liposomas.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores donde el gen objetivo se expresa en células eucariotas.
4. Procedimiento una de las reivindicaciones anteriores donde el gen objetivo se selecciona de: oncogén, gen de citoquina, gen de proteína Id, gen de desarrollo, gen de prion.
- 15 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde el gen objetivo es componente de un virus o viroide.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, donde el virus es un virus o viroide patógeno humano.
7. Procedimiento según la reivindicación 5, donde el virus o viroide es un virus o viroide patógeno animal siendo seleccionado el gen objetivo a partir del siguiente grupo: oncogén, gen de citoquina, gen de proteína Id, gen de desarrollo, gen prion.
- 20 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde los extremos del dsARN se modifican para contrarrestar una degradación en la célula o una disociación en las hebras simples.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde la cohesión de la zona II complementaria, causada por los pares de nucleótidos, se incrementa mediante al menos otro enlace químico.
- 25 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde el enlace químico se forma mediante un enlace covalente o iónico, un enlace por puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas, preferentemente interacciones de van-der-Waals, o interacciones de apilado, o mediante coordinación de iones metálicos.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde el enlace químico se forma por medio de uno o varios grupos de enlace, y los grupos de enlace son preferentemente cadenas de poli-(oxifosfinocooxi-1,3-propanodiol) y/o polietilenglicol.
- 30 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde el enlace químico se forma mediante análogos de purina utilizados en lugar de purinas en las zonas II complementarias.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde el enlace químico se forma mediante unidades azabenceno introducidas en las zonas II complementarias.
- 35 14. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde el enlace químico se forma mediante análogos de nucleótidos ramificados utilizados en lugar de nucleótidos en las zonas II complementarias.
15. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde para la obtención del enlace químico se utiliza 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.
- 40 16. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde el enlace químico se forma mediante grupos tiofosforilo aplicados en los extremos de la zona de hebra doble.
17. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos del dsARN en la estructura de hebra doble se reemplaza por un grupo químico, preferentemente un grupo 2'-amino, o 2'-metilo.
- 45 18. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde al menos un nucleótido en al menos una hebra de la zona II complementaria es un "locked nucleotide" con un anillo sacárico modificado químicamente, preferentemente por medio de un puente 2'-O, 4'-C-metileno.
19. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde el dsARN se enlaza a, se asocia con o se envuelve por al menos una proteína envolvente viral procedente de un virus, derivada del mismo, o preparada sintéticamente.

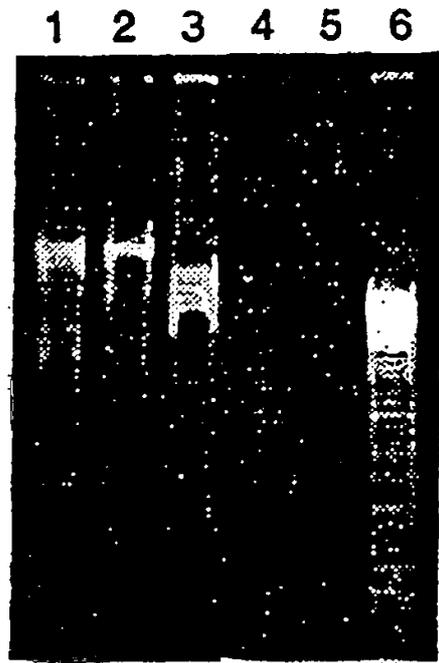
20. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde el dsARN es complementario al elemento de transcripción de ARN primario o procesado del gen objetivo.
21. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde la célula es una célula humana.
- 5 22. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde al menos dos dsARNs diferentes entre sí se introducen en la célula, y una hebra de cada dsARN es complementaria, al menos por secciones, respectivamente a uno de al menos dos genes objetivo diferentes.
23. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde uno de los genes objetivo es el gen de PKR.
- 10 24. Medicamento con al menos un oligorribonucleótido de estructura de hebra doble (dsARN), que presenta 15 a 9 pares de bases, para la inhibición de la expresión de un gen objetivo predeterminado en células de mamíferos, donde una hebra de dsARN presenta una zona I complementaria al gen objetivo al menos por secciones, que presenta a lo sumo 49 pares de nucleótidos sucesivos, y se forma una zona II complementaria dentro de la estructura de hebra doble a partir de dos hebras simples de ARN separadas, en cuyo caso la cohesión causada por los pares de nucleótidos de la zona II complementaria se incrementa por otro enlace químico y el enlace químico se produce en un extremo de la zona II complementaria.
- 15 25. Medicamento según la reivindicación 24, donde el dsARN se presenta empaquetado en estructuras micelares, preferentemente en liposomas.
26. Medicamento según una de las reivindicaciones 24 o 25, donde el gen objetivo puede expresarse en células eucariotas.
- 20 27. Medicamento según una de las reivindicaciones 24 a 26, donde el gen objetivo se selecciona a partir de: oncogén, gen de citoquina, gen de proteína Id, gen de desarrollo, gen prion.
28. Medicamento según una de las reivindicaciones 24 a 27, donde el gen objetivo puede expresarse en organismos patógenos, preferentemente en plasmodios.
- 25 29. Medicamento según una de las reivindicaciones 24 a 28, donde el gen objetivo es componente de un virus o viroide.
30. Medicamento según la reivindicación 29, donde el virus es un virus o viroide patógeno humano.
31. Medicamento según la reivindicación 29, donde el virus o viroide es un virus o viroide patógeno animal.
32. Medicamento según una de las reivindicaciones 24 a 31, donde los extremos del dsARN están modificados para contrarrestar una degradación en la célula o una disociación en las hebras simples
- 30 33. Medicamento según una de las reivindicaciones 24 a 32, donde la cohesión de la zona II complementaria causada por los pares de nucleótidos complementarios se incrementa mediante al menos otro enlace químico
34. Medicamento según una de las reivindicaciones 24 a 33, donde el enlace químico se forma mediante un enlace covalente o iónico, un enlace por puentes de hidrógeno, interacciones hidrófugas, preferentemente interacciones de van-der-Waals, o interacciones de apilado, o mediante coordinación de iones metálicos.
- 35 35. Medicamento según una de las reivindicaciones 24 a 34, donde el enlace químico se forma por medio de uno o varios grupos de enlace, y los grupos de enlace son preferentemente cadenas de poli-(oxifosfinicooxi-1,3-propanodiol) y/o polietilenglicol.
36. Medicamento según una de las reivindicaciones 24 a 35, donde el enlace químico se forma mediante análogos de purina utilizados en lugar de purinas en las zonas II complementarias
- 40 37. Medicamento según una de las reivindicaciones 24 a 36, donde el enlace químico se forma mediante unidades azabenceno insertadas en las zonas II complementarias
38. Medicamento según una o varias de las reivindicaciones 24 a 37, donde el enlace químico se forma mediante análogos de nucleótidos ramificados utilizados en lugar de nucleótidos en las zonas II complementarias.
- 45 39. Medicamento según una de las reivindicaciones 24 a 38, donde para la obtención del enlace químico se utiliza 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.
40. Medicamento según una de las reivindicaciones 24 a 39, donde el enlace químico se forma mediante grupos tiofosforilo previstos en los extremos de la zona de hebra doble.

41. Medicamento según una de las reivindicaciones 24 a 40, donde al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos del dsARN en la zona II complementaria está substituido por un grupo químico, preferentemente un grupo 2'-amino, o 2'-metilo.
- 5 42. Medicamento según una de las reivindicaciones 24 a 41, donde al menos un nucleótido en al menos una hebra de la zona II complementaria es un "locked nucleotide" con un anillo sacárico modificado químicamente, preferentemente por medio de un puente 2'-O, 4'-C-metileno.
43. Medicamento según una de las reivindicaciones 24 a 42, donde el dsARN se enlaza a, se asocia con o se envuelve por al menos una proteína envolvente viral procedente de un virus, derivada del mismo, o preparada sintéticamente.
- 10 44. Medicamento según una de las reivindicaciones 24 a 43, donde el dsARN es complementario al elemento de transcripción de ARN primario o procesado del gen objetivo.
45. Medicamento según una de las reivindicaciones 24 a 44, donde la célula es una célula humana.
46. Medicamento según una de las reivindicaciones 24 a 45, donde al menos dos dsARN diferentes entre sí están contenidos allí, y una hebra de cada dsARN es complementaria, al menos por secciones, respectivamente a uno de al menos dos genes objetivo diferentes.
- 15 47. Medicamento según la reivindicación 46, donde uno de los genes objetivo es el gen de PKR.
48. Empleo de un oligorribonucleótido que presenta 15 a 49 pares de bases con estructura de hebra doble (dsARN) para la obtención de un medicamento, donde una hebra del dsARN presenta 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 se forma una zona II complementaria dentro de la estructura de hebra doble a partir de dos hebras simples de ARN separadas, en cuyo caso la cohesión, causada por los pares de nucleótidos, de la zona complementaria II se incrementa gracias a otro enlace químico y el enlace químico se produce en un extremo de la zona complementaria II.
- 20 49. Empleo según la reivindicación 48, donde el dsARN se presenta empaquetado en estructuras micelares, preferentemente en liposomas.
- 25 50. Empleo según una de las reivindicaciones 48 o 49, donde el gen objetivo puede expresarse en células eucariotas.
51. Empleo según una de las reivindicaciones 48 a 50, donde el gen objetivo se selecciona a partir de: oncogén, gen de citoquina, gen de proteína Id, gen de desarrollo, gen prion.
52. Empleo según una de las reivindicaciones 48 a 51, donde el gen objetivo puede expresarse en organismos patógenos, preferentemente en plasmodios.
- 30 53. Empleo según una de las reivindicaciones 48 a 52, donde el gen objetivo es componente de un virus o viroide.
54. Empleo según la reivindicación 53, donde el virus es un virus o viroide patógeno humano.
55. Empleo según la reivindicación 53, donde el virus o viroide es un virus o viroide patógeno animal.
56. Empleo según una de las reivindicaciones 48 a 55, donde los extremos del dsARN se modifican para contrarrestar una degradación en la célula o una disociación en las hebras simples.
- 35 57. Empleo según una de las reivindicaciones 48 a 56, donde la cohesión de la zona II complementaria, causada por los pares de nucleótidos complementarios, se incrementa mediante al menos otro enlace químico adicional.
58. Empleo según una de las reivindicaciones 48 a 57, donde el enlace químico se forma mediante un enlace covalente o iónico, un enlace por puentes de hidrógeno, interacciones hidrófugas, preferentemente interacciones de van-der-Waals, o interacciones de apilado, o mediante coordinación de iones metálicos.
- 40 59. Empleo según una de las reivindicaciones 48 a 58, donde el enlace químico se forma por medio de uno o varios grupos de enlace, y los grupos de enlace son preferentemente cadenas de poli-(oxifosfinicooxi-1,3-propanodiol) y/o polietilenglicol.
60. Empleo según una de las reivindicaciones 48 a 59, donde el enlace químico se forma mediante análogos de purina utilizados en lugar de purinas en las zonas II complementarias.
- 45 61. Empleo según una de las reivindicaciones 48 a 60, donde el enlace químico se forma mediante unidades azabenceno insertadas en las zonas II complementarias
62. Empleo según una de las reivindicaciones 48 a 61, donde el enlace químico mediante análogos de nucleótidos ramificados, utilizados en lugar de nucleótidos en las zonas II complementarias.

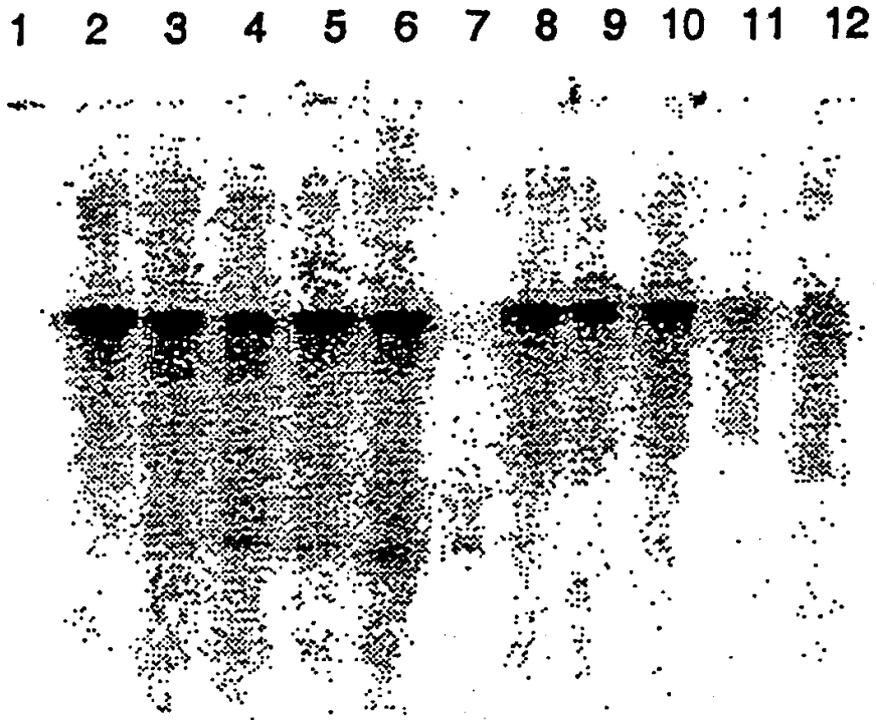
63. Empleo según una de las reivindicaciones 48 a 62, donde para la obtención del enlace químico se utiliza al menos uno de los siguientes grupos: azul de metileno; grupos bifuncionales, preferentemente bis-(2-cloroetil)-amina; N-acetil-N'-(p-glioxil-benzoil)-cistamina; 4-tiouracilo; psoraleno.
- 5 64. Empleo según una de las reivindicaciones 48 a 63, donde el enlace químico se forma mediante grupos tiofosforilo aplicados en los extremos de la zona de hebra doble.
65. Empleo según una de las reivindicaciones 48 a 64, donde al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos del dsARN en la zona II complementaria se reemplaza por un grupo químico, preferentemente un grupo 2'-amino, o 2'-metilo.
- 10 66. Empleo según una de las reivindicaciones 48 a 65, donde al menos un nucleótido en al menos una hebra de la zona II complementaria es un "locked nucleotide" con un anillo sacárico modificado químicamente, preferentemente por medio de un puente 2'-O, 4'-C-metileno.
67. Empleo según una de las reivindicaciones 48 a 66, donde el dsARN se enlaza a, se asocia con, o se envuelve por, al menos una proteína envolvente viral procedente de un virus, derivada del mismo, o preparada sintéticamente
- 15 68. Empleo según una de las reivindicaciones 48 a 67, donde el dsARN es complementario al elemento de transcripción de ARN primario o procesado del gen objetivo
69. Empleo según una de las reivindicaciones 48 a 68, donde la célula es una célula humana.
70. Empleo según una de las reivindicaciones 48 a 69, donde se usan al menos dos dsARN diferentes entre sí, y una hebra de cada dsARN es complementaria, al menos por secciones, respectivamente a uno de al menos dos genes objetivo diferentes
- 20 71. Empleo según la reivindicación 70, donde uno de los genes objetivo es el gen de PKR.
72. Empleo según una de las reivindicaciones 48 a 71, donde el medicamento es inyectable en la vía sanguínea o en el intersticio del organismo que se va someter a terapia.



**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**

Fig. 4 a

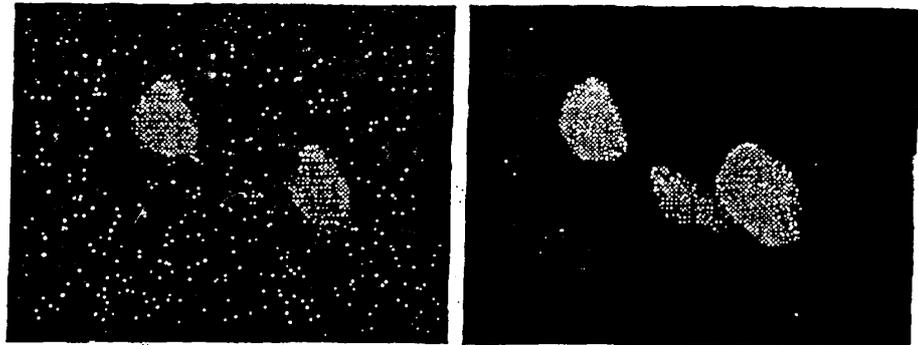


Fig. 4 b

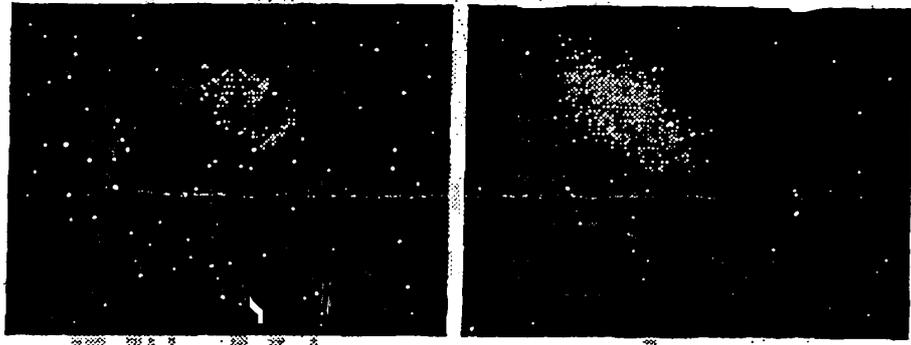


Fig. 4 c

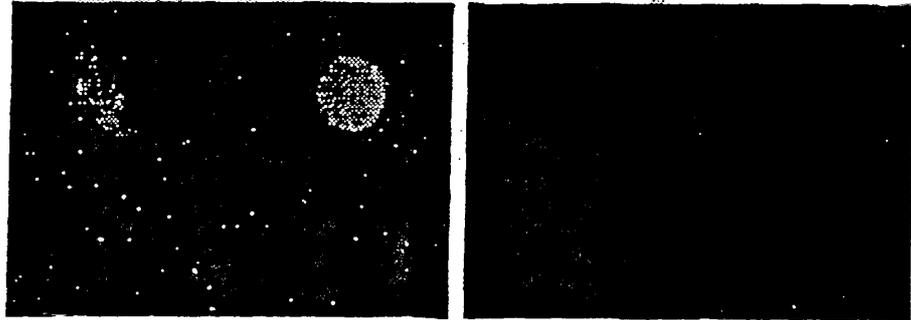


Fig. 4 d

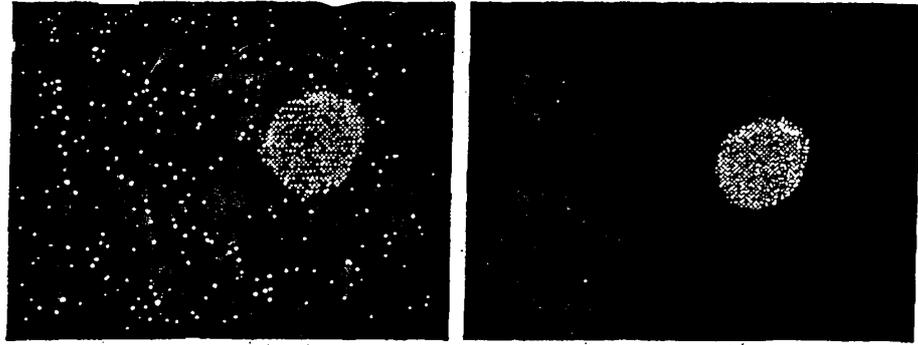


Fig. 4 e

