



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 670**

51 Int. Cl.:
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05813245 .7**
96 Fecha de presentación : **26.09.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1797185**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.06.2007**

54 Título: **Orientación a intermedios de replicación de hebra no codificante de virus monocatenarios por ARNi.**

30 Prioridad: **24.09.2004 US 613065 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.07.2011

73 Titular/es: **ALNYLAM PHARMACEUTICALS, Inc**
300 Third Street, 3rd Floor
Cambridge, Massachusetts 02142, US

72 Inventor/es: **McCallus, Daniel, E.;**
Gu, Baohua y
Pachuk, Catherine, J.

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 362 670 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

Orientación a intermedios de replicación de hebra no codificante de virus monocatenarios por ARNi

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La invención se refiere a procedimientos de producción de una molécula efectora bicatenaria adecuada para inhibir, suprimir o regular por disminución la replicación vírica mediante silenciamiento génico mediado por ARN bicatenario (ARNi), en los que la molécula efectora bicatenaria se orienta preferiblemente a intermedios de replicación de hebra no codificante de virus monocatenarios.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Ha habido un interés considerable en el desarrollo de composiciones basadas en ácido nucleico para aplicaciones antivíricas, incluyendo composiciones anticodificantes, composiciones basadas en ARN bicatenario, oligonucleótidos formadores de triple hélice, ribozimas, etc. Su modo de acción específico de secuencia ofrece la promesa de terapias que tienen un alto nivel de seguridad y eficacia. Los procedimientos aceptados actualmente de regulación por disminución de ARN víricos de virus de hebra codificante implican en gran medida orientarse directamente a los ARN de hebra codificante. Por ejemplo, se cree que los oligonucleótidos anticodificantes funcionan hibridando con un ARNm, interfiriendo así con la traducción del ARNm a proteína. Los oligonucleótidos anticodificantes se diseñan por lo tanto habitualmente para ser complementarios de un ARNm diana. La patente de EE.UU. nº 6.001.990, por ejemplo, "Antisense inhibition of hepatitis C virus", describe oligonucleótidos sustancialmente complementarios de secuencias de ARN genómico de HCV, concretamente, secuencias que son complementarias de y se orientan a la hebra codificante del genoma de HCV. De forma similar, se ha pensado que el ARNi está conectado mecanísticamente con la traducción, de modo que los ARN que no se traducen son refractarios a la inhibición de ARNip, mientras que aquellos que se traducen activamente son dianas eficaces. Véase Wang y Carmichael, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 432-452 (2004). Véase también, por ejemplo, Yokota y col., *EMBO Rep.* 4: 602-08 (2003), que describen la orientación de ARNip a 5'UTR de ARN genómico de HCV. Krönke y col., *J. Virol.* 78 (7): 3436-46 (2004), evaluaron ARNip dirigidos contra ARN genómico de HCV que incluye diversas regiones de la secuencia de codificación así como la 5'-NTR, y notificaron que grandes secciones de las NTR son resistentes a ARNi. Sin embargo, especularon que una secuencia dirigida a la 5'NTR puede haberse orientado realmente al extremo 3' de la hebra no codificante, contribuyendo posiblemente a su actividad antivírica. Las ribozimas parecen ser una excepción a la orientación a HCV de hebra codificante, describiendo la patente de EE.UU. nº 6.107.028 ribozimas que se orientan a las hebras codificante y/o no codificante del HCV.

[0003] Un gran número de virus de relevancia clínica producen moléculas de ARN durante la replicación que no son moléculas de ARN mensajero. Por ejemplo, los virus de ARN de hebra codificante tales como de la hepatitis C (HCV) generan un ARN denominado de hebra no codificante que es complementario de y de polaridad opuesta (extremos 5' frente a 3') a los diversos ARNm preparados por el virus. La variabilidad de secuencia extrema y la alta tasa de mutación de los virus de ARN tales como el HCV proporcionan un impulso a la orientación a las regiones conservadas diana del ARN genómico vírico. Sin embargo, la estructura secundaria compleja de las regiones conservadas del HCV, así como la presencia de proteínas celulares y víricas que se unen a estas regiones conservadas en el entorno intracelular, crean incertidumbre en cuanto a la aplicabilidad de enfoques antivíricos basados en ácido nucleico para estas regiones diana preferidas por lo demás. Smith y col. cartografiaron regiones conservadas de ambas hebras codificante y no codificante de HCV para determinar la estructura secundaria y la accesibilidad a la hibridación de construcciones anticodificantes. Véase *J. Virol.* 76 (19): 9563-74 (2002), "Secondary Structure and Hybridization Accessibility of Hepatitis C Virus 3'-Terminal Sequences", y también Smith y col., *J. Viral Herat.*, 11 (2): 115-23 (2004).

[0004] De forma similar, el ARN interferente (ARNi) se ha usado para orientarse a la destrucción selectiva de moléculas de ARNm producidas por virus en estrategias con el objetivo de crear agentes antivíricos eficaces. Como los anticodificantes, los ARNi mediados por ARNbc se basan en interacciones de ácido nucleico específicas de secuencia, pero la implicación del complejo silenciador inducido por ARN (RISC) multiproteico plantea la duda de si la accesibilidad a anticodificante sola se correlaciona con la accesibilidad a diana para la degradación de ARNi. Además, puesto que las estrategias de ARNi emplean moléculas de ARN bicatenarias (ARNbc), que contienen secuencias tanto idénticas como complementarias de una diana vírica, no se ha demostrado un procedimiento de orientación de, por ejemplo, un ARN de hebra no codificante preferiblemente a su ARNm vírico complementario. A su vez, no se ha demostrado anteriormente la potencia de un agente antivírico que funcione orientándose selectivamente, por ejemplo, a la hebra no codificante (de un virus de ARN de hebra codificante) en lugar de a su

ARNm o productos proteicos. La presente invención proporciona un procedimiento para producir ARNi que se orienta preferiblemente a la destrucción de, por ejemplo, la hebra no codificante de un virus de ARN de hebra codificante, y describe también composiciones novedosas basadas en este procedimiento para una inhibición potente de la replicación de virus de ARN tales como HCV.

5

SUMARIO DE LA INVENCION

[0005] La aplicación aceptada actualmente de ARN interferente (ARNi) mediado por ARN bicatenario (ARNbc) se ha limitado en gran medida a moléculas diana clasificadas como ARN mensajero (ARNm). Se ha pensado que el ARNi está conectado mecanísticamente con la traducción, de modo que los ARN que no se traducen son refractarios a la inhibición por ARNip, mientras que aquellos que se traducen activamente son dianas más eficaces. Véase Wang y Carmichael, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68: 432-452 (2004). Aunque una serie de virus (particularmente virus de ARN conocidos como virus de hebra codificante) producen también moléculas de ARN que no son ARNm, las estrategias para inhibir las funciones víricas usando ARNbc se han orientado al ARNm (o al ARN genómico análogo) producido por el virus, incluyendo secuencias de codificación así como regiones no traducidas. Véanse, por ejemplo, Yokota y col., EMBO Rep. 4:602-08 (2003); Kapadia y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(4): 2014-18 (2003); Wilson y col., J. Virol. 79 (11): 7050-58 (2005); Krönke y col., J. Virol. 78(7): 3436-46 (2004).

[0006] En contraposición, los procedimientos de la invención se orientan a ARN de hebra no codificante de virus de hebra codificante, específicamente HCV, y más específicamente a la región del intermedio de replicación de la hebra no codificante correspondiente a la región 3' no traducida conservada de HCV. Los solicitantes han descubierto que, sorprendentemente, puede conseguirse una actividad antivírica superior orientándose al intermedio de replicación de hebra "no codificante" (hebra de ARN antigenómica) de estos virus, concretamente, orientándose a la hebra no codificante de virus de hebra codificante. No solo dichas moléculas de ARNbc están diseñadas para orientarse preferiblemente a la hebra no codificante altamente activa, sino que utilizar la hebra no codificante como punto de partida para el diseño de ARNbc da como resultado una mayor proporción de moléculas activas. Este enfoque tiene la ventaja distintiva de destruir o regular por disminución una población de ARN que es menos abundante que el correspondiente mensaje de hebra principal. Esto significa que se requerirá una cantidad menor de ARN bicatenario efector para conseguir el objetivo deseado de eliminar el virus. Debido a que estas hebras "no codificantes" son un intermedio necesario para la replicación vírica, la destrucción o regulación por disminución de estas hebras conducirá a una reducción o eliminación de la replicación vírica. La utilización de la hebra "no codificante" como diana para el ataque de ARNi proporciona también un intervalo extendido de dianas antivíricas potenciales y por tanto un intervalo extendido de agentes potenciales activos contra un virus particular. Considerando la alta tasa de mutación de los virus de ARN tales como HCV, una terapia antivírica eficaz necesita la utilización de un régimen multifármaco. En un aspecto, por lo tanto, pueden usarse uno o más de dichos ARNbc orientados a hebra no codificante, solos o en combinación con uno o más ARNbc que preferiblemente se orientan a la hebra codificante y/o con otros agentes antivíricos.

[0007] Los virus de hebra codificante tales como, pero sin limitación, picornavirus, calcivirus, astrovirus, togavirus, flavivirus, coronavirus y arterivirus, son virus de ARN monocatenarios cuyo genoma de ARN está en la polaridad codificante, lo que significa que su genoma de ARN está en la misma polaridad que los ARN mensajeros que codifican sus proteínas víricas. Estos virus de "hebra codificante" se replican todos mediante un intermedio de hebra no codificante que es habitualmente mucho menos abundante en comparación con los niveles de hebras codificantes en las células infectadas. Por ejemplo, en células infectadas por hepatitis C (flavivirus), la hebra no codificante está presente aproximadamente a 1/30 del nivel de moléculas de ARN de hebra codificante. El menor número de hebras no codificantes combinado con el hecho de que la hebra no codificante es necesaria para la replicación vírica, hace ideal la orientación de ARNi a la hebra no codificante como estrategia terapéutica. En algunas aplicaciones, las estrategias antivíricas eficaces implicarán el uso simultáneo de múltiples agentes de ARNi, incluyendo una, dos, tres o más moléculas de ARNbc de orientación a al hebra no codificante, solas o en combinación con otros agentes antivíricos incluyendo, por ejemplo, una, dos, tres o más moléculas de ARNbc orientadas a la hebra codificante.

[0008] Las moléculas de ARNbc producidas según la presente invención pueden ser útiles en un procedimiento de tratamiento de una infección de una célula de vertebrado por un virus de ARN monocatenario, que comprende administrar a dicha célula de vertebrado una molécula efectora de ARN que comprende una secuencia efectora de al menos 19 nucleótidos contiguos de un complemento inverso de un intermedio de replicación de hebra no codificante de dicho virus monocatenario.

[0009] Es un aspecto adicional de la invención proporcionar un procedimiento *in vitro* de modulación de la

replicación de un virus de ARN monocatenario en una célula de vertebrado diana, que comprende producir una molécula efectora de ARNbc o un vector según el procedimiento de la reivindicación 1, y administrar dicha molécula efectora de ARN bicatenaria o vector a la célula.

5 **[0010]** Pueden proporcionarse múltiples moléculas efectoras de ARN bicatenarias antivíricas simultáneamente a una célula de vertebrado, incluyendo una, dos, tres o más de dichas moléculas efectoras de ARN bicatenarias que comprenden cada una una secuencia efectora de al menos 19 nucleótidos contiguos que es un complemento inverso de un intermedio de replicación de hebra no codificante de un virus de ARN monocatenario y que preferiblemente se asocia con el RISC respecto a su complemento efector, solas o en combinación con uno o más
10 agentes antivíricos distintos incluyendo, por ejemplo, una, dos, tres o más moléculas efectoras de ARN bicatenarias que comprenden cada una una secuencia efectora de al menos 19 nucleótidos contiguos, que es un complemento inverso de la hebra de ARN genómico de un virus de ARN monocatenario, y un complemento efector que es el complemento inverso de la secuencia efectora, y en las que la secuencia efectora se asocia preferiblemente con el RISC respecto al complemento efector.

15

[0011] Otro procedimiento descrito en la presente memoria es proporcionar a una célula de vertebrado una o más de dichas moléculas efectoras de ARN bicatenarias que comprenden cada una una secuencia efectora de al menos 19 nucleótidos contiguos que es el complemento inverso de un intermedio de replicación de hebra no codificante de un virus de ARN monocatenario. Preferiblemente, el complemento inverso tiene una A o U en la posición 1 del
20 extremo 5' de dicho complemento inverso y la molécula efectora de ARN bicatenaria tiene una menor estabilidad térmica (Tm) en el extremo que comprende el extremo 5' de la secuencia efectora en comparación con el extremo que comprende el extremo 3' de la secuencia efectora.

[0012] Otro procedimiento descrito en la presente memoria es proporcionar a una célula de vertebrado una o más, preferiblemente dos, tres o más, de dichas moléculas efectoras de ARN bicatenarias que comprende cada una una secuencia efectora de al menos 19 nucleótidos contiguos que es un complemento inverso de un intermedio de replicación de hebra no codificante (ARN antígenómico) de un virus de ARN monocatenario, concretamente, la hebra no codificante antígenómica de un virus de ARN de hebra codificante, y en el que la molécula efectora de ARN bicatenaria se orienta directamente a dicha hebra no codificante antígenómica. En un aspecto preferido, dichas
30 moléculas efectoras de ARN bicatenarias se proporcionan proporcionando a la célula de vertebrado una construcción de expresión que codifica las moléculas efectoras de ARN bicatenarias.

[0013] Otros objetivos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes para los especialistas en la materia tras la referencia a la descripción detallada que sigue a continuación.

35

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

[0014]

La SEQ ID NO:1 representa los nucleótidos 9382-9402 de 3' NTR de HCV.
La SEQ ID NO:2 representa los nucleótidos 9502-9522 de 3' NTR de HCV.
40 La SEQ ID NO:3 representa los nucleótidos 9512-9532 de 3' NTR de HCV.
La SEQ ID NO:4 representa los nucleótidos 9518-9538 de 3' NTR de HCV.
La SEQ ID NO:5 representa los nucleótidos 9525-9545 de 3' NTR de HCV.
La SEQ ID NO:6 representa los nucleótidos 9526-9546 de 3' NTR de HCV.
La SEQ ID NO:7 representa los nucleótidos 9552-9572 de 3' NTR de HCV.
45 La SEQ ID NO:8 representa los nucleótidos 9577-9597 de 3' NTR de HCV.
La SEQ ID NO:9 representa los nucleótidos 9579-9599 de 3' NTR de HCV.
La SEQ ID NO:10 representa los nucleótidos 9583-9603 de 3' NTR de HCV.
La SEQ ID NO:11 representa los nucleótidos 9509-9529 de 3' NTR de HCV.
La SEQ ID NO:12 representa los nucleótidos 9520-9540 de 3' NTR de HCV.
50 La SEQ ID NO:13 representa los nucleótidos 9534-9554 de 3' NTR de HCV.
La SEQ ID NO:14 representa los nucleótidos 9560-9580 de 3' NTR de HCV.
La SEQ ID NO:15 representa los nucleótidos 9581-9601 de 3' NTR de HCV.
La SEQ ID NO:16 representa los nucleótidos 9506-9526 de 3' NTR de HCV.
La SEQ ID NO:17 representa los nucleótidos 9514-9534 de 3' NTR de HCV.
55 La SEQ ID NO:18 representa los nucleótidos 9520-9540 de 3' NTR de HCV.
La SEQ ID NO:19 representa los nucleótidos 9537-9557 de 3' NTR de HCV.
La SEQ ID NO:20 representa los nucleótidos 9544-9563 de 3' NTR de HCV.
La SEQ ID NO:21 representa los nucleótidos 9554-9574 de 3' NTR de HCV.
La SEQ ID NO:22 representa los nucleótidos 9567-9587 de 3' NTR de HCV.

La SEQ ID NO:23 representa los nucleótidos 9584-9604 de 3' NTR de HCV.
 La SEQ ID NO:24 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 1 de la hebra codificante).
 La SEQ ID NO:25 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 1 de la hebra no codificante).
 La SEQ ID NO:26 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 1 de la hebra codificante).
 5 La SEQ ID NO:27 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 1 de la hebra no codificante).
 La SEQ ID NO:28 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 1 de la hebra codificante).
 La SEQ ID NO:29 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 1 de la hebra no codificante).
 La SEQ ID NO:30 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 1 de la hebra codificante).
 La SEQ ID NO:31 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 1 de la hebra no codificante).
 10 La SEQ ID NO:32 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 1 de la hebra codificante).
 La SEQ ID NO:33 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 1 de la hebra no codificante).
 La SEQ ID NO:34 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 1 de la hebra codificante).
 La SEQ ID NO:35 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 1 de la hebra no codificante).
 La SEQ ID NO:36 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 1 de la hebra codificante).
 15 La SEQ ID NO:37 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 1 de la hebra no codificante).
 La SEQ ID NO:38 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 2 de la hebra codificante).
 La SEQ ID NO:39 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 2 de la hebra no codificante).
 La SEQ ID NO:40 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 2 de la hebra codificante).
 La SEQ ID NO:41 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 2 de la hebra no codificante).
 20 La SEQ ID NO:42 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 2 de la hebra codificante).
 La SEQ ID NO:43 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 2 de la hebra no codificante).
 La SEQ ID NO:44 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 2 de la hebra codificante).
 La SEQ ID NO:45 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 5 de la hebra codificante).
 La SEQ ID NO:46 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 5 de la hebra no codificante).
 25 La SEQ ID NO:47 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 5 de la hebra codificante).
 La SEQ ID NO:48 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 5 de la hebra no codificante).
 La SEQ ID NO:49 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 5 de la hebra codificante).
 La SEQ ID NO:50 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 5 de la hebra no codificante).
 La SEQ ID NO:51 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 5 de la hebra codificante).
 30 La SEQ ID NO:52 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 5 de la hebra no codificante).
 La SEQ ID NO:53 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 5 de la hebra codificante).
 La SEQ ID NO:54 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 5 de la hebra no codificante).
 La SEQ ID NO:55 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 5 de la hebra codificante).
 La SEQ ID NO:56 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 5 de la hebra no codificante).
 35 La SEQ ID NO:57 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 5 de la hebra no codificante).
 La SEQ ID NO:58 representa un ARNip de 5' UTR de HCV (región 5 de la hebra no codificante).
 La SEQ ID NO:59 representa una secuencia de región conservada de 3' UTR de HCV.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

40

[0015]

La **Fig. 1** es una transferencia Western que muestra los niveles de proteína NS5A de HCV a (izquierda a derecha) 0, 9 y 20 pmol de los ARNip identificados.

45

La **Fig. 2** es una transferencia Western que muestra los niveles de proteína NS5A de HCV a (izquierda a derecha) 0, 9 y 20 pmol de los ARNip identificados, y a 0, 3 y 9 pmol de los ARNip de control positivos del núcleo.

50

La **Fig. 3** es un diagrama de orientación específica de hebra de ARNbc. Se presenta un vista esquemática de una célula infectada con un virus de ARN de hebra codificante, tal como virus de la hepatitis C (HCV). El virus produce copias de hebra no codificante de su genoma durante el proceso de replicación, pero éstas están presentes en cantidades significativamente menores que la hebra codificante. Se muestra con detalle en el centro del diagrama la secuencia de un segmento corto de HCV (partiendo del nucleótido 9502 del nº de acceso a Genbank AJ238799). Se representan tanto la hebra genómica (codificante) del virus como la hebra del intermedio de replicación (no codificante) del virus, alineadas para indicar su complementariedad de bases. Se seleccionó una región de 21 pb (subrayada) para el diseño de la molécula de ARNbc indicada. Se muestran tanto la hebra "efectora" (encuadrada, marcada con "a") como su complemento, marcado con "b". Solo la hebra "a" se incorporará al complejo silenciador de ARNbc (RISC) debido a que su extremo 5' es menos estable termodinámicamente que el extremo 5' de la hebra "b", debido a la mayor proporción de restos A y T en las 5 bases terminales. Puesto que solo la hebra "a" está favorecida para la incorporación al complejo RISC, y puesto que es complementaria solo del ARN de hebra no codificante vírica, esta molécula

55

de ARNbc se orientará a la hebra no codificante vírica, no a la hebra codificante, para degradación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 **[0016]** Cuando se da una cantidad, concentración u otro valor o parámetro como un intervalo, intervalo preferido o una lista de valores preferibles superiores y valores preferibles inferiores, esto ha de entenderse que da a conocer específicamente todos los intervalos formados a partir de cualquier par de cualquier límite de intervalo o valor preferido superior y cualquier límite de intervalo o valor preferido inferior, independientemente de si los intervalos se dan a conocer separadamente. Cuando se enumera en la presente memoria un intervalo de valores numéricos, a
10 menos que se indique otra cosa, se pretende que el intervalo incluya los extremos del mismo, y todos los enteros y fracciones dentro del intervalo. No se pretende que el alcance de la invención esté limitado a los valores específicos enumerados cuando se define un intervalo.

[0017] El ARN interferente (ARNi) es el proceso de silenciamiento génico postranscripcional o silenciamiento
15 génico transcripcional específico de secuencia en animales y plantas iniciado por ARN bicatenario (ARNbc), que es homólogo en secuencia al gen silenciado. Puesto que el ARN interferente actúa de manera específica de secuencia, la molécula de ARNi usada como fármaco debe ser específica de su diana. Es conocido en la técnica que los genomas víricos, especialmente los genomas víricos de ARN, son variables para adaptar la resistencia a cambios en el entorno. Por tanto, para reducir la replicación del genoma vírico usando ARNi, existe la necesidad de identificar
20 regiones conservadas y únicas en el genoma vírico. Es también importante asegurar que las secuencias víricas conservadas orientadas a silenciamiento según la invención sean sustancialmente no homólogas de ninguna secuencia polinucleotídica hospedadora de origen natural de funcionamiento normal, de modo que la molécula de ARNbc no afecte adversamente la función de ninguna secuencia polinucleotídica hospedadora esencial de origen natural cuando se use en los procedimientos de esta invención. Dichas secuencias polinucleotídicas funcionales de
25 origen natural incluyen secuencias que codifican proteínas deseadas, así como secuencias que no son codificantes sino secuencias reguladoras esenciales en un organismo hospedador sano. Por tanto, las moléculas efectoras de ARN preferidas útiles en esta invención deben ser suficientemente distintas en secuencia de cualquier secuencia polinucleotídica hospedadora cuya función se pretende no alterar después de efectuar cualquiera de los procedimientos de esta invención. Pueden usarse algoritmos informáticos para definir la falta esencial de homología
30 entre la secuencia polinucleotídica de la molécula de ARN y secuencias normales esenciales del hospedador.

[0018] En el contexto de esta divulgación, se utilizarán una serie de términos. Se entiende por "al menos 19 nucleótidos contiguos" que una secuencia nucleotídica puede empezar en cualquier nucleótido de una de las secuencias dadas a conocer, a condición de que el sitio de inicio sea capaz de producir un polinucleótido de al
35 menos 19 pares de bases. Por ejemplo, una secuencia nucleotídica de al menos 19 bases contiguas puede comprender del nucleótido 1 al nucleótido 19, del nucleótido 2 al nucleótido 20, del nucleótido 3 al nucleótido 21 y en adelante, produciendo un polinucleótido de 19 unidades. Por tanto, un polinucleótido de 20 unidades puede comprender del nucleótido 1 al nucleótido 20, del nucleótido 2 al nucleótido 21, del nucleótido 3 al nucleótido 22 y en adelante. Se prevén secuencias similares de más de 20 nucleótidos contiguos.
40

[0019] Se entiende por "ARNbc" o "molécula de ARNbc" o molécula efectora de ARNbc" o "molécula efectora de ARN bicatenario" una molécula de ácido ribonucleico al menos parcialmente bicatenaria que contiene una región de al menos aproximadamente 19 nucleótidos o más que están en conformación bicatenaria. La molécula efectora de
45 ARN bicatenaria puede ser un ARN bicatenario de cadena doble formado a partir de dos hebras de ADN separadas o puede ser una hebra de ARN individual con regiones de autocomplementariedad capaces de asumir una conformación de horquilla al menos parcialmente bicatenaria (concretamente, un ARNbc de horquilla o ARNbc de tallo-bucle). En diversas realizaciones, el ARNbc consiste enteramente en ribonucleótidos o consiste en una mezcla de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos, tales como los híbridos de ARN/ADN dados a conocer, por ejemplo, en el documento WO 00/63364, presentado el 19 de abril de 2000, o el documento U.S.S.N. 60/130.377, presentado el
50 21 de abril de 1999. El ARNbc puede ser una molécula individual con regiones de autocomplementariedad, de tal modo que los nucleótidos en un segmento de la molécula se apareen por bases con nucleótidos de otro segmento de la molécula. En un aspecto, las regiones de autocomplementariedad se ligan por una región de al menos aproximadamente 3-4 nucleótidos, deseablemente de al menos aproximadamente 5, 6, 7, 9 a 15 nucleótidos o más, que carece de complementariedad con otra parte de la molécula y por tanto permanece monocatenaria
55 (concretamente, "la región de bucle"). Dicha molécula asumirá una estructura de tallo-bucle parcialmente bicatenaria, opcionalmente con extremos 5' y/o 3' cortos monocatenarios. En un aspecto, las regiones de autocomplementariedad del ARNbc de horquilla o de la región bicatenaria de un ARNbc de cadena doble comprenderán una secuencia efectora y un complemento efector (deseablemente ligadas por una región de bucle monocatenaria en un ARNbc de horquilla). La secuencia efectora o hebra efectora es aquella hebra de la región

bicatenaria o de cadena doble que se incorpora a o se asocia con el RISC. En la presente invención, la molécula efectora de ARN bicatenaria comprenderá una secuencia efectora de al menos 19 nucleótidos contiguos, preferiblemente de 19 a 29, 19 a 27, o 19 a 21 nucleótidos, que es un complemento inverso de un intermedio de replicación de hebra no codificante (ARN antígenómico) de un virus de ARN monocatenario, en particular, la hebra no codificante antígenómica de HCV, y en la que la molécula efectora de ARN bicatenario se orienta directamente a dicha hebra no codificante antígenómica. En un aspecto preferido, dichas moléculas efectoras de ARN bicatenario se proporcionan proporcionando a la célula de vertebrado una construcción de expresión que codifica las moléculas efectoras de ARN bicatenarias.

10 **[0020]** En diversas realizaciones, un ARNbc que consiste en una molécula individual consiste enteramente en ribonucleótidos o incluye una región de ribonucleótidos que es complementaria de una región de desoxirribonucleótidos. Como alternativa, el ARNbc puede incluir dos hebras diferentes que tienen una región de complementariedad entre sí. En diversas realizaciones, ambas hebras consisten enteramente en ribonucleótidos, una hebra consiste enteramente en ribonucleótidos y una hebra consiste enteramente en desoxirribonucleótidos, o
 15 una o ambas hebras contienen una mezcla de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. Deseablemente, las regiones de complementariedad son al menos un 70, 80, 90, 95, 98 o 100% complementarias. Deseablemente, la región del ARNbc que está presente en conformación bicatenaria incluye al menos 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 50, 75, 100, 200, 500, 1000, 2000 o 5000 nucleótidos o incluye todos los nucleótidos en un ARN vírico diana o ADNc diana representado en el ARNbc. En algunas realizaciones, el ARNbc no contiene ninguna región monocatenaria, tales como extremos monocatenarios, o el ARNbc es una horquilla que comprende regiones de autocomplementariedad que asumen una conformación de "tallo" bicatenario separada por una región de "bucle" monocatenaria. En otras realizaciones, el ARNbc tiene una o más regiones monocatenarias en diversas posiciones en la molécula de ARNbc y/o incluye superposiciones 3' y/o 5' de 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10 o más nucleótidos. Los híbridos de ARN/ADN deseables incluyen una hebra de ADN o una región que es una hebra o región anticodificante (por
 25 ejemplo, tiene al menos 70, 80, 90, 95, 98 o 100% de complementariedad con un ácido nucleico diana) y una hebra o región de ARN que es una hebra o región codificante (por ejemplo, tiene al menos un 70, 80, 90, 95, 98 o 100% de identidad con un ácido nucleico diana). En diversas realizaciones, el híbrido de ARN/ADN se prepara *in vitro* usando procedimientos sintéticos enzimáticos o químicos tales como los descritos en la presente memoria o aquellos descritos en el documento WO 00/63364, presentado el 19 de abril de 2000, o el documento U.S.S.N. 60/130.377, presentado el 21 de abril de 1999. En otras realizaciones, se compleja una hebra de ADN sintetizada *in vitro* con una hebra de ARN preparada *in vivo* o *in vitro* antes, después, o simultáneamente a la transformación de la hebra de ADN en la célula. En aún otras realizaciones, el ARNbc es un ácido nucleico circular individual que contiene una región codificante y una región anticodificante, o el ARNbc incluye un ácido nucleico circular y un segundo ácido nucleico circular o un ácido nucleico lineal (véase, por ejemplo, el documento WO 00/63364, presentado el 19 de
 30 abril de 2000, o el documento U.S.S.N. 60/130.377, presentado el 21 de abril de 1999). Los ácidos nucleicos circulares ejemplares incluyen estructuras de lazo en que el grupo 5'-fosforilo libre de un nucleótido se liga con el grupo 2'-hidroxilo de otro nucleótido en forma de bucle invertido.

[0021] En otras realizaciones, el ARNbc incluye uno o más nucleótidos modificados en que la posición 2' del
 40 azúcar contiene un halógeno (tal como un grupo flúor) o contiene un grupo alcoxilo (tal como un grupo metoxilo) que aumenta la semivida del ARNbc *in vitro* o *in vivo* en comparación con el correspondiente ARNbc, en que la correspondiente posición 2' contiene un hidrógeno o un grupo hidroxilo. En aún otras realizaciones, el ARNbc incluye uno o más ligamientos entre nucleótidos adyacentes distintos de un ligamiento fosfodiéster de origen natural. Los ejemplos de dichos ligamientos incluyen ligamientos de fosforamida, fosforotioato y fosforoditioato. El ARNbc puede
 45 ser también moléculas de ácido nucleico modificadas químicamente como se enseña en la patente de EE.UU. nº 6.673.661. En otras realizaciones, el ARNbc contiene una o dos hebras con caperuza como se da a conocer, por ejemplo, en el documento WO 00/63364, presentado el 19 de abril de 2000, o el documento U.S.S.N. 60/130.377, presentado el 21 de abril de 1999. En la presente invención, el ARNbc se orienta a la región del intermedio de replicación de hebra no codificante correspondiente a la región 3' no traducida conservada del HVC.

50 **[0022]** Adicionalmente, el ARNbc puede ser cualquiera de las moléculas de ARN al menos parcialmente bicatenarias dadas a conocer en el documento WO 00/63364, presentado el 19 de abril de 2000 (véanse, por ejemplo, las páginas 8-22), así como cualquiera de las moléculas de ARNbc descritas en la solicitud provisional de EE.UU. 60/399.998, presentada el 31 de julio de 2002, el documento PCT/US2003/024028, presentado el 31 de julio
 55 de 2003, la solicitud provisional de EE.UU. 60/419.532, presentada el 18 de octubre de 2002 y el documento PCT/US2003/033466, presentado el 20 de octubre de 2003, en la medida que éstas se orienten a la región establecida anteriormente. Cualquiera de los ARNbc puede expresarse *in vitro* o *in vivo* usando los procedimientos descritos en la presente memoria o procedimientos estándares, tales como los descritos en el documento WO 00/63364, presentado el 19 de abril de 2000 (véanse, por ejemplo, las páginas 16-22).

[0023] Las construcciones de "horquilla" de ARNbc que codifican un ARNbc de horquilla unimolecular son más deseables para algunas aplicaciones que las construcciones de codifican ARNbc de cadena doble (concretamente, ARNbc compuesto por una molécula de ARN con una región codificante y una molécula de ARN separada con una región anticodificante) debido a que el ARN monocatenario con secuencias repetidas invertidas forma más eficazmente una estructura de horquilla de ARNbc, particularmente cuando se transcribe una molécula de ARNbc a partir de una construcción de expresión que codifica el ARNbc, incluyendo cuando se suministra un ARNbc a una célula de vertebrado transfecando en la célula una construcción de expresión que codifica el ARNbc. Esta mayor eficacia es debida en parte a la aparición de interferencia transcripcional que surge en vectores que contienen promotores convergentes que generan ARNbc de cadena doble. La interferencia transcripcional da como resultado una síntesis incompleta de cada hebra de ARN, reduciendo así el número de hebras codificantes y anticodificantes completas que puede aparearse por bases entre sí y formar una cadena doble. La interferencia transcripcional puede superarse, si se desea, mediante el uso de (i) un sistema de dos vectores en el que un vector codifica el ARN codificante y el segundo vector codifica el ARN anticodificante, (ii) un vector bicistrónico en que las hebras individuales están codificadas por el mismo plásmido, pero mediante el uso de cistrones separados, o (iii) un vector promotor individual que codifica un ARNbc de horquilla, concretamente, un ARN en que las secuencias codificante y anticodificante están codificadas en la misma molécula de ARN. Los vectores que expresan horquilla tienen algunas ventajas respecto a los vectores de cadena doble. Por ejemplo, en vectores que codifica un ARN de cadena doble, las hebras de ARN tienen que encontrar y aparearse por bases con sus contrapartidas complementarias poco después de la transcripción. Si esta hibridación no sucede, las hebras de ARN individuales salen por difusión del molde de transcripción y se reduce la concentración local de hebras codificantes con respecto a las hebras anticodificantes. Este efecto es mayor para ARN que se transcribe intracelularmente en comparación con ARN transcrito *in vitro*, debido a los menores niveles de molde por célula. Además, el ARN se pliega según las reglas del vecino más cercano, dando como resultado moléculas de ARN que se pliegan cotranscripcionalmente (concretamente, se pliegan según se transcriben). Por lo tanto, cierto porcentaje de transcritos de ARN completados no está disponible para apareamiento de bases con un segundo ARN complementario debido al apareamiento de bases intramolecular en estas moléculas. El porcentaje de dichas moléculas no disponibles aumenta con el tiempo después de su transcripción. Estas moléculas no pueden formar nunca una cadena doble debido a que ya están en una estructura plegada establemente. En un ARN de horquilla, una secuencia de ARN está siempre en estrecha proximidad física con su ARN complementario. Puesto que la estructura del ARN no es estática, a medida que se despliega transitoriamente el ARN, su secuencia complementaria está inmediatamente disponible y puede participar en el apareamiento de bases debido a que está muy cerca. Una vez formada, se predice que la estructura de horquilla es más estable que la estructura no de horquilla original. Son especialmente deseables, por ejemplo, construcciones de horquilla "forzadas", horquillas parciales capaces de extenderse por ARN polimerasa dependiente de ARN para formar horquillas de ARNbc, como se enseña en el documento USSN 60/399.998P, presentado el 31 de julio de 2002, y el documento PCT/US20031024028, "Double Stranded RNA Structures and Constructs and Methods for Generating and Using the Same", presentado el 31 de julio de 2003; así como las horquillas estructuradas "completamente", horquillas con regiones desapareadas, y construcciones multiepitópicas como se enseñan en el documento USSN 60/419.532, presentado el 18 de octubre de 2002, y el documento PCT/US2003/033466, "Double-Stranded RNA Structures and Constructs, and Methods for Generating and Using the Same", presentado el 20 de octubre de 2003. Las últimas aplicaciones proporcionan en particular procedimientos y composiciones que son especialmente valiosos para expresar una o más, incluyendo múltiples moléculas de ARNbc de horquilla cortas, cada una de las cuales puede diseñarse para orientarse a una hebra vírica seleccionada, por ejemplo, la hebra no codificante del HCV de hebra codificante, usando los principios y procedimientos enseñados en la presente memoria. En algunos aspectos, la molécula efectora de ARNbc de la invención es un "ARNbc de horquilla", una "horquilla de ARNbc", "ARN de horquilla corta" o "ARNhc", concretamente, una molécula de ARN de menos de aproximadamente 400 a 500 nucleótidos (nt), preferiblemente menos de 100 a 200 nt, en que al menos una extensión de al menos 15 a 100 nucleótidos (preferiblemente 17 a 50 nt, más preferiblemente 19 a 29 nt) está apareada por bases con una secuencia complementaria localizada en la misma molécula de ARN (hebra de ARN individual), y en que dicha secuencia y la secuencia complementarias están separadas por una región no apareada de al menos aproximadamente 4 a 7 nucleótidos (preferiblemente de aproximadamente 9 a aproximadamente 15 nucleótidos) que forma un bucle monocatenario por encima de la estructura de tallo creada por las dos regiones de complementariedad de bases. Las moléculas de ARNhc comprenden al menos una estructura de tallo-bucle que comprende una región de tallo bicatenaria de aproximadamente 17 a aproximadamente 100 pb, de aproximadamente 17 a aproximadamente 50 pb, de aproximadamente 40 a aproximadamente 100 pb, de aproximadamente 18 a aproximadamente 40 pb, o de aproximadamente 19 a aproximadamente 29 pb; homólogos y complementarios de una secuencia diana para inhibir y una región de bucle no apareada de al menos aproximadamente 4 a 7 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 9 a aproximadamente 15 nucleótidos, que forma un bucle monocatenario por encima de la estructura de tallo creada por las dos regiones de

- complementariedad de bases. Sin embargo se reconocerá que no es estrictamente necesario incluir una "región de bucle" o "secuencia de bucle", porque una molécula de ARN que comprenda una secuencia seguida inmediatamente por su complemento inverso tenderá a asumir una conformación de tallo-bucle incluso cuando no estén separadas por una secuencia "de relleno" irrelevante, por ejemplo, si la secuencia efectora y el complemento efector
- 5 seleccionados son suficientemente largos, formarán una región de tallo bicatenaria de al menos 19-21 nt de longitud separada por 3 o 4 nucleótidos cuyas limitaciones estéricas fuercen a un "bucle" desapareado. Los ARNhc incluidos son ARNbc de horquilla duales o de dos dedos o múltiples dedos, en que la molécula de ARN comprende dos o más de dichas estructuras de tallo-bucle separadas por una región espaciadora monocatenaria. En un aspecto, la invención proporciona composiciones de vector que comprenden una pluralidad de promotores de ARN polimerasa
- 10 III, preferiblemente promotores de ARN polimerasa III humana o de mamífero, que controlan la expresión de múltiples moléculas de ARNhc con homología con las secuencias de ARN de virus que causan enfermedades humanas, por ejemplo, virus de ARN monocatenario como se describe en la presente memoria. La pluralidad de promotores de ARN polimerasa III pueden ser iguales o diferentes. La invención proporciona los medios de suministro a una célula hospedadora de cantidades terapéuticas y mantenidas de 2, 3, 4, 5 o más moléculas de
- 15 horquilla de ARNbc antivíricas diferentes, en un modo genéticamente estable, que inhiben la replicación vírica usando 2, 3, 4, 5 o más elementos de secuencia vírica independientes sin provocar una respuesta de estrés por ARNbc. En un aspecto, cada secuencia promotora de ARN polimerasa III está ligada operativamente con una secuencia que codifica una molécula de horquilla de ARNbc diferente. Ventajosamente, se administran 3, 4, 5, 6 o más moléculas efectoras de ARNbc, por ejemplo ARNbc de horquilla, incluyendo al menos 1, 2, 3 o más moléculas
- 20 efectoras de ARNbc de orientación a intermedio de replicación de hebra no codificante antivíricas (por ejemplo, de orientación a la hebra no codificante o antígenómica de HCV), solas o en combinación con 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más moléculas efectoras de ARNbc antivíricas (por ejemplo, horquillas de ARNbc) que se orientan a la hebra de ARN genómico (por ejemplo, que se orientan al ARN de hebra codificante o genómica de HCV).
- 25 **[0024]** En un aspecto, uno o más promotores de polimerasa III expresan un transcrito de ARN que forma una molécula de horquilla de ARNbc de dos dedos o dual que comprende dos o más ARNhc de la invención (comprendiendo cada uno una estructura de tallo-bucle) separados por una región monocatenaria. Los dos o más ARNhc pueden orientarse a la misma o diferentes secuencias de la misma o diferentes hebras del mismo virus o de diferentes virus.
- 30 **[0025]** En un aspecto, las regiones de autocomplementariedad del ARNbc de horquilla o la región bicatenaria de un ARNbc de cadena doble comprenderán una secuencia efectora y un complemento efector (deseablemente ligados por una región de bucle monocatenario en un ARNbc de horquilla). La secuencia efectora o hebra efectora es aquella hebra de la región bicatenaria o de cadena doble que se incorpora a o se asocia con el RISC.
- 35 **[0026]** Se entiende por "vector de expresión" cualquier vector que comprenda elementos tales como, por ejemplo, un promotor usado para transcribir un ARN, por ejemplo, un vector que contiene al menos un promotor ligado operativamente con un gen o una región de interés de codificación o no de codificación en dirección 3' (por ejemplo, un fragmento de ADNc o ADN genómico que codifica una proteína, o cualquier ARN de interés, por ejemplo,
- 40 secuencias que codifican ARN de hebra genómica vírica o ARN de hebra antígenómica, secuencias de codificación y/o no de codificación como se describen en la presente memoria, opcionalmente, por ejemplo, ligadas operativamente con una secuencia que se encuentra fuera de una región de codificación, una región de codificación de ARN anticodificante, una región de codificación de ARNbc o secuencias de ARN que se encuentran fuera de una región de codificación). Una "construcción de expresión", como se usa en la presente memoria, significa cualquier
- 45 vector de expresión que comprenda la secuencia de codificación de una molécula efectora de ARNbc ligada operativamente con elementos, por ejemplo un promotor, usados en la expresión de la molécula efectora de ARNbc. La transfección o transformación de la construcción de expresión en una célula receptora permite a la célula expresar ARNbc codificados por la construcción de expresión. Una construcción de expresión puede ser un plásmido, virus o cromosoma artificial modificado por ingeniería genética derivado, por ejemplo, de un bacteriófago,
- 50 adenovirus, retrovirus, poxvirus o herpesvirus. Una construcción de expresión no tiene que ser replicable en una célula viva, sino que puede prepararse sintéticamente. Los vectores de expresión preferidos para la expresión de ARN bicatenarios, incluyendo moléculas de horquilla de ARNbc, se describen en la solicitud provisional de EE.UU. 60/497.304, WO 2005/040388, pub. de 6 de mayo de 2005, en el documento US/PCT2004/026999 "Multiple Compartment Eukaryotic Expression Systems", en las solicitudes provisionales de EE.UU. 60/362260 y 60/629942,
- 55 presentadas el 23 de agosto de 2004 y el 22 de noviembre de 2004, respectivamente, y en el documento PCT/US2005/29976, presentado el 23 de agosto de 2005, "Multiple RNA Polymerase III Promoter Expression Constructs". El término "*in vivo*" se pretende que incluya cualquier sistema en el que la maquinaria de replicación celular de ADN o ARN esté intacta, incluyendo sistemas de cultivo de tejido y en células, tejidos, órganos u organismos vivos multicelulares individuales.

- [0027]** Se entiende por “infección”, “infectado”, “infección vírica” o “infectado víricamente” la invasión de un organismo hospedador, tejido o tejidos hospedadores o célula o células hospedadoras por un virus. Por ejemplo, la infección puede incluir el crecimiento excesivo de virus que están presentes normalmente en o sobre el cuerpo de un animal o el crecimiento de virus que no están presentes normalmente en o sobre el animal. Más genéricamente, una infección vírica puede ser cualquier situación en que la presencia de una población o poblaciones víricas sea dañina para un organismo hospedador. Por tanto, un organismo “padece” una infección vírica cuando está presente una cantidad excesiva de una población vírica en o sobre el organismo, o cuando la presencia de una población o poblaciones víricas está dañando las células u otro tejido del organismo.
- 10 **[0028]** La infección vírica relevante para los procedimientos de la invención es una infección por MCV. Otros virus de hebra codificante incluyen los coronavirus humanos (ejemplificados por el agente que causa el síndrome respiratorio agudo grave (SRAG)), flavivirus incluyendo el virus de la encefalitis del Nilo occidental (VNV), virus de la encefalitis japonesa (JE), virus de la encefalitis de Murray Valley (MVE), virus de la encefalitis de St. Louis, virus de la fiebre amarilla, virus de la hepatitis C (HCV), virus de la fiebre del dengue, virus de la rubéola, calicivirus tales como virus de Norwalk, virus de la hepatitis E, poliovirus, rinovirus, virus de la hepatitis A, virus de Coxsackie, virus de la encefalitis equina venezolana y virus de la fiebre aftosa (FMDV). Los virus de hebra no codificante incluyen virus de la gripe, virus Ébola y Marburg, virus respiratorio sincitial, virus de la paragripe, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la rabia y virus de la estomatitis vesicular (VSV). Otra clase de virus de ARN monocatenarios conocida como virus de codificación ambivalente se ejemplifica por el virus de la fiebre de Lassa y los hantavirus (virus de fiebre hemorrágica). La infección por los virus anteriores puede ocurrir mediante varias vías de transmisión, mediante una vía preferida para algunos o mediante múltiples vías para otros. La infección puede ocurrir cuando se ingiere o inhala un fluido corporal (por ejemplo, sangre, saliva o moco) de un individuo infectado por, o se introduce en, otro individuo mediante penetración de la superficie cutánea o mucosa (por ejemplo, vagina, cavidad nasal o boca). Por tanto, algunos de estos virus pueden transmitirse mediante contacto directo con individuos infectados o mediante la inhalación de partículas víricas aerosolizadas. Adicionalmente, algunos de estos virus retienen la integridad estructural y las propiedades infecciosas en el entorno, tales como en superficies comunes, alimentos, etc., y pueden transmitirse mediante contacto indirecto, mientras que otros requieren contacto directo con un individuo u organismo infectado. Algunos de estos virus pueden transmitirse a partir de especies no humanas, tales como mosquitos o roedores, directamente a seres humanos, mientras que otros no pueden.
- 15
20
25
30
- [0029]** Los procedimientos dados a conocer en la presente memoria pueden usarse para tratar sujetos ya infectados con un virus para anular o inhibir la replicación vírica. Además, los procedimientos dados a conocer en la presente memoria pueden emplearse de modo profiláctico si una formulación farmacéutica de esta invención se administra antes de la infección inicial. El tratamiento de una infección crónica tal como HCV es un procedimiento particularmente útil de la invención. Es especialmente deseable una construcción de expresión de ARNbc que siga proporcionando una o más, preferiblemente una multiplicidad, de moléculas efectoras de ARNbc a una célula durante un periodo extendido de tiempo para aplicaciones profilácticas e infecciones crónicas. Por “modular” se entiende cambiar, reduciendo o aumentando. Como se usa en la presente memoria, una molécula efectora de ARNbc reduce deseablemente la replicación vírica en una célula en al menos un 20%, más deseablemente en al menos un 30%, 40%, 50%, 60% o 75%, y lo más deseablemente en al menos un 90% en comparación con los niveles de replicación normales del virus diana medidos mediante uno o más ensayos indirectos de replicación vírica. Las moléculas efectoras de ARNbc de la invención que se orientan al intermedio de replicación de hebra “no codificante” (hebra antigenómica) de un virus de ARN monocatenario, concretamente el intermedio de replicación de hebra no codificante de HCV, reducen deseablemente la replicación vírica en al menos un 20%, más deseablemente en al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 75% y, lo más deseablemente, en al menos un 90%, 95% o 100%, en comparación con la reducción de los niveles de replicación vírica conseguida usando una molécula efectora de ARNbc equivalente dirigida a la hebra más abundante.
- 35
40
45
- [0030]** En algunos aspectos, la molécula de ARNbc orientada a la hebra no codificante (por ejemplo, el ARNbc orientado a la hebra no codificante de HCV) reducirá directamente los niveles de hebra de ARN antigenómica pero no tendrá un efecto directo sobre los niveles de hebra de ARN genómica (por ejemplo, la hebra de ARN genómica de HCV) del virus (aunque puede haber un efecto indirecto debido a que la reducción de los niveles de molde de hebra antigenómica dará como resultado niveles reducidos de la hebra de ARN genómico que se prepara a partir del molde). En algunos aspectos de la invención, la molécula de ARNbc orientada a la hebra no codificante reducirá directamente los niveles de la hebra de ARN antigenómica y en menor medida puede reducir directamente también los niveles de la hebra de ARN genómica. Una molécula de ARNbc orientada a hebra no codificante eficaz comprende una secuencia efectora que se asocia preferiblemente con el RISC respecto a su complemento efector; por una secuencia efectora que se asocia “preferiblemente” con el RISC, se entiende una secuencia de ácido nucleico que se asocia con el RISC en una medida mayor que en un 50%, 60%, 70%, 80%, 90% respecto a la otra
- 50
55

- hebra. Como resultado, se reducirán los niveles de hebra de ARN diana. Esta reducción de los niveles de intermedio de replicación de hebra "no codificante" (hebra antígenómica) de un virus de ARN monocatenario es independiente o directa y no secundaria a reducciones de la hebra de ARN más abundante o genómica, que puede resultar de cargar algunas secuencias del complemento efector en el RISC. Se ha notificado que moléculas de ARNip orientadas a genes estructurales (E2) y no estructurales (NS3 y NS5B) de HCV redujeron la expresión de proteínas de núcleo y NS5A de HCV, así como inhibieron la síntesis de ARN de HCV de hebra no codificante replicativa, Prabhu y col., J. Med. Virol. 76(4): 511-9 (2005). Esto no es inesperado, porque la degradación de la hebra de codificación de HCV (ARN genómico de HCV) mediada por ARNi, que sirve como molde para la síntesis de la hebra no codificante o ARN antígenómico, se esperaría que diera como resultado una reducción secundaria o indirecta de los niveles de la hebra no codificante. En contraposición, las moléculas de ARNbc orientadas a la hebra no codificante de la invención (por ejemplo, ARNbc dirigidos a la hebra no codificante de HCV) reducirán directamente los niveles de la hebra de ARN antígenómica mediante ARNi, independientemente de cualquier reducción secundaria de efectos sobre la hebra de ARN genómica o abundante.
- 15 **[0031]** En algunas aplicaciones, se proporcionan una, dos, tres, cuatro o más moléculas efectoras de ARNbc de la invención que se orientan al intermedio de replicación de hebra "no codificante" (la hebra antígenómica) de un virus a una célula junto con una, dos, tres, cuatro o más moléculas efectoras de ARNbc que se orientan a la hebra de ARN genómica vírica para conseguir una reducción de la replicación vírica de al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, y lo más deseablemente, de al menos un 90%, 95% o 100%, en comparación con los niveles de replicación normales del virus diana medidos mediante uno o más ensayos indirectos de replicación vírica. Estos ensayos pueden incluir transferencia Northern, que puede medir típicamente los niveles de ARN vírico de hebra no codificante y/o de hebra codificante presentes en las células infectadas. Las hebras de ARN pueden cuantificarse también con alta sensibilidad y exactitud usando un ensayo de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) además o en lugar de transferencia Northern. La replicación vírica se mide también típicamente usando un "ensayo de placa" en que se procesan las células infectadas en cuestión para recogida de partículas víricas, y se mide el número de partículas víricas funcionales recuperadas infectando otro conjunto de células y contando las placas víricas formadas en la placa de cultivo celular. Véase también "Methods and Constructs for Evaluation of RNAi Targets and Effector Molecules", WO 2004/076629, publicado el 10 de septiembre de 2004. Aunque conseguir la replicación vírica de HCV en cultivo de tejido ha sido problemático, están ahora disponibles sistemas de replicación de HCV adecuados para el estudio de la replicación de HCV y la valoración de la actividad anti-HCV, véanse, por ejemplo, Pietschmann y col., 2002, J. Virol. 76: 4008-4021; Zhong y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (26): 9294-99 (2005); véase también Apath, LLC, St. Louis, MO.
- 35 **[0032]** Se entiende por "ARNbc sequitópico múltiple" o "ARNbc multisequitópico", una molécula de ARN que tiene segmentos derivados de múltiples ácidos nucleicos diana o que tiene segmentos no continuos del mismo ácido nucleico diana. Por ejemplo, el ARNbc sequitópico múltiple puede tener segmentos derivados de (i) secuencias que representan múltiples genes de un solo organismo, (ii) secuencias que representan uno o más genes de una variedad de organismos diferentes y/o (iii) secuencias que representan regiones diferentes de un gen particular (por ejemplo, una o más secuencias de un promotor y/u otra región reguladora y una o más secuencias de un ARNm).
- 40 Deseablemente, cada segmento tiene una identidad de secuencia sustancial con la correspondiente región de un ácido nucleico diana. En diversas realizaciones deseables, es un segmento con identidad de secuencia sustancial con el ácido nucleico diana de al menos 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 750 o más pares de bases de longitud, deseablemente entre 19 y 30, 19 y 27 o entre 19 y 25 inclusive, pares de bases de longitud. En algunas realizaciones, el ARNbc epitópico múltiple tiene segmentos no contiguos del mismo gen diana que pueden estar o no en el orden 5' a 3' de origen natural de los segmentos, y el ARNbc inhibe la replicación en al menos un 25, 50, 100, 200, 500 o 1000% más que un ARNbc con solo uno de los segmentos.
- 50 **[0033]** Las ventajas de un enfoque de ARN bicatenario epitópico múltiple o multisequitópico como se enseña en el documento USSN 60/419.532, presentado el 18 de octubre de 2002 y el documento PCT/US2003/033466, presentado el 20 de octubre de 2003, son aplicables a la utilización de las secuencias conservadas de la invención. Debido a que una especie singular de ARNbc puede silenciar simultáneamente muchos genes diana (por ejemplo, genes de múltiples patógenos, múltiples genes o secuencias de un solo patógeno o genes asociados a múltiples enfermedades), puede usarse un ARNbc epitópico múltiple para muchas indicaciones diferentes en el mismo sujeto o usarse para un subconjunto de indicaciones en un sujeto y para otro subconjunto de indicaciones en otro sujeto.
- 55 Para dichas aplicaciones, es altamente deseable la capacidad de expresar moléculas de ARNbc largas (por ejemplo, moléculas de ARNbc con secuencias de múltiples genes) sin provocar una respuesta de estrés por ARNbc. Por ejemplo, usando una serie de secuencias, cada una por ejemplo tan corta como de 19-21 nucleótidos, deseablemente de 100 a 600 nucleótidos, o fácilmente de hasta 1, 2, 3, 4, 5 o más kilobases, de tal modo que la longitud total de dichas secuencias esté dentro de la capacidad máxima del plásmido seleccionado (por ejemplo, 20

kilobases de longitud), una sola de dichas composiciones farmacéuticas puede proporcionar protección frente a un gran número de patógenos y/o toxinas a un coste relativamente bajo y con una toxicidad baja.

[0034] La capacidad de silenciar múltiples genes de un patógeno particular evita la selección genética de "mutantes de escape." En contraposición, el tratamiento típico con molécula pequeña o inmunoterapia que se orienta solo a un gen o proteína da como resultado la selección de patógenos que tienen mutaciones mantenidas en el gen o proteína diana y por tanto el patógeno se vuelve resistente a la terapia. Al orientarse simultáneamente a una serie de genes o secuencias del patógeno y/o regiones extensas del patógeno usando el enfoque de múltiples epítomos de la presente invención, se evita eficazmente la emergencia de dichos "mutantes de escape". Las moléculas de ARNbc de la invención, diseñadas para orientarse a ARN víricos de hebra no codificante tales como ARN antígeno de hebra no codificante de HCV, proporcionan un nuevo conjunto de dianas y un nuevo conjunto de moléculas antivíricas para usar solas y en asociación con ARNbc orientado a ARN genómico vírico, así como con otros agentes antivíricos. En realizaciones preferidas, se orientarán a regiones conservadas de los ARN víricos. Por ejemplo, en un aspecto puede ser deseable proporcionar a una célula u organismo humano infectado con HCV una multiplicidad de moléculas de ARNbc, incluyendo una o más moléculas de ARNbc orientadas a secuencias conservadas de la hebra no codificante antígeno de HCV, y en algunas realizaciones, una o más moléculas de ARNbc adicionales orientadas a secuencias conservadas del ARN de hebra codificante genómica, incluyendo tanto secuencias codificantes como secuencias no codificantes, por ejemplo, 5' UTR (IRES), núcleo, NS3, NS4B, NS5A, NS5B y 3' UTR. En un aspecto, se usa una multiplicidad de moléculas de ARNbc, seleccionadas del grupo consistente en: uno o más ARNbc orientados a una o más secuencias conservadas de la hebra no codificante de 5' UTR de HCV, uno o más ARNbc orientados a una o más secuencias conservadas de la hebra codificante de 5' UTR, uno o más ARNbc orientados a una o más secuencias conservadas de la hebra no codificante de 3' UTR, uno o más ARNbc orientados a una o más secuencias conservadas de la hebra codificante de 3' UTR y, opcionalmente, uno o más ARNbc orientados a secuencias codificantes de núcleo, NS3, NS4B, NS5A, y/o NS5B de HCV y, opcionalmente, una o más moléculas antivíricas distintas activas contra HCV tales como, por ejemplo, interferón α -2a + ribavirina, peginterferón α -2b, etc.

[0035] Tanto si dicha multiplicidad de ARNbc se suministra como un "cóctel" de ARNbc sintetizados exógenamente, opcionalmente modificados químicamente, como si se suministra a una célula, tejido u organismo vertebrado mediante uno o más vectores de expresión que codifican dichas moléculas de ARNbc, por ejemplo, una o más construcciones de expresión de múltiples promotores de polimerasa III, la disponibilidad de dicha variedad de agentes antivíricos es crítica para el diseño de productos terapéuticos antivíricos eficaces, debido a la naturaleza de la variación vírica tanto dentro de las poblaciones humanas como temporalmente dentro de un hospedador debido a eventos de mutación. Por ejemplo, este aspecto de la invención proporciona un medio para suministrar un régimen multifármaco que comprende varias moléculas inhibitoras víricas de ARNbc a una célula o tejido de un organismo vertebrado hospedador, de tal modo que el nivel de inhibición vírica se potencie y la probabilidad de eventos mutacionales independientes múltiples que surgen en el virus y vuelven ineficaz la inhibición por ARNbc de la replicación vírica, sea infinitesimalmente baja. Esta capacidad de suministrar un régimen multifármaco, por ejemplo, un régimen de ARNbc múltiples, es especialmente crítica para los virus de ARN, por su tasa de mutación extremadamente alta.

[0036] Se entiende por "composición de ácido nucleico" o composición "nucleotídica" uno cualquiera o más compuestos en que una o más moléculas de ácido fosfórico se combinan con un carbohidrato (por ejemplo, pentosa o hexosa) que a su vez se combinan con bases derivadas de purina (por ejemplo, adenina) y de pirimidina (por ejemplo, timina). Las moléculas de ácido nucleico de origen natural particulares incluyen ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico y ácido ribonucleico (ARN) del hospedador, así como las varias formas diferentes del último, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm), ARN transferente (ARNt) y ARN ribosómico (ARNr). Se incluyen también diferentes moléculas de ADN que son complementarias (ADNc) de las diferentes moléculas de ARN. Puede usarse también ADN sintetizado o un híbrido del mismo con ADN de origen natural, así como híbridos de ADN/ARN, y moléculas de ácido nucleico peptídico (ANP) (Gambari, *Curr. Pharm. Des.* 7: 1839-62 (2001)).

[0037] Se contempla que, cuando la molécula de ácido nucleico deseada es ARN, la T (timina) en las secuencias proporcionadas en la presente memoria se sustituya por U (uracilo). Por ejemplo, se dan a conocer en la presente memoria las SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:59 como secuencias de ADN. Resultará obvio para cualquier especialista en la materia que una molécula efectora de ARN que comprende secuencias de cualquiera de las SEQ ID NO anteriormente mencionadas tendrá la T sustituida por U. Los ácidos nucleicos tienen típicamente una secuencia de dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos unidos covalentemente de origen natural o modificados. Los ácidos nucleicos modificados incluyen, por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos, nucleótidos con bases no naturales y bases modificadas químicamente.

[0038] El término "ligado operativamente" designa un ligamiento funcional entre una secuencia de control de la expresión de ácido nucleico (tal como una secuencia promotora, señal, potenciadora o serie de sitios de unión a factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en el que la secuencia de control de la expresión afecta a la transcripción y/o traducción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia cuando las moléculas apropiadas (por ejemplo, proteínas activadoras transcripcionales) se unen a la secuencia de control de la expresión. Una construcción de expresión que codifica una molécula de ARNbc de la invención incluirá un promotor ligado operativamente con una secuencia de ácido nucleico para transcribir, por ejemplo, una secuencia que codifica una molécula de ARNbc de horquilla o una hebra de un ARNbc de cadena doble. En un aspecto, las construcciones de expresión de ARNbc que comprenden dos, tres, cuatro o más promotores de ARN polimerasa III pueden comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica un ARNhc u horquilla de ARNbc de la invención ligada operativamente con uno, dos, tres, cuatro o cada uno de dichos promotores.

[0039] "Intermedio de replicación de hebra no codificante" o "ARN antígenómico", como se usa en la presente memoria, significa el complemento de ARN de hebra no codificante de un virus de hebra codificante o secuencias no de ARNm del complemento de ARN de hebra codificante de un virus de hebra no codificante. Por ejemplo, el HCV es un virus de hebra codificante que tiene un ARN genómico de hebra codificante que, durante la replicación, sirve como molde para la transcripción del ARN de hebra no codificante antígenómica (concretamente, el intermedio de replicación de hebra no codificante). Como se da a conocer en la presente memoria, una molécula efectora de ARNbc comprende un complemento inverso de un intermedio de replicación de hebra no codificante de un virus monocatenario. Por tanto, por ejemplo, un virus de hebra codificante que comprenda la secuencia de ácido nucleico ATAGCT, tendría un intermedio de replicación de hebra no codificante que comprende la secuencia de ácido nucleico TATCGA (leído en la dirección 3' a 5', concretamente, el complemento de la hebra codificante). Una molécula efectora de ARNbc orientada a esta secuencia en el intermedio de replicación de hebra no codificante comprendería por tanto un complemento inverso del intermedio de replicación de hebra no codificante, concretamente, la secuencia de ácido nucleico ATAGCT (leída en la dirección 5' a 3'). Esta secuencia de complemento inverso que se orienta al intermedio de replicación deseado es la secuencia efectora, y las moléculas efectoras de ARNbc de la invención están diseñadas para asegurar que la secuencia efectora (en contraposición con su complemento efector) se asocia preferiblemente con el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) para medir el ARNi. En partes de la presente invención, las moléculas efectoras de ARNbc de la invención están diseñadas para orientarse al intermedio de replicación de hebra no codificante de HCV.

[0040] Se entiende por un "promotor" una secuencia de ácido nucleico suficiente para dirigir la transcripción de una molécula de ácido nucleico ligada operativamente. Se incluyen también en esta definición aquellos elementos de control de la transcripción (por ejemplo, potenciadores) que son suficientes para volver controlable la expresión génica dependiente del promotor de manera específica de tipo celular, específica de tejido o específica de tiempo, o que son inducibles por señales o elementos externos; dichos elementos, que son bien conocidos por los especialistas en la materia, pueden encontrarse en la región 5' o 3' de un gen o dentro de un intrón. Deseablemente, se liga operativamente un promotor a una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo un ADNc o un gen, de tal modo que se permita la expresión de la secuencia de ácido nucleico. Son especialmente deseables en algunas realizaciones para la expresión de moléculas efectoras de ARNbc de la invención, los promotores, sistemas de expresión de compartimentos múltiples y sistemas promotores de compartimentos múltiples como se enseñan en "Multiple-Compartment Eukaryotic Expression Systems", documento PCT/US04/26999, presentado el 20 de agosto de 2004, y en la solicitud provisional de EE.UU. 60/497.304, presentada el 22 de agosto de 2003, así como los promotores y construcciones de expresión de promotores de polimerasa III múltiples enseñados en las solicitudes provisionales de EE.UU. 60/603.622, presentada el 23 de agosto de 2004, 60/629.942, presentada el 22 de noviembre de 2004 y en el documento PCT/US2005/29976, presentado el 23 de agosto de 2005.

[0041] Una "molécula efectora de ARN", como se usa en la presente memoria, comprende una secuencia de ácido ribonucleico que comprende al menos 19 nucleótidos contiguos homólogos del complemento inverso del intermedio de replicación de hebra no codificante de un virus de ARN monocatenario. Dichos al menos 19 nucleótidos contiguos homólogos del complemento inverso del intermedio de replicación de hebra no codificante de un virus monocatenario estarán presentes en conformación bicatenaria. Una molécula efectora de ARN de la invención puede ser, por ejemplo, una cadena doble de ARNbc que comprende dos hebras separadas, o una hebra de ARN individual que comprende regiones de autocomplementariedad que son capaces de asumir una conformación de tallo-bucle u horquilla. Más particularmente, para orientarse a la hebra de ARN antígenómica vírica deseada (concretamente, el intermedio de replicación de hebra no codificante), la secuencia de complemento inverso de la diana vírica (concretamente, la hebra efectora o secuencia efectora) estará presente en la célula (proporcionada a la célula, expresada en la célula o después de escindir por nucleasas celulares) como parte de una cadena doble de

ARNbc de entre 19-27 o 19-29 nucleótidos inclusive, concretamente, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 nucleótidos, preferiblemente 19, 20 o 21 nucleótidos, presentes en conformación bicatenaria; y dicha hebra efectora se seleccionará de modo que su extremo 5' sea parte de una cadena doble con una estabilidad interna menor (véase Khvorova y col., *Cell* 115: 209-16 (2003)) en comparación con su extremo 3'. Esto aumentará la probabilidad de que la hebra efectora del ARNbc se asocie funcionalmente con el complejo de RISC que media el ARNi.

[0042] Se entiende por "sequitopo" una secuencia contigua de polirribonucleótidos bicatenarios que puede asociarse con y activar el RISC (complejo silenciador inducido por ARN), habitualmente una secuencia contigua de entre 19 y 27 o 29 pares de bases inclusive. Dicho sequitopo bicatenario comprenderá una secuencia efectora y su complemento inverso, el complemento efector. Es deseable seleccionar un sequitopo que se oriente al intermedio de replicación de hebra no codificante (concretamente, la hebra de ARN antígenómica) de un virus de ARN monocatenario de hebra codificante tal como HCV, y la inversa, se orientará a la hebra codificante (hebra de ARN antígenómica) de un virus de ARN monocatenario de hebra no codificante. Esto puede realizarse mediante cualquiera de una variedad de medios que aumentan la asociación de la hebra efectora con el complejo de RISC, respecto al complemento efector.

[0043] "Virus monocatenario" o virus de ARN monocatenario", como se usa en la presente memoria, significa un virus que tiene un genoma de ARN de hebra codificante o ARN de hebra no codificante. "Hebra codificante" significa ARN que tiene la misma polaridad que el correspondiente ARNm vírico o del ARN que codifica las proteínas víricas. Los ejemplos no limitantes de virus de ARN de hebra codificante incluyen coronavirus humanos (agente del SRAG), virus de la encefalitis del Nilo occidental (WNV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la fiebre del dengue, virus de Norwalk, poliovirus, rinovirus, virus de la hepatitis A y la hepatitis E, virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalitis japonesa (JE), virus de la rubéola, virus de Coxsackie y virus de la fiebre aftosa (FMDV). "Hebra no codificante" significa ARN que tiene la polaridad opuesta al correspondiente ARNm vírico que codifica las proteínas víricas. Los ejemplos no limitantes de virus de ARN de hebra no codificante incluyen virus de la gripe, virus Ébola, virus Marburg, virus respiratorio sincitial, virus de la paragraipe (PIV), virus del sarampión, virus de la paperas, virus de la rabia y virus de la estomatitis vesicular (VSV).

[0044] Se entiende por "complementariedad de secuencia sustancial" suficiente complementariedad de secuencia entre un ARNbc u otro ácido nucleico biológicamente activo y una molécula de ácido nucleico diana para que el ácido nucleico inhiba la expresión de la molécula de ácido nucleico diana. Preferiblemente, la secuencia del ARNbc es al menos un 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 100% complementaria de la secuencia de una región de la molécula de ácido nucleico diana. Con fines de proporcionar una molécula efectora de ARNbc de la invención, habrá deseablemente un mínimo de 19 o 20 nucleótidos contiguos (la "secuencia efectora") que tienen un 100% de complementariedad (concretamente, el complemento inverso) con la secuencia vírica diana, concretamente, un 100% de complementariedad con una secuencia de 19-27, 28 o 29 nucleótidos del ARN del intermedio de replicación vírica diana (hebra de ARN antígenómica), concretamente, complementariedad con una secuencia del intermedio de replicación de hebra no codificante de HCV. En contraposición con el 100% de complementariedad requerido para esta "secuencia efectora", sin embargo, la otra hebra de la molécula efectora de ARNbc (el "complemento efector") puede ser completamente complementaria de la secuencia efectora o puede incluir un número mínimo de nucleótidos desapareados, por ejemplo, uno, dos o tres nucleótidos desapareados pueden estar presentes en la región terminal 3' del "complemento de efector" que hibrida con la región terminal 5' de la "secuencia efectora", a condición de que el extremo deseado mismo permanezca en conformación bicatenaria.

[0045] Se entiende por "identidad de secuencia sustancial" suficiente identidad de secuencia entre un ARNbc o ARN anticodificante y una molécula de ácido nucleico diana para que el ARNbc o molécula anticodificante inhiba la expresión de la molécula de ácido nucleico diana. Preferiblemente, la secuencia del ARNbc o ARN anticodificante es al menos un 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 100% idéntica a la secuencia de una región de la molécula de ácido nucleico diana, y en una molécula de ARNbc, incluirá preferiblemente una secuencia de aproximadamente 19 a aproximadamente 25, 26, 27, 28 o 29 nucleótidos de identidad de secuencia completa respecto a una diana. En una realización preferida, esta identidad de secuencia estará presente (como complemento inverso) en la hebra de "secuencia efectora" de una molécula efectora de ARNbc de la invención.

[0046] Otra indicación de que las secuencias nucleotídicas son sustancialmente idénticas es si dos moléculas hibridan entre sí en condiciones rigurosas. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan por ser de aproximadamente 5°C a aproximadamente 20°C, habitualmente de aproximadamente 10°C a aproximadamente 15°C, menores que el punto de fusión térmica para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. El punto de fusión térmica es la temperatura (a una fuerza iónica y pH definidos) a la que un 50% de la secuencia diana, concretamente el

intermedio de replicación de hebra no codificante, híbrida con una muestra perfectamente coincidente. Típicamente, las condiciones rigurosas serán aquellas en que la concentración salina sea aproximadamente 0,02 M a pH 7,0 y la temperatura sea de al menos aproximadamente 60°C. Por ejemplo, en un procedimiento de hibridación Southern estándar, las condiciones rigurosas incluirán un lavado inicial con 6xSSC a 42°C seguido por uno o más lavados adicionales con 0,2xSSC a una temperatura de al menos aproximadamente 55°C, típicamente de aproximadamente 60°C y a menudo de aproximadamente 65°C.

[0047] Se entiende por "tratar, estabilizar o prevenir una infección vírica" prevenir o retardar la aparición inicial o posterior de una infección vírica, aumentar el tiempo de supervivencia exento de enfermedad entre la desaparición de una infección vírica y su recurrencia, estabilizar o reducir un síntoma adverso asociado con una infección vírica o inhibir o estabilizar la progresión de una infección vírica. Esto incluye tratamiento profiláctico, en que establecer el tratamiento antes de la infección con un agente infeccioso previene o reduce la gravedad o duración de la infección. Preferiblemente, al menos un 20, 40, 60, 80, 90, o 95% de los sujetos tratados tienen una remisión completa en que desaparece toda evidencia de infección vírica, al menos durante un periodo de tiempo. En otro aspecto, el tratamiento dará como resultado una reducción clínicamente relevante de al menos algunos signos o síntomas de una infección vírica en curso, por ejemplo, una reducción significativa de la carga vírica, una reducción significativa de las enzimas hepáticas asociadas a la enfermedad vírica o una mejora de la función correlacionada con una modulación de la enfermedad. En otra realización, el periodo de tiempo que un paciente sobrevive después de diagnosticarse con una infección vírica y tratarse usando un procedimiento de la invención es al menos un 20, 40, 60, 80, 100, 200 o incluso 500% superior que (i) el periodo de tiempo medio en que sobrevive un paciente no tratado, o (ii) el periodo de tiempo medio en que sobrevive un paciente tratado con otra terapia. Los términos "región no traducida" ("NTR") y "región sin traducir" ("UTR") se usan intercambiamente en la presente memoria y designan secuencias de ácido nucleico que no son secuencias de codificación, por ejemplo, secuencias de un ARNm 5' del sitio de iniciación de la traducción (ATG) y 3' del sitio de terminación de la traducción, que no se traducen al preparar un péptido.

[0048] Como se describe en la presente memoria, una célula infectada o diana puede ser una célula de vertebrado. Deseablemente, la célula de vertebrado es una célula de mamífero, preferiblemente una célula de ser humano. La célula puede estar *ex vivo* o *in vivo*. La célula puede ser un gameto o una célula somática, por ejemplo, una célula cancerosa, un citoblasto, una célula del sistema inmunitario, una célula neuronal, una célula muscular o un adipocito. En algunas realizaciones, se sobreexpresan o activan una o más proteínas implicadas en el silenciamiento génico, tales como Dicer o Argonaut, en la célula o animal para aumentar el grado de inhibición de la expresión génica. Preferiblemente, la célula es una célula de mamífero, más preferiblemente una célula de ser humano. Una "célula diana" incluye células no infectadas. Por tanto, una célula diana puede ser una célula en la que se busca la prevención de la infección vírica. Cuando dicha célula diana comprende moléculas efectoras de ARNbc como se dan a conocer en la presente memoria, las moléculas efectoras de ARNbc en dichas células pueden orientarse a intermedios de replicación de hebra no codificante cuando estas células se infectan con el correspondiente virus monocatenario.

[0049] Se ha descubierto que, sorprendentemente, es deseable diseñar moléculas antivíricas basadas en ácido nucleico para orientarse al intermedio de replicación de hebra no codificante de un virus de hebra codificante tal como HCV, y a las secuencias no de ARNm de la hebra codificante antigenómica de virus de hebra no codificante, así como a la hebra no codificante de virus de hebra no codificante. Las moléculas efectoras de ARNbc pueden diseñarse para orientarse al intermedio de replicación de hebra no codificante mediante cualquier medio que aumente preferiblemente la participación de la secuencia efectora en el proceso de ARNi, por ejemplo, aumentando la afinidad, asociación o "estímulo" de la hebra efectora de dicho ARNbc con o al RISC mediador de ARNi. Uno de dichos procedimientos diseñados para orientarse al intermedio de replicación de hebra no codificante de un virus monocatenario está basado en una simplificación de las normas y observaciones descritas por Reynolds y col., *Nature Biotechnol.* 22: 326-30 (2004); Schwartz y col., *Cell* 115: 199-208 (2003) y Khvorova y col., *Cell* 115: 209-16 (2003). También Amarzguioui y Prydz, "An algorithm for selection of functional siRNA sequences", *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 316: 1050-1058 (2004); y Ui-Tei y col., *Nuc. Acids Res.* 32: 936-948 (2004). Véase también el Boletín técnico nº 506, "siRNA Design Guidelines", Ambion, Inc., Austin, TX. Sin embargo, en lugar de seleccionar un ARNm (o ARN genómico de hebra codificante) como diana para diseñar las moléculas de ARNip como se enseña en las instrucciones de Ambion, la diana debe ser la hebra de ARN antigenómica (concretamente, la hebra de ARN no codificante) de un virus de ARN monocatenario de hebra codificante como HCV, en lugar de la hebra codificante misma. De forma similar, el siDESIGN Center de Dharmacon dirige al usuario a "identificar una secuencia nucleotídica de ARNm diana" como punto de partida para el diseño de moléculas de ARNip funcionales, Dharmacon, Inc., Lafayette, CO. En contraposición, los solicitantes han demostrado resultados superiores en la orientación a la hebra de ARN antigenómica de virus de ARN monocatenarios, incluyendo la hebra no codificante de HCV. La

orientación específica de hebra por ARNbc está basada en el descubrimiento de que la hebra codificante y la hebra anticodificante presentes en una molécula de ARNbc no son funcionalmente equivalentes en su capacidad de asociarse con y/o de activar el mecanismo de silenciamiento génico mediado por ARNbc. Aunque se cree que una hebra de un ARNbc se asocia con o se “carga” en el complejo de silenciamiento conocido como RISC, partiendo del extremo 5’ de la hebra, cada una de las dos hebras presentes en un ARNbc tendrá un extremo 5’ y 3’ y parecerá por lo tanto igualmente probable que cada una se incorpore al RISC. Sin embargo, actualmente, parece que la hebra cuyo extremo 5’ esté presente en una cadena doble menos estable térmicamente será más probable que se incorpore al RISC. Estos principios pueden utilizarse para diseñar moléculas efectoras de ARNbc que se orientan preferiblemente a una hebra seleccionada de un virus, deseablemente al intermedio de replicación de hebra no codificante de un virus monocatenario, por ejemplo, el ARN antígenómico de hebra no codificante de un virus de hebra codificante tal como HCV.

[0050] Una molécula efectora de ARNbc (una molécula de ARNbc de 19-27 o 19-29 nucleótidos de longitud) tendrá dos extremos. Con los fines de esta solicitud, un “extremo” significa los 2-6 pares de bases, preferiblemente los 3-5 pares de bases, terminales en los extremos de la porción de cadena doble de un ARNbc. Sin embargo, debido a las diferencias en las composiciones nucleotídicas de las dos secuencias terminales, es improbable que los dos extremos tengan estabilidades térmicas idénticas. El extremo con la menor estabilidad térmica tendrá la mayor tendencia a separarse en sus extremos 3’ y 5’ combinados. Aún sin desear ligarse a ninguna teoría o mecanismo, es razonable que la hebra de ARN cuyo extremo 5’ está presente en una cadena doble que tiene una menor estabilidad térmica respecto a su extremo 3’ sea más probable que se incorpore al complejo RISC que su hebra complementaria. Por ejemplo, Amarguoui y Prydz, “An algorithm for selection of functional siRNA sequences”, Biochem. Biophys. Res. Comm. 316: 1050-1058 (2004), evaluaron el número de pares A/U en los 3, 4, 5 y 6 nucleótidos terminales en ambos extremos de una cadena doble de ARNbc, concluyendo que un diferencial de contenido de A/U positivo (preferiblemente +2 o +3, pero al menos no negativo) entre los tres nucleótidos terminales en los extremos 5’ y 3’ (respecto a la hebra codificante) de la región de cadena doble (ds) era un predictor superior de funcionalidad respecto a un cálculo similar respecto a los 7 pares de bases terminales encontrado en Ui-Tei y col., Nucleic Acids Res. 32: 936-948 (2004). La presencia o ausencia de superposiciones se encontró que tenía poco o ningún efecto sobre la actividad, solo sobre la estabilidad relativa de los dos extremos de la región de cadena doble. El diseño de un ARNbc según estos principios dará como resultado una molécula de ARNbc que se orienta a un ARNm o un ARN de hebra codificante tal como el ARN genómico de hebra codificante de HCV, porque el análisis empieza respecto a una secuencia diana de ARNm. En contraposición, los solicitantes han adaptado y utilizado exitosamente principios y consideraciones similares para orientar al intermedio de replicación de hebra no codificante (concretamente, la hebra de ARN antígenómica) del virus de la hepatitis C de hebra codificante, como se describe con mayor detalle a continuación.

[0051] Se ha confirmado por los solicitantes la capacidad de adaptar y usar estas observaciones para conseguir la orientación de hebra vírica deseada para un ARNi potenciado en permutaciones experimentales de variantes de secuencia de ARNbc. El criterio específico usado para diseñar ARNbc orientados a hebra de esta invención es requerir que la estabilidad térmica predicha del extremo que comprende el extremo 5’ de la hebra efectora (y el extremo 3’ del complemento efector) tiene que ser menor que la estabilidad térmica del extremo que comprende el extremo 3’ de la hebra efectora (y el extremo 5’ del complemento efector). En este contexto, “extremo” 5’ o 3’ significa los 3 a 5 pares de bases terminales. La Tm predicha puede determinarse mediante la aplicación de una fórmula estándar conocida por los especialistas en la material o evaluando el número relativo y la posición de los enlaces A-U más débiles respecto a los enlaces C-G más fuertes en los dos extremos de una molécula efectora de ARNbc. Por ejemplo, un extremo 5’ deseable de una hebra efectora comprendería un resto de A o U terminal, mientras que al menos dos de los siguientes cuatro restos deberían ser A o U. El extremo 3’ de la hebra efectora terminará deseablemente en G o C, con al menos dos de los siguientes cuatro restos comprendiendo G o C. Como alternativa, la estabilidad térmica puede estimarse mediante cálculos de energía libre usando los procedimientos de Khvorova y col. (Cell 115: 209-16 (2003)) y las referencias en el mismo.

[0052] Además del suministro mediante expresión intracelular de las construcciones de expresión como se describe a continuación, la molécula efectora de ARN según esta invención puede suministrarse al patógeno vírico presente en la célula de mamífero como una molécula de ARN o como una secuencia de ARN parcialmente bicatenaria, o híbrido de ARN/ADN, que se preparó *in vitro* mediante procedimientos sintéticos enzimáticos convencionales usando, por ejemplo, las ARN polimerasas de bacteriófago T7, T3, o SP6 según los procedimientos convencionales descritos en textos tales como “Promega Protocols and Applications Guide”, (3ª edición 1996), eds. Doyle, ISBN No. 157. Como alternativa, estas moléculas pueden prepararse mediante procedimientos sintéticos químicos *in vitro* [véanse, por ejemplo, Q. Xu y col., Nucleic Acids Res. 24: 3643-44 (1996); N. Naryshkin y col., Bioorg. Khim. 22: 691-98 (1996); J. A. Grasby y col., Nucleic Acids Res. 21: 4444-50 (1993); C. Chaix y col., Nucleic

Acids Res. 17: 7381-93 (1989); S.H. Chou y col., Biochem. 28: 2422-35 (1989); O. Odal y col., Nucleic Acids Symp. Ser. 21: 105-06 (1989); N.A. Naryshkin y col., Bioorg. Khim. 22: 691-98 (1996); S. Sun y col., RNA 3: 1352-63 (1997); X. Zhang y col., Nucleic Acids Res. 25: 3980-83 (1997); S. M. Grvaznov y H. Winter, Nucleic Acids Res. 26: 4160-67 (1998); M. Kadokura y col., Nucleic Acids Symp. Ser. 37: 77-78 (1997); A. Davison y col., Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids 2: 1-6 (1996) y A. V. Mudrakovskaia y col., Bioorg. Khim. 17: 819-22 (1991)].

[0053] Como otra alternativa, la molécula de ARN de esta invención puede prepararse en un microorganismo recombinante, por ejemplo bacterias y levaduras, o en una célula hospedadora recombinante, por ejemplo, células de mamífero aisladas de cultivos de las mismas mediante técnicas convencionales y suministradas entonces al organismo hospedador. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y col., "MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL", 2ª Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; Nueva York, 1989, que es ejemplar de los manuales de laboratorio que detallan estas técnicas, y las técnicas descritas en las patentes de EE.UU. nº 5.824.538, 5.877.159, y 5.643.771.

[0054] Dichas moléculas de ARN preparadas o sintetizadas *in vitro* pueden suministrarse directamente a la célula infectada o al organismo infectado a medida que se preparan *in vitro*. Las referencias anteriores proporcionan a un especialista en la materia las técnicas necesarias para producir cualquiera de las siguientes realizaciones específicas, dadas las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria. Por lo tanto, en una realización, el "agente" o "molécula efectora de ARNbc" de la composición es una cadena doble (concretamente, está compuesto por dos hebras) de ARN completa o parcialmente bicatenario. En otra realización, el agente o "molécula efectora de ARNbc" de la composición puede ser un ARN monocatenario con regiones autocomplementarias. Deseablemente, el ARN monocatenario forma una horquilla en uno o ambos extremos. Deseablemente, la hebra de ARN monocatenario forma una horquilla en algunas porciones intermedias entre los extremos. Dicha hebra de ARN monocatenaria puede diseñarse para replegarse sobre sí misma volviéndose parcialmente bicatenaria *in vitro* o *in vivo*. Es aún otra realización de una molécula de ARN existente como agente eficaz usado en las composiciones una secuencia de ARN monocatenario que comprende tanto una secuencia polinucleotídica codificante como una secuencia polinucleotídica anticodificante, opcionalmente separadas por una secuencia polinucleotídica no apareada por bases. Preferiblemente, esta secuencia de ARN monocatenario tiene la capacidad de volverse bicatenaria una vez está en la célula, o *in vitro* durante su síntesis.

[0055] Es aún otra realización de esta invención un híbrido de ARN/ADN como se describe anteriormente.

[0056] Es aún otra realización de la molécula de ARN sintética una molécula de ARN circular que forma opcionalmente una estructura de varilla (véase, por ejemplo, K-S. Wang y col., Nature 323: 508-514 (1986)) o que es parcialmente bicatenaria, y puede prepararse según las técnicas descritas en S. Wang y col., Nucleic Acids Res. 22: 2326-33 (1994); Y. Matsumoto y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7628-32 (1990); E. Ford y M. Ares, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3117-21 (1994); M. Tsagris y col., Nucleic Acids Res. 19: 1605-12 (1991); S. Braun y col., Nucleic Acids Res. 24: 4152-7 (1996); Z. Pisman y col., RNA 2: 603-10 (1996); P. G. Zaphiropoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 6536-41 (1996); D. Beaudry y col., Nucleic Acids Res. 23: 3064-6 (1995). Es aún otro agente una molécula bicatenaria que comprende ARN y ADN presentes en hebras separadas, o intercalados en la misma hebra.

[0057] Deseablemente, la molécula efectora de ARN puede formarse *in vivo* y suministrarse por tanto mediante un "agente de suministro" que genera dicha molécula de ARN parcialmente bicatenaria *in vivo* después del suministro del agente a la célula infectada o al organismo infectado. Por tanto, el agente que forma la composición de esta invención es, en una realización, una molécula de ADN bicatenaria "que codifica" una de las moléculas efectoras de ARNbc anteriormente descritas. El agente de ADN proporciona la secuencia nucleotídica que se transcribe en la célula para volverse un ARN bicatenario. En otra realización, la secuencia de ADN proporciona una secuencia de desoxirribonucleótidos que se transcribe en la célula a la hebra codificante o anticodificante de ARN monocatenaria anteriormente descrita, que forma opcionalmente una horquilla en uno o ambos extremos o se repliega sobre sí misma volviéndose parcialmente bicatenaria. La molécula de ADN que es el agente de suministro de la composición puede proporcionar una secuencia de ARN monocatenaria que comprende tanto una secuencia efectora como un complemento efector, opcionalmente separados por un ligador o secuencia de "bucle", y en la que la secuencia efectora y complemento efector autocomplementarios tienen la capacidad de asumir una conformación de "tallo" bicatenario unidos por un "bucle" monocatenario, concretamente un ARNbc "de horquilla". Como alternativa, la molécula de ADN que es el agente de suministro proporciona la transcripción de la molécula de ARN circular anteriormente descrita que comprende la secuencia efectora y secuencia de complemento efector que forman opcionalmente una estructura de varilla o estructura parcialmente bicatenaria *in vivo*. La molécula de ADN puede proporcionar también la producción *in vivo* de un híbrido de ARN/ADN como se describe anteriormente, o de una cadena doble que contiene una hebra de ARN y una hebra de ADN. Estas diversas moléculas de ADN pueden

diseñarse recurriendo a técnicas convencionales tales como las descritas en Sambrook, citado anteriormente, o en la referencia Promega, citada anteriormente.

[0058] Otro agente de suministro de la presente invención que posibilita la formación en una célula de cualquiera de las moléculas de ARN anteriormente descritas puede ser un plásmido o vector de ADN monocatenario o bicatenario. En algunos aspectos, puede usarse un vector vírico recombinante adecuado, tal como adenovirus o AAV, para suministrar una molécula efectora de ARNbc codificada de la invención. Los vectores de expresión diseñados para producir ARN como se describe en la presente memoria *in vitro* o *in vivo* pueden contener secuencias bajo el control de cualquier ARN polimerasa, incluyendo ARN polimerasa mitocondrial, ARN pol I, ARN pol II y ARN pol III, polimerasas víricas y polimerasas de bacteriófagos tales como T7 y Sp6. Se prefieren los promotores de ARN polimerasa III para la expresión de oligonucleótidos tales como ARNbc de horquilla cortos u otras moléculas efectoras de ARNbc de menos de aproximadamente 300 a 400 nt de longitud. Estos vectores pueden usarse para transcribir la molécula de ARN deseada en la célula según esta invención. Los vectores pueden diseñarse deseablemente para utilizar una ARN polimerasa mitocondrial endógena (por ejemplo, ARN polimerasa mitocondrial humana, en cuyo caso dichos vectores pueden utilizar el correspondiente promotor mitocondrial humano). Las polimerasas mitocondriales pueden usarse para generar *in vivo* mensajes con caperuza (mediante la expresión de una enzima de adición de caperuza) o sin caperuza. Pueden generarse también *in vivo* transcritos de ARN pol I, ARN pol II y ARN pol III. Dichos ARN pueden tener caperuza o no y, si se desea, puede conseguirse una adición de caperuza citoplasmática mediante diversos medios, incluyendo el uso de una enzima de adición de caperuza tal como una enzima de adición de caperuza de *Vaccinia* o una enzima de adición de caperuza de alfavirus. Sin embargo, todos los transcritos de pol II tienen caperuza. El vector de ADN se diseña para contener uno de los promotores o múltiples promotores en combinación (promotores mitocondriales, de ARN pol I, pol II o pol III, o víricos, bacterianos o bacteriófagos, junto con las polimerasas asociadas). Preferiblemente, cuando el promotor es de ARN pol II, la secuencia que codifica la molécula de ARN tiene un marco de lectura abierto mayor de aproximadamente 300 nucleótidos y debe seguir la reglas de diseño para evitar la degradación mediada por mutación terminadora en el núcleo. Son especialmente deseables en algunas realizaciones para la expresión de las moléculas efectoras de ARNbc de la invención los promotores, sistemas de expresión de compartimentos múltiples y sistemas promotores de compartimentos múltiples como se enseñan en "Multiple-Compartment Eukaryotic Expression Systems", documento PCT/US04/26999, presentado el 20 de agosto de 2004, y en la solicitud provisional de EE.UU. 60/497.304, presentada el 22 de agosto de 2003, y los promotores de ARN polimerasa III y construcciones múltiples de expresión de promotor de ARN polimerasa III enseñadas en las solicitudes provisionales de EE.UU. 60/603.622, presentada el 23 de agosto de 2004; 60/629.942, presentada el 22 de noviembre de 2004 y el documento PCT/US2005/29976, presentado el 23 de agosto de 2005.

[0059] Deseablemente, los procedimientos, estructuras de ARN y construcciones de expresión como se enseñan en los documentos WO 04/035765 y PCT/US03/0033466, "Double-Stranded RNA Structures and Constructs and Methods for Generating and Using the Same", pueden utilizarse para diseñar y expresar las moléculas efectoras de ARNbc de la invención, que comprenden ARNbc de 19-29, preferiblemente 19-27 pares de bases seleccionadas de modo que la secuencia efectora, complementaria de y diseñada para orientarse al ARN del intermedio de replicación de un virus de ARN monocatenario, se asocie preferiblemente con el RISC. Estos procedimientos y construcciones pueden emplearse deseablemente para expresar uno o más, incluyendo una multiplicidad, de ARNip y/o ARNhc (ARN de horquilla cortos) de la invención. Cada uno de estos ARNip y/o ARNhc se diseñará según los principios descritos en la presente memoria. Véanse también los procedimientos, estructuras de ARN y construcciones de expresión enseñados en el documento WO 04/011624 y PCT/US02/0399998, "Double-Stranded RNA Structures and Constructs and Methods for Generating and Using the Same".

[0060] Dichos plásmidos o vectores pueden incluir secuencias plasmídicas de bacterias, virus o fagos. Dichos vectores incluyen vectores cromosómicos, episómicos y derivados de virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, bacteriófagos, episomas de levadura, elementos cromosómicos de levadura y virus; vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como aquellos derivados de elementos genéticos de plásmido y bacteriófago, cósmidos y fagémidos. Por tanto, es un vector ejemplar un vector de fago mono- o bicatenario. Es otro vector ejemplar un vector vírico de ARN o ADN mono- o bicatenario. Dichos vectores pueden introducirse en células como polinucleótidos, preferiblemente ADN, mediante técnicas bien conocidas para introducir ADN y ARN en células. Los vectores, en el caso de vectores de fago y víricos, pueden introducirse también, y preferiblemente se introducen, en células en forma de virus empaquetados o encapsidados mediante técnicas bien conocidas para infección y transducción. Los vectores víricos pueden ser competentes de replicación o defectivos de replicación. En el último caso, la propagación vírica ocurre generalmente solo en células hospedadoras complementarias.

[0061] En otra realización, el agente de suministro comprende más de un solo plásmido o vector de ADN o ARN.

Como ejemplo, un primer plásmido de ADN puede proporcionar un polinucleótido de ARN monocatenario que comprende una secuencia efectora como se describe anteriormente, y un segundo plásmido de ADN puede proporcionar un polinucleótido de ARN monocatenario que comprende una secuencia de complemento efector como se describe anteriormente, en el que el ARN que comprende la secuencia efectora y el ARN que comprende el
 5 complemento efector tienen la capacidad de aparearse por bases y volverse bicatenarios. Dicho o dichos plásmidos pueden comprender otras secuencias plasmídicas convencionales, por ejemplo, secuencias bacterianas tales como las secuencias bien conocidas usadas para construir plásmidos y vectores para la expresión recombinante de una proteína. Sin embargo, es deseable que las secuencias que posibilitan la expresión de proteína, por ejemplo
 10 regiones Kozak, etc., no estén incluidas en estas estructuras plasmídicas. Los vectores diseñados para producir ARNbc de la invención pueden diseñarse deseablemente para generar dos o más, incluyendo una serie de diferentes moléculas efectoras de ARNbc que comprende secuencias homólogas y complementarias de una secuencia diana. Este enfoque es deseable porque un solo vector puede producir muchos ARNbc operativos independientemente, en lugar de una sola molécula de ARNbc a partir de una sola unidad de transcripción y, al producir una multiplicidad de ARNbc diferentes, es posible autoseleccionar para una eficacia óptima. Pueden
 15 emplearse diversos medios para conseguir estos, incluyendo secuencias autocatalíticas así como secuencias para escisión para crear sitios de corte y empalme aleatorios y/o predeterminados.

[0062] Otros agentes de suministro para proporcionar la información necesaria para la formación de las moléculas de ARN deseadas descritas anteriormente en la célula infectada incluyen bacterias recombinantes vivas o
 20 atenuadas que se diseñan para contener las secuencias necesarias para las moléculas de ARN necesarias de esta invención. Dichas células bacterianas recombinantes, células fúngicas y similares pueden prepararse usando técnicas convencionales tales como se describen en las patentes de EE.UU. nº 5.824.538; 5.877.159 y 5.643.771. Los microorganismos útiles para preparar estos agentes de suministro incluyen aquellos enumerados en las referencias anteriormente citadas incluyendo, sin limitación, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella*
 25 *typhimurium* y diversas especies de *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*.

[0063] Aún otros agentes de suministro para proporcionar la información necesaria para la formación de las moléculas de ARN deseadas anteriormente descritas en una célula de mamífero incluyen virus vivos atenuados y particularmente virus recombinantes que portan la secuencia polinucleotídica de ARN necesaria considerada
 30 anteriormente. Dichos virus pueden diseñarse de forma similar a los virus recombinantes usados actualmente para suministrar genes para terapia génica y similar, pero preferiblemente no tienen la capacidad de expresar una proteína o fragmento funcional de una proteína. Entre los virus o secuencias víricas útiles que pueden manipularse para proporcionar la molécula de ARN necesaria a la célula de mamífero *in vivo* están, sin limitación, alfavirus, adenovirus, virus adenoasociados, baculovirus, deltavirus, poxvirus, virus de la hepatitis, herpesvirus, papovavirus
 35 (tales como SV40), poliovirus, virus de la seudorrabia, retrovirus, lentivirus, virus de *Vaccinia*, virus de ARN de hebra codificante y anticodificante, viroides y virusoides o porciones de los mismos. Estos diversos agentes de suministro vírico pueden diseñarse aplicando técnicas convencionales tales como se describen en M. Di Nocola y col., Cancer Gene Ther. 5: 350-6 (1998), entre otros, con las enseñanzas de la presente invención.

40 Suministro de ácido nucleico

[0064] Las moléculas efectoras de ARNbc de la invención y las construcciones de ADN y/o ARN que codifican las moléculas efectoras de ARNbc de la invención pueden administrarse a la célula/tejido/organismo hospedador en forma de ADN, ARN o ADN/ARN "desnudo", formulado en un vehículo farmacéutico sin ningún agente promotor de
 45 la transfección. Puede conseguirse un suministro más eficaz que el conocido por los especialistas en la materia del suministro de ADN y ARN usando, por ejemplo, aquellos agentes facilitadores de la transfección de polinucleótido conocidos por los especialistas en la materia del suministro de ARN y/o ADN. Los siguientes son agentes ejemplares: anfífilos catiónicos, incluyendo anestésicos locales tales como bupivacaína, lípidos catiónicos, liposomas o partículas lipídicas; policationes tales como polilisina; policationes tridimensionales ramificados tales como
 50 dendrímeros; carbohidratos; detergentes o tensioactivos, incluyendo tensioactivos de bencilamonio tales como cloruro de benzalconio. Se describen ejemplos no exclusivos de dichos agentes facilitadores o coagentes útiles en esta invención en las patentes de EE.UU. nº 5.593.972, 5.703.055, 5.739.118, 5.837.533, 5.962.482, 6.127.170, 6.379.965 y 6.482.804, en la solicitud de patente internacional nº WO03/093449, publicada el 13 de noviembre de 2003 (complejos moleculares multifuncionales y emulsiones anfífilas catiónicas de aceite/agua), el documento
 55 WO99/21591, publicado el 6 de mayo de 1999 ("Compositions and Methods for Delivery of Genetic Material"). Las patentes de EE.UU. nº 5.824.538, 5.643.771 y 5.877.159 enseñan el suministro de una composición distinta de una composición polinucleotídica, por ejemplo, una célula o bacteria donante transfectada que contiene las composiciones que codifican ARNbc de la invención.

- [0065]** En algunas realizaciones, la molécula efectora de ARNbc o vector de expresión de ARNbc se compleja con uno o más lípidos catiónicos o anfífilos catiónicos, tales como las composiciones dadas a conocer en la patente de EE.UU. nº 4.897.355 (Eppstein y col., presentada el 29 de octubre de 1987); la patente de EE.UU. nº 5.264.618 (Felgner y col., presentada el 16 de abril de 1991) o la patente de EE.UU. nº 5.459.127 (Felgner y col., presentada el 5 16 de septiembre de 1993). En otras realizaciones, el ARNbc o vector de expresión de ARNbc se compleja con un liposoma/composición liposómica que incluye un lípido catiónico e incluye opcionalmente otro componente tal como un lípido neutro (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.279.833 (Rose); la patente de EE.UU. nº 5.283.185 (Epan) y la patente de EE.UU. nº 5.932.241).
- 10 **[0066]** En otras realizaciones, las moléculas efectoras de ARNbc o construcción o construcciones de expresión de ARNbc se complejan con los complejos moleculares multifuncionales de las patentes de EE.UU. nº 5.837.533, 6.127.170 y 6.379.965 (Boutin), o, deseablemente, los complejos moleculares multifuncionales o emulsiones anfífilas catiónicas en aceite/agua del documento WO03/093449, publicado el 13 de noviembre de 2003, Satishchandran. La última solicitud enseña una composición que incluye un ácido nucleico, una espermina endosomolítica que incluye un colesterol o ácido graso y una espermina orientadora que incluye un ligando para una molécula de superficie celular. La relación de carga positiva a negativa de la composición está entre 0,1 y 2,0, preferiblemente de 0,5 a 1,5 inclusive; la espermina endosomolítica constituye al menos un 20% de las moléculas que contienen espermina de la composición y la espermina orientadora constituye al menos un 10% de las moléculas que contienen espermina de la composición. Deseablemente, la relación de carga positiva a negativa está entre 0,8 y 1,2 inclusive, tal como entre 0,8 y 0,9 inclusive. La espermina orientadora se diseña para localizar la composición en una célula o tejido particular de interés. La espermina endosomolítica desestabiliza la vesícula endosómica y encapsula la composición durante la endocitosis, facilitando la liberación del ácido nucleico de la vesícula endosómica al citoplasma o núcleo de la célula. El uso de dicha mezcla de espermina orientadora/espermina endosomolítica no solo consigue la transfección, sino que potencia también la expresión.
- 25 **[0067]** Una molécula efectora de ARNbc o un vector de expresión de ADN que codifica una molécula efectora de ARNbc de la invención puede complejarse, como se enseña en el documento WO03/093449, con una mezcla de un 35% de manosilespermina y 65% de colesterilespermina para conseguir la transfección orientada de células inmunitarias, por ejemplo macrófagos, mediante el receptor de manosa, cuando se administra por vía IV a ratones. 30 La transfección orientada de hepatocitos *in vivo* para suministro de ARNbc frente a virus hepáticos tales como HCV puede conseguirse mediante inyección IV con una composición que comprende un vector de expresión de ADN o ARN como se describe en la presente memoria complejo con una mezcla (por ejemplo, de relación 35/65%) de una lactosilespermina (mono- o trilactosilada) y colesterilespermina (que contiene espermina y ADN a una relación de carga de 0,8). Dichas composiciones son especialmente útiles para aplicaciones farmacéuticas y pueden formularse fácilmente en un vehículo estéril no pirogénico adecuado, por ejemplo disolución salina tamponada para inyección, para administración parenteral, por ejemplo IV (incluyendo infusión IV), IM, SC y para administración intraperitoneal, así como para formulaciones aerosolizadas para suministro pulmonar mediante inhalación. En ciertas formulaciones, puede complejarse una construcción de expresión de ADN de la invención con una espermina endosomolítica tal como colesterilespermina sola, sin una espermina orientadora; algunas vías de administración, 40 tales como inyección o infusión intraperitoneal, pueden conseguir un suministro hepático eficaz, la transfección de una construcción de ADN y la expresión de una molécula efectora de ARNbc, por ejemplo, múltiples horquillas de ARNbc eficaces contra el HCV. Puede formularse también un vector de expresión de ADN que codifica una molécula efectora de ARNbc de la invención en forma de una microemulsión para suministro oral o parenteral *in vivo*, por ejemplo, suministro intravenoso, como se enseña en el documento WO03/093449. Las formulaciones contienen deseablemente anfífilos tales como el anestésico local bupivacaína, colesterilespermina, cloruro de benzalconio u octilespermina. Los experimentos *in vivo* en ratones sugieren que la administración oral da como resultado un suministro significativo al hígado. La administración intravenosa de microemulsiones da como resultado la transfección de órganos con grandes lechos capilares, por ejemplo, pulmón, hígado, bazo y riñón.
- 45 **[0068]** La transformación/transfección de la célula para investigación y otros fines no terapéuticos puede ocurrir mediante una variedad de medios incluyendo, pero sin limitación, lipofección, transfección mediada por DEAE-dextrano, microinyección, precipitación con fosfato de calcio, suministro vírico o retrovírico, electroporación o transformación biolística. El ARN o vector de expresión de ARN (ADN) puede ser ARN o ADN desnudo o ARN o ADN complejo con anestésico local (véanse las patentes de EE.UU. nº 6.217.900 y 6.383.512, "Vesicular Complexes and Methods of Making and Using the Same", Pachuk y col.). Es otra tecnología de suministro deseable para ARNbc o construcciones de expresión de ARNbc de la invención para aplicaciones farmacéuticas el sistema de suministro de ácidos nucleicos de dos componentes CycloSert™ autoensamblante, basado en policonjugados que contienen ciclodextrina, que está disponible en Insect Therapeutics, Pasadena, CA (véanse Popielarski y col., Bioconjug. Chem. 14: 672-8 (2003); Reineke y Davis, Bioconjug. Chem. 14: 247-54 (2003); Reineke y Davis,

Bioconjug. Chem. 14: 255-61 (2003)). El primer componente es un polímero policatiónico lineal que contiene ciclodextrina que, cuando se mezcla con ADN, se une a la "cadena principal" de fosfato del ácido nucleico, condensado el ADN y autoensamblándose en nanopartículas coloidales uniformes que protegen al ADN de la degradación por nucleasa en suero. Es un segundo componente un agente modificador de superficie con una molécula de adamantina-PEG terminal que, cuando se combina con el polímero de ciclodextrina, forma un complejo de inclusión con ciclodextrinas de superficie y evita la agregación, potencia la estabilidad y posibilita la administración sistémica. Además, pueden estar unidos al modificador ligandos orientadores a receptores de superficie celular, proporcionando un suministro orientado del ADN directamente a las células diana de interés. Puesto que los hepatocitos son susceptibles de infección por HCV, utilizar este procedimiento para orientar el suministro de construcciones de expresión de ARNbc de la invención a células hepáticas se considera especialmente ventajoso. Por ejemplo, puede orientarse al receptor de asialoglicoproteína (ASGP-R) en hepatocitos de mamífero mediante el uso de ligandos sintéticos con restos galactosilados o lactosilados, tales como polímeros galactosilados. Pueden insertarse secuencias reguladoras apropiadas en los vectores de la invención usando procedimientos conocidos por los especialistas en la materia, por ejemplo, mediante recombinación homóloga (Graham y col., J. Gen. Virol. 36: 59-72 (1977)), u otros procedimientos apropiados ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Sambrook y col., eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 2ª edición, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

[0069] Los promotores se insertan en los vectores de modo que se ligen operativamente 5' a la secuencia del ácido nucleico que codifica el oligonucleótido de ARNbc. Puede usarse en la invención cualquier promotor que sea capaz de dirigir la iniciación de la transcripción en una célula eucariótica. Por ejemplo, pueden usarse promotores no específicos de tejido tales como promotores de citomegalovirus (DeBernardi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9257-9261 (1991) y referencias en el mismo), de gen I de metalotionina de ratón (Hammer y col., J. Mol. Appl. Gen. 1: 273-288 (1982)), de timidina cinasa de HSV (McKnight, Cell 31: 355-365 (1982)) y de SV40 temprano (Benoit y col., Nature 290:304-310 (1981)). Pueden usarse también en la invención promotores y potenciadores víricos, tales como aquellos de citomegalovirus, herpesvirus simple (de tipos I y II), virus de la hepatitis (A, B y C) y virus de sarcoma de Rous (RSV; Fang y col., Hepatology 10: 781-787 (1989)). Los vectores de expresión de ARNbc pueden incluir promotores de ARN polimerasa I, ARN polimerasa II incluyendo, pero sin limitación, HCMV, SCMV, MCMV, RSV, EF2a, TK y otros promotores de HSV tales como los promotores ICP6, ICP4 e ICP0, promotor pregenómico de HBV, promotores de ARN pol III incluyendo, pero sin limitación, promotores de U6 y ARNt y promotores de hebra ligera y pesada mitocondrial. Deseablemente, el vector de expresión de ARNbc comprende al menos un promotor de ARN polimerasa II, por ejemplo, un promotor inmediato temprano de CMV humano (HCMV-IE) o un promotor de CMV de simio (SCMV), al menos un promotor de ARN polimerasa I, o al menos un promotor de ARN polimerasa III. El promotor puede ser también un promotor de T7, en cuyo caso, la célula comprende además la ARN polimerasa T7. Como alternativa, el promotor puede ser un promotor de SP6, en cuyo caso, la célula comprende además la ARN polimerasa SP6. El promotor puede ser también un promotor de T7 convergente y un promotor de ARN de SP6 convergente. Puede prepararse una célula que contenga polimerasa de T7 o SP6 transformando la célula con un plásmido de expresión de polimerasa de T7 o polimerasa de SP6, respectivamente. En algunas realizaciones, se liga operativamente un promotor de T7 o un promotor de ARN polimerasa III con un ácido nucleico que codifica un ARNbc corto. En otras realizaciones, el promotor es un promotor mitocondrial que permite la transcripción citoplasmática del ácido nucleico al vector (véanse, por ejemplo, los promotores mitocondriales descritos en el documento WO 00/63364, presentado el 19 de abril de 2000 y en el documento WO/US2002/00543, presentado el 9 de enero de 2001). Como alternativa, el promotor es un promotor inducible, tal como un promotor lac (Cronin y col., Genes Dev. 15: 1506-1517 (2001)), ara (Khlebnikov y col., J. Bacteriol. 182: 7029-34 (2000)), ecdisona (sitio web de Rheogene), RU48 (mefepriestona) (antagonista de corticosteroide) (Wang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 8483-88 (1999)) o tet (Rendal y col., Hum. Gene Ther. 13: 335-42 (2002); Larnartina y col., Hum. Gene Ther. 13: 199-210 (2002)) o un promotor dado a conocer en el documento WO 00/63364, presentado el 19 de abril de 2000. Son también útiles en los procedimientos y composiciones de la invención los promotores estructurales y químicos, incluyendo los promotores de candado abierto forzado, enseñados en el documento WO 03/035910 A1, republicado el 23 de diciembre de 2004. Véanse también los sistemas promotores enseñados en Pachuk, C. y Satishchandran, C. "Multiple-Compartment Eukaryotic Expression Systems," solicitud provisional de EE.UU. n° 60/497.304, presentada el 22 de agosto de 2003, que se consideran particularmente deseables en los procedimientos y composiciones de la invención.

[0070] Un procedimiento deseable utiliza un sistema de expresión de ARNbc de T7 para conseguir la expresión citoplasmática de ARNbc (por ejemplo, moléculas de ARNbc largas o cortas) en células de vertebrado (por ejemplo, células de mamífero). El sistema de expresión de T7 utiliza el promotor T7 para expresar el ARNbc deseado. La transcripción se controla por la ARN polimerasa de T7, que puede proporcionarse en un segundo plásmido o en el mismo plásmido. La ARN polimerasa del bacteriófago T7 (T7 pol) es el producto del gen 1 de T7, que puede

reconocer específicamente su secuencia promotora sensible y exhibir una alta actividad transcriptasa. Se da a conocer la secuencia completa del genoma de T7, con información detallada sobre las diferentes regiones del bacteriófago, incluyendo secuencias promotoras, en Dunn y Studier, *J. Mol. Biol.* 166: 477-535 (1983) (véase también la base de datos "Genome" del NCBI, nº de acceso NC 00 1 604). El promotor de T7 no puede utilizarse por cualquier ARN polimerasa distinta de la polimerasa del bacteriófago T7, que muestra una rigurosa especificidad por el promotor (Chamberlin y col., *Nature* 228: 227-31 (1970)). Cuando se utiliza el sistema de expresión de T7 para expresar ARNbc, por ejemplo, puede usarse una primera construcción plasmídica que expresa tanto una hebra codificante como anticodificante bajo el control de promotores de T7 convergentes y una segunda construcción plasmídica que expresa la ARN polimerasa de T7 bajo el control de un promotor de RSV (virus de sarcoma de Rous) o CMV. Tanto el ARNbc como la ARN polimerasa de T7 podrían expresarse ventajosamente por una sola construcción plasmídica bicistrónica, particularmente cuando el ARNbc se forma a partir de una sola hebra de ARN con repeticiones invertidas o regiones de autocomplementariedad que posibilitan que la hebra asuma una estructura de tallo-bucle u horquilla con una región al menos parcialmente bicatenaria. Las hebras codificante y anticodificante individuales que se autoensamblan formando un ARNbc pueden sintetizarse mediante una sola construcción plasmídica usando, por ejemplo, promotores convergentes tales como promotores del bacteriófago T7 dispuestos respectivamente en los extremos 5' y 3' de las hebras complementarias de una secuencia seleccionada para transcribir. Véanse también, por ejemplo, las enseñanzas del documento WO 0063364, con respecto a los sistemas de expresión de ARNbc de T7, así como el documento USSN 60/399.998, presentado el 31 de julio de 2002 y el documento USSN 60/419.532, presentado el 18 de octubre de 2002.

[0071] Los ARNbc de la invención, y los vectores recombinantes que contienen secuencias de ácido nucleico que los codifican, pueden usarse en composiciones terapéuticas para prevenir la infección por virus monocatenarios. Las composiciones terapéuticas de la invención pueden usarse solas o en mezclas, o en combinación química, con uno o más materiales, incluyendo otros agentes antivíricos. La terapia de combinación de los agentes de la invención y otros antivíricos se espera que aumente significativamente la eficacia de la terapia reduciendo sustancialmente el desarrollo de resistencia a fármacos. Pueden determinarse regímenes de dosificación específicos que implican terapia con dichos agentes múltiples mediante experimentación rutinaria por los especialistas en la materia de la medicina clínica.

[0072] Las formulaciones incluirán deseablemente materiales que aumentan la estabilidad biológica de los oligonucleótidos o los vectores recombinantes, o materiales que aumentan la capacidad de las composiciones terapéuticas de penetrar en células infectadas selectivamente. Las composiciones terapéuticas de la invención pueden administrarse en portadores farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, solución salina fisiológica), que se seleccionan basándose en el modo y vía de administración y la práctica farmacéutica estándar. Un especialista en la materia puede formular fácilmente una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido o construcción génica. En algunos casos, se usa una formulación isotónica. En general, los aditivos para isotonicidad pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En algunos casos, se prefieren disoluciones isotónicas tales como disolución salina tamponada con fosfato. Los estabilizadores incluyen gelatina y albúmina. En algunas realizaciones, se añade un agente de vasoconstricción a la formulación. Las preparaciones farmacéuticas según la presente invención se proporcionan estériles y exentas de pirógenos. Se describen portadores farmacéuticos adecuados, así como elementos farmacéuticos necesarios para uso en formulaciones farmacéuticas, en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (anteriormente "Remington's Pharmaceutical Sciences"), Mack Publishing Co., un texto de referencia estándar en este campo, y en la USP/NF.

[0073] Las vías de administración incluyen, pero sin limitación, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intraocular y oral, así como transdérmica o por inhalación o supositorio. Las vías de administración preferidas incluyen inyección intravenosa, intramuscular, oral, intraperitoneal, intradérmica, intraarterial y subcutánea. Los ARNbc o construcciones de ARNbc pueden administrarse por medios que incluyen, pero sin limitación, jeringuillas tradicionales, dispositivos de inyección sin aguja o "pistolas génicas de bombardeo con microproyectiles". Como alternativa, puede introducirse el ARNbc y/o construcción de expresión de ARNbc mediante diversos medios en células que se retiran del individuo. Dichos medios incluyen, por ejemplo, transfección *ex vivo*, electroporación, microinyección y bombardeo con microproyectiles. Después de captar la construcción génica por las células, se reimplantan en el individuo. Se contempla que de otro modo las células no inmunogénicas que tienen construcciones génicas incorporadas a las mismas pueden implantarse al individuo incluso si las células hospedadoras se tomaron originalmente de otro individuo.

[0074] Para administración de una molécula efectora de ARNbc de la invención (por ejemplo, un ARNbc corto o largo para silenciar un gen) a un animal, se administran típicamente entre 10 mg y 100 mg, de 1 mg a 10 mg, de 500 µg a 1 mg o de 5 µg a 500 µg de ARNbc a una persona/animal de 41-68 kg (en orden de preferencia creciente).

Para administración de un vector que codifica un ARNbc (por ejemplo, un ARNbc corto o largo para silenciar un gen) a un animal, se administran típicamente entre 100 mg y 300 mg, de 10 mg a 100 mg, de 1 mg a 10 mg, de 500 µg a 1 mg o de 50 µg a 500 µg de vector de expresión o construcción de ARNbc a una persona/animal de 41-68 kg (en orden de preferencia creciente). La dosis puede ajustarse basándose en el peso del animal. En algunas realizaciones, se administra de aproximadamente 1 a 10 mg/kg o de aproximadamente 2 a 2,5 mg/kg. Pueden usarse también otras dosis, como se determina mediante experimentación rutinaria por los especialistas en la materia de la medicina clínica.

[0075] Para administración a un animal intacto, se usan típicamente entre 10 mg y 50 µg, entre 50 ng y 100 ng o entre 100 ng y 5 µg de ARNbc o ADN que codifica un ARNbc. En realizaciones deseables, se administran aproximadamente 10 µg de un ADN o 5 µg de ARNbc al animal. Con respecto a los procedimientos de la invención, no se pretende que la administración de ARNbc o ADN que codifica ARNbc a células o animales esté limitada a un modo de administración, dosificación o frecuencia de dosificación particular; la presente invención contempla todos los modos de administración suficientes para proporcionar una dosis adecuada para inhibir una infección vírica, prevenir una infección vírica o tratar una infección vírica.

[0076] Si se desea, se suministra ARNbc corto antes, durante o después del suministro exógeno de ARNbc (por ejemplo, un ARNbc más largo) que de otro modo podría esperarse que indujera citotoxicidad. Véanse las enseñanzas del documento USSN 10/425.006, presentado el 28 de abril de 2003, "Methods of Silencing Genes Without Inducing Toxicity", Pachuk.

[0077] Todas las composiciones y procedimientos dados a conocer y reivindicados en la presente memoria pueden prepararse y ejecutarse sin experimentación indebida a la vista de la presente divulgación. Aunque las composiciones y procedimientos de esta invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, resultará evidente para los especialistas en la materia que pueden aplicarse variaciones a las composiciones y procedimientos y a las etapas o la secuencia de etapas del procedimiento descrito en la presente memoria.

EJEMPLOS

[0078] La presente invención se define adicionalmente por los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan solo a modo de ilustración. Por ejemplo, las secuencias de ARNip usadas en la presente memoria como secuencia efectora o complemento efector de moléculas de ARNbc comprenden 21 nucleótidos idénticos a las secuencias diana, sin embargo, se pretende que las moléculas efectoras de ARNbc de la invención puedan ser cadenas dobles de ARNbc (que comprenden secuencias efectoras y complementos efectoras) de diversas longitudes, por ejemplo 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o mayores, por ejemplo, de 50, 100 o más pares de bases, particularmente cuando las moléculas de ARNbc se expresan intracelularmente, en cuyo caso no provocan respuestas de estrés por ARNbc, incluso por los ARNbc más largos. De forma similar, pueden utilizarse "ARNbc de horquilla", "horquilla de ARNbc", "ARN de horquilla corta" o "ARNhc", concretamente, una molécula de ARN de menos de aproximadamente 400 a 500 nucleótidos (nt), preferiblemente de menos de 100 a 200 nt, en que al menos una extensión de al menos 15 a 100 nucleótidos (preferiblemente de 17 a 50 nt, más preferiblemente de 19 a 29 nt) está apareado por bases con una secuencia complementaria localizada en la misma molécula de ARN (hebra de ARN individual), y en que dicha secuencia ("secuencia efectora") y la secuencia complementaria ("complemento efector") están separadas por una región desapareada de al menos aproximadamente 4 a 7 nucleótidos (preferiblemente de aproximadamente 9 a aproximadamente 15 nucleótidos) que forma un bucle monocatenario por encima de la estructura de tallo creada por las dos regiones de complementariedad de bases. Estas diversas realizaciones están dentro del alcance de esta invención. A partir de las consideraciones anteriores y de estos ejemplos, un especialista en la materia puede evaluar los rasgos preferidos de esta invención y, sin apartarse del espíritu y alcance de la misma, puede hacer diversos cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones.

[0079] Los detalles y resultados experimentales se muestran a continuación. Estos experimentos comparan los resultados obtenidos con ARNip diseñados para orientarse a la hebra codificante de HCV frente a los resultados obtenidos con ARNip diseñados para orientarse a la hebra no codificante de HCV. El procedimiento usado para diseñar ARNip para la hebra codificante y la hebra no codificante se describe después de los datos experimentales confirmatorios.

Ejemplo 1 (Orientación a la hebra codificante)

[0080] Breve introducción: El virus de la hepatitis C (HCV) es la causa primaria de hepatitis ni A ni B asociada a

transfusión y da cuenta de más de 200 millones de casos de hepatitis en todo el mundo. El genoma del HCV tiene un alto grado de variabilidad de secuencia. Hay seis genotipos principales que comprenden más de 50 subtipos y se ha encontrado en pacientes una heterogeneidad significativa caracterizada por cuasiespecies. Se ha realizado un gran progreso en la comprensión de la replicación del HCV usando polimerasas recombinantes o sistemas de replicación subgenómicos basados en célula. Al usar el sistema celular de replicación, se ha demostrado que el ARNip es capaz de suprimir la expresión de proteína de HCV y la replicación de ARN. Se han orientado exitosamente a secuencias de 5' NTR y genes tanto estructurales como no estructurales. La patente de EE.UU. nº 5.874.565, "Nucleic Acids Comprising a Highly Conserved Novel 3' Terminal Sequence Element of the Hepatitis C Virus", enseña una secuencia de 101 nt altamente conservada que se cree que es importante en la replicación de HCV, lo que la hace una diana potencialmente atractiva para el silenciamiento mediado por ARNbc. Sin embargo, la viabilidad de usar 3' NTR como diana antivírica eficaz para ARNi no se ha establecido, ni mucho menos la viabilidad de orientar preferiblemente al intermedio de replicación de hebra no codificante de esta secuencia de hebra codificante moléculas efectoras de ARNbc especialmente diseñadas. Esta secuencia y otras secuencias conservadas de HCV, incluyendo secuencias de 5' UTR como se enseñan en "Conserved HBV and HCV Sequences Useful for Gene Silencing", documento WO2005/014806, publicado el 17 de febrero de 2005 y en la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/638.294, presentada el 22 de diciembre de 2004, proporcionan un conjunto de secuencias conservadas para usar para orientar al intermedio de replicación de hebra no codificante de HCV (ARN antigénico) de HCV de hebra codificante y, opcionalmente, al ARN genómico de hebra codificante también.

[0081] "Orientar", como se usa en la presente memoria en el contexto de moléculas efectoras de ARNbc, significa aumentar la probabilidad de que una molécula de ARN ("la hebra efectora") de polaridad opuesta y complementariedad con una hebra vírica seleccionada se asocie con el RISC. "Orientar" puede ser cuestión de seleccionar secuencias de este conjunto según los principios proporcionados en la presente memoria. Por ejemplo, puesto que el extremo de una molécula efectora de ARNbc con la menor estabilidad térmica tendrá una mayor tendencia a separarse en sus hebras constituyentes, puede seleccionarse una región conservada particular de entre 19 y 27 pares de bases, por ejemplo, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 o 27, para orientarse a una hebra vírica particular. Es decir, la hebra cuyo extremo 5' esté presente en una cadena doble que tenga una menor estabilidad térmica respecto a su extremo 3', será más probable que se incorpore al RISC que su hebra complementaria. Puede elegirse una secuencia vírica conservada conocida que satisfaga este criterio, como se enseña en la presente memoria. En otras realizaciones de la invención, orientar puede implicar introducir uno o posiblemente dos desapareamientos nucleotídicos en los tres a cinco nucleótidos terminales de la hebra de complemento efector de la molécula efectora de ARNbc, como solo uno de los varios procedimientos usados para permitir reducir la estabilidad térmica de un extremo de la molécula efectora de ARNbc de modo que una secuencia conservada pueda modificarse para orientarse a un intermedio de replicación de hebra no codificante como se enseña en la presente memoria.

[0082] Se notifica aquí el diseño y ensayo de varios ARNip que pueden inhibir la expresión de proteína de HCV en el sistema de replicación subgenómico. Aunque se usaron ARNip preparados sintéticamente por conveniencia, se reconocerá por los especialistas en la materia de la biología molecular que los resultados conseguidos son igualmente aplicables a moléculas efectoras de ARNbc expresadas, incluyendo moléculas efectoras de ARNhc, así a como procedimientos de preparación y uso de los mismos, como se enseñan en la presente memoria. Diseño de ARNip: Se usó cada secuencia de 21 pb de 3' NTR de HCV seleccionada para orientación de ARNbc para diseñar un par de oligonucleótidos de ADN que representan ambas hebras complementarias de la secuencia más una cola adicional de 9 pb correspondiente al promotor de ARN polimerasa de T7. Se realizó el proceso de orientación específica de hebra partiendo de la secuencia de la hebra no codificante o codificante según se desee, y eligiendo una secuencia de hebra efectora (complementaria de la diana) con un extremo 5' presente en una cadena doble de estabilidad termodinámica menor que el extremo 3', en una simplificación de las normas descritas por Reynolds y col., *Nature Biotechnol.* 22: 326-30 (2004); Schwartz y col., *Cell* 115: 199-208 (2003) y Khvorava y col., *Cell* 115: 209-16 (2003). (Véase la **Fig. 3**). Se usó entonces cada oligonucleótido con cola como molde en reacciones de transcripción *in vitro* que generaron grandes cantidades de ARN monocatenario complementario de la secuencia de molde en cada reacción (la transcripción *in vitro* se efectuó usando un kit fabricado por Ambion). Después de la purificación, se asociaron los productos de ARN complementarios formando ARNbc, que se usó en transfección. Con fines de este experimento, la secuencia diana era la 3' UTR de 101 nt como se enseña en Rice, patente de EE.UU. nº 5.874.565.

[0083] Se enseñan otras secuencias de HCV conservadas adecuadas para selección y utilización en ARNip y ARNhc según los principios de la invención en "Conserved HBV and HCV Sequences Useful for Gene Silencing", documento WO2005/014806, publicado el 17 de febrero de 2005, y en la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/638.294, presentada el 22 de diciembre de 2004, en particular, las secuencias de HCV conservadas dadas a

conocer en el mismo, concretamente las SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:27 y la región conservada 1 de HCV y la región conservada 2 de HCV, incorporadas a la presente memoria como referencia.

[0084] Cultivo celular y medios. Se cultivó la línea celular de hepatoma de replicón de HCV Huh7 9-13 (Ralf Bartschlagler) en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen) que contenía 10% de suero fetal de ternero (Invitrogen), 1% de penicilina-estreptomina, 1% de aminoácidos no esenciales y Geneticin® (Invitrogen) 0,5 mg/ml. Se cultivaron las células hasta 75% de confluencia antes de dividir.

[0085] Análisis de transferencia Western. Se recogieron lisados de células totales de células de replicón en tampón 1 x LDS (Invitrogen). Se calentaron los lisados a 90°C durante 5 min en presencia de beta-mercaptoetanol antes de electroforesis en gel de poliacrilamida con 10% de trisglicina (Invitrogen). Se transfirió la proteína a una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) (Invitrogen). Después de la transferencia, se aclaró la membrana una vez con PBS que contenía 0,5% de Tween-20 (PBS-Tween) y se bloqueó con PBS-Tween que contenía un 5% de leche no desnatada durante 1 h. Después de lavar con PBS-Tween, se incubó la membrana con anticuerpo primario de α -NS5A (un obsequio del Dr. Chen Liu) a una dilución de 1:1500 durante 1 h a temperatura ambiente. Antes de la incubación con anticuerpo secundario de α -IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Amersham) diluido 1:5000, se lavó la transferencia con PBS-Tween 20. Después de incubación con anticuerpo secundario, se lavó de nuevo la transferencia y se trató con ECL (electroquimioluminiscencia) (Amersham) según el protocolo del fabricante.

[0086] Transfección de ARNip en células de replicón. Para la transfección de ARNip en células de replicón, se usó el reactivo Lipofectamine® 2000 (Invitrogen) según el manual del usuario. Brevemente, se sembraron 2×10^4 células en 0,5 ml de DMEM en placas de 24 pocillos un día antes de la transfección. Se diluyó la cantidad indicada de ARNip en 50 μ l de OptiMEM® y se mezcló con reactivo Lipofectamine® 2000 diluido (1 μ l en 50 μ l de OptiMEM®). Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 20 min antes de aplicar a la monocapa celular. 48-72 horas después de la transducción, se lavaron las células en PBS y se lisaron en 100 μ l de tampón de muestra con SDS.

[0087] La Fig. 1 es una transferencia Western que muestra los niveles de proteína NS5A de HCV a (izquierda a derecha) 0, 9 y 20 pmol de los ARNip identificados, suministrados como se describe en el texto. El ARNip de lamina sirve como control negativo y el ARNip de núcleo sirve como control positivo. No hay inhibición de NS5A cuando se usa cualquier concentración de ARNip de lamina, mientras que se observa inhibición tanto a 9 como a 20 pmol con el ARNip de control positivo. Se observa solo una regulación por disminución significativa con ARNip 72 (SEQ ID NO:7). La Tabla 1 enumera las secuencias de ARNip diseñadas para orientarse a la hebra codificante de 3' NTR. Las secuencias se expresan como la hebra codificante (5' \rightarrow 3'). La referencia de secuencia designa la correspondiente región de la cepa 1b de HCV (nº de acceso a GenBank AJ238799).

Tabla 1

Referencia de secuencia	Referencia de la figura 1	SEQ ID NO	Secuencia
9382-9402	12	SEQ ID NO:1	GCTAAACACTCCAGGCCAATA
9502-9522	22	SEQ ID NO:2	TCCTTTGGTGGCTCCATCTTA
9512-9532	32	SEQ ID NO:3	GCTCCATCTTAGCCCTAGTCA
9518-9538	42	SEQ ID NO:4	TCTTAGCCCTAGTCACGGCTA
9525-9545	52	SEQ ID NO:5	CCTAGTCACGGCTAGCTGTGA
9526-9546	62	SEQ ID NO:6	CTAGTCACGGCTAGCTGTGAA
9552-9572	72	SEQ ID NO:7	CGTGAGCCGCTTGACTGCAGA
9577-9597	82	SEQ ID NO:8	GCTGATACTGGCCTCTCTGCA
9579-9599	92	SEQ ID NO:9	TGATACTGGCCTCTCTGCAGA
9583-9603	102	SEQ ID NO:10	ACTGGCCTCTCTGCAGATCAA

Ejemplo 2 (orientación a hebra anticodificante)

[0088] Se efectuó el ejemplo 2 como se describe en el ejemplo 1, excepto porque se usaron los ARNip R1-R8 en las transfecciones. El ensayo de transferencia Western efectuado aquí era como se describe en el ejemplo 1. El ARNip de núcleo de HCV de control usado como control positivo es el ARNip descrito en el ejemplo 1 de HCV previo. Todos los ARNip evaluados se cartografiaban en 3' UTR del genoma de HCV y están conservados entre los genotipos y cuasiespecies de HCV.

[0089] La Fig. 2 es una transferencia Western que muestra los niveles de proteína NS5A de HCV a (izquierda a

derecha) 0, 9 y 20 pmol de los ARNip identificados, y a 0, 3 y 9 pmol del ARNip de control positivo de núcleo. Los ARNip R1 (SEQ ID NO:23), R2 (SEQ ID NO:22), R3 (SEQ ID NO:21), R5 (SEQ ID NO:19) y R7 (SEQ ID NO:17) exhibieron todos una inhibición significativa de HCV. Adicionalmente, los ARNip de SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO: 15 eran también eficaces para orientarse específicamente a la hebra no codificante (datos no mostrados). La Tabla 2 enumera las secuencias de los ARNip usados en el ejemplo 2. Las secuencias se expresan como la hebra codificante (5' →3'). La referencia de secuencia designa la correspondiente región de la cepa 1b de HCV (nº de acceso a GenBank AJ238799).

Tabla 2

Referencia de secuencia	Referencia de la figura 2	SEQ ID NO	Secuencia
9509-9529	-	SEQ ID NO:11	GTGGCTCCATCTTAGCCCTAG
9520-9540	-	SEQ ID NO:12	TTAGCCCTAGTCACGGCTAGC
9534-9554	-	SEQ ID NO:13	GGCTAGCTGTGAAAGGTCCGT
9560-9580	-	SEQ ID NO:14	GCTTGACTGCAGAGAGTGCTG
9581-9601	-	SEQ ID NO:15	ATACTGGCCTCTCTGCAGATC
9506-9526	R8	SEQ ID NO:16	TTGGTGGCTCCATCTTAGCCC
9514-9534	R7	SEQ ID NO:17	TCCATCTTAGCCCTAGTCACG
9520-9540	R6	SEQ ID NO:18	TTAGCCCTAGTCACGGCTAGC
9537-9557	R5	SEQ ID NO:19	TAGCTGTGAAAGGTCCGTGAG
9544-9563	R4	SEQ ID NO:20	GAAAGGTCCGTGAGCCGCTT
9554-9574	R3	SEQ ID NO:21	TGAGCCGCTTGACTGCAGAGA
9567-9587	R2	SEQ ID NO:22	TGCAGAGAGTGCTGATACTGG
9584-9604	R1	SEQ ID NO:23	CTGGCCTCTCTGCAGATCAAG

- 10 **[0090] Conclusiones:** Los resultados descritos anteriormente en los ejemplos 1 y 2 indican que las hebras de ADN codificantes o no codificantes de un virus de ARN de hebra codificante pueden orientarse intencionadamente diseñando apropiadamente los ARNip efectores. En los ejemplos presentados aquí, la orientación a la hebra no codificante fue, en general, un procedimiento muy eficaz de regulación por disminución de la expresión de proteína vírica. Además, los ARNbc diseñados para orientarse a la hebra no codificante es más probable que sean activos.
- 15 De un total de 12 ARNip orientados a la hebra no codificante, 10 de los ARNip demostraron una reducción de la expresión de proteína vírica, mientras que de los 13 ARNip orientados a la hebra codificante (de los cuales se muestran los resultados de 9 en la Figura 1), solo 2 ARNip eran eficaces para la reducción de la expresión de proteína. Este resultado demuestra que este enfoque de diseño de ARNip, que considera al ARN intermedio replicativo vírico (hebra no codificante) como un sustrato viable para ARNi distinto de su contrapartida de hebra
- 20 codificante más abundante, tiene ventajas superiores en la selección de agentes antivíricos potentes.

Ejemplo 3

(Vector plasmídico de ADN que expresa 4 ARNhc orientados a la hebra no codificante de HCV)

- 25 **[0091]** En este ejemplo, se generan intracelularmente las secuencias de ARNip dadas como R1, R2, R5 y R7 en la Figura 2 mediante la expresión de un vector plasmídico transfectado en la célula; el vector se prepara clonando oligonucleótidos que codifican las cuatro formas de horquilla corta (ARNhc) de los ARNip, cada una bajo el control de un promotor de ARN polimerasa III diferente en un solo vector (concretamente, cuatro promotores de ARN
- 30 polimerasa III ligado operativamente cada uno con una secuencia que codifica uno de los cuatro ARNhc). En estos transcritos de ARNhc, se une la hebra efectora a la hebra de complemento efector mediante una secuencia de "bucle" de 9 bases (AGAGAACUU).

- [0092]** Usando técnicas de ADN recombinante estándares, se selecciona un plásmido que contiene un marcador
- 35 de selección por antibiótico y un origen de replicación bacterianos como punto de partida para la inserción de las combinaciones de promotor/ARNhc específicas a continuación. Se prepara el plásmido combinando en primer lugar un fragmento de aproximadamente 1 kb (que contiene el origen de replicación bacteriano, entre el gen de resistencia a ampicilina y el sitio de clonación múltiple) del vector pUC18 ampliamente disponible (Yanisch-Perron y col., Gene, 114: 81 (1985)) con un gen de resistencia a kanamicina quimérico como se da a conocer en la patente de EE.UU. nº
- 40 5.851.804. Puede usarse una variedad de vectores plasmídicos disponibles comercialmente de suministradores tales como Invitrogen, Clontech, Stratagene y otros como fuente alternativa de elementos vectoriales, o para sustituir el vector de los solicitantes para uso como material de partida para producir variantes funcionalmente equivalentes de los vectores descritos a continuación. Los procedimientos usados para ensamblar el vector a partir de secuencias fuente incluyen digestión con enzima de restricción, electroforesis en gel, PCR (reacción en cadena de la

polimerasa), secuenciación de ADN, ligamiento enzimático y "clonación por reacción en cadena", como se describe en la patente de EE.UU. nº 6.143.527, "Chain reaction cloning using a bridging oligonucleotide and DNA ligase", Pachuk y col., y otros procedimientos comunes y bien conocidos por los especialistas en la materia.

5 **[0093]** Es conveniente preparar construcciones de vector de promotor de pol III individual antes de generar construcciones de promotores múltiples. Se genera un vector de ARN pol III básico de promotor individual para expresar un solo ARN de horquilla corta (ARNhc) mediante la unión enzimática del fragmento de restricción del origen de replicación (ori) por encima del gen de resistencia a la kanamicina quimérico, y entonces con el módulo de expresión de promotor de pol III/ARNhc deseado en etapas secuenciales. Los módulos de expresión de
10 promotor/ARNhc se preparan uniendo el promotor con fragmentos cortos (de aproximadamente 50 a 60 pb) que comprenden la secuencia de ARNhc de interés, preparada como oligonucleótidos sintéticos bicatenarios por pedido especial a un vendedor comercial. El fin de construir vectores de promotor individual como precursores de vectores de múltiples promotores expresa varios aspectos beneficiosos: en primer lugar, permite la confirmación funcional de cada par de promotor/ARNhc en ausencia de los demás elementos de expresión de pol III o ARNhc que podrían
15 confundir al medio de detección del par de elementos promotor/ARNhc en cuestión. En segundo lugar, permite la secuenciación del ADN de todo o parte de cada módulo usando cebadores de secuenciación que de otro modo tendrían múltiples sitios de asociación en múltiples vectores promotores, y volverían la secuenciación imposible en ese contexto. En tercer lugar, los módulos de promotor individual pueden movilizarse eficazmente para clonación en cualquier número de vectores de promotores múltiples incipientes mediante el diseño intencionado de pares de sitios
20 de restricción de clonación que sean únicos para cada elemento promotor.

[0094] Después de la determinación de los niveles de expresión adecuados y de los efectos del silenciamiento génico de los vectores de promotor individual, se construyen los vectores de promotores múltiples a partir de los módulos de vector de promotor individual de promotor/ARNhc por etapas para contener 4 promotores de pol III,
25 controlando cada uno la expresión de un ARNhc diferente. Por tanto, se modifica una construcción de promotor individual eficaz que expresa un ARNhc para añadir un segundo módulo de promotor/ARNhc. La disposición del segundo módulo respecto al primer módulo se elige empíricamente generando varias formas alternativas de dos promotores del plásmido de dos promotores (variando las posiciones relativas del primer y segundo módulo con respecto a los demás elementos del vector, y variando la orientación de cada módulo con respecto a la dirección de
30 transcripción). Se apreciará por un especialista en la materia que, cuando se intentan combinar dos módulos para expresión óptima en un solo vector, la posición alrededor del vector circular, así como la direccionalidad transcripcional "inversa" o "directa" del módulo puede variarse para producir 8 variedades diferentes, conteniendo todas los mismos elementos. Además, cuando se intenta la expresión de dos elementos de ARNhc diferentes de dos promotores diferentes en este vector, las diferentes combinaciones de secuencia de ARNhc con cada uno de los dos
35 promotores producirían 16 variantes diferentes de dicho vector, conteniendo de nuevo todas los mismos elementos pero en diferentes disposiciones. Los solicitantes han observado que estas diferentes configuraciones pueden dar como resultado una variación significativa de los niveles aparentes de expresión de cada ARNhc. No obstante, las construcciones de promotores de polimerasa III múltiples como se describen aquí y en las solicitudes provisionales de EE.UU. 60/362260 y 60/629942, presentadas el 23 de agosto de 2004 y el 22 de noviembre de 2004,
40 respectivamente, y en el documento PCT/2005/29976, presentado el 23 de agosto de 2005, titulado "Multiple RNA Polymerase III Promoter Expression Constructs", demostrarán que puede conseguirse una selección eficaz de configuraciones relativamente optimizadas de estos elementos con el fin de expresar los ARN efectores múltiples (particularmente ARNhc) para efectos de silenciamiento génico sin experimentación indebida.

45 **[0095]** Se prefieren los promotores de polimerasa III de tipo 3 (tipo U6), incluyendo U6, H1 y 7SK, etc. (por ejemplo, humanos, de murino, bovinos o de otras formas de mamífero), para la expresión de las moléculas efectoras ARNhc de la invención. En este ejemplo, los módulos de promotor U6 y 7SK/ARNhc están dispuestos adyacentes entre sí en el sitio de clonación múltiple del vector, mientras que se usa un sitio de clonación distal (adyacente al gen de resistencia a kanamicina) para una tercera y cuarta secuencia promotora (una segunda copia del promotor U6, el
50 promotor 7SK o el promotor H1). El extremo 5' de cada elemento de ARNhc se une al extremo 3' de cada promotor usando un sitio de restricción conveniente, por ejemplo, Sal I o HindIII, modificado por ingeniería genética introduciendo 6 nt entre el extremo 3' del promotor y el inicio de la secuencia de ARNhc. Cada módulo promotor contiene una extensión de 5 restos de timidina en el extremo 3' que sirve como terminador de la transcripción. Por tanto, el transcrito predicho que incluye la horquilla de ARNhc contiene realmente secuencias 5' y 3' adicionales: una
55 secuencia líder 5' constituida por 6 bases (por ejemplo, Sal I o HindIII u otra secuencia de reconocimiento elegida), seguida por las secuencias de horquilla de ARNhc, seguidas por un tramo de U 3' terminal corto, habitualmente dos (1, 2, 3 ó 4) restos de U incorporados durante la terminación de la transcripción. La elección de un sitio Sal I o HindIII es una cuestión de conveniencia, y se reconocerá que podría utilizarse en cambio cualquiera de una serie de otros sitios de restricción, preferiblemente 6 u 8 cortadores, en cuyo caso el transcrito de horquilla de ARNhc incluirá una

secuencia líder 5' diferente. El principio de clonación de un segmento de ADN que codifica un ARNhc para la expresión de un solo promotor está también bien ilustrado en los vectores de clonación y manuales de instrucciones disponibles comercialmente en Ambion, Inc. (Austin, Tejas, EE.UU.).

- 5 **[0096]** Se producen entonces los vectores de expresión completados en bacterias *E. coli* según procedimientos estándares, y se transfectan en células huh7 que contienen replicones de HCV como en los ejemplos previos. Puede demostrarse que el vector expresa los 4 ARNhc orientados a la hebra no codificante de HCV, y puede mostrarse usando transferencia Northern, PCR o análisis de protección de nucleasa de ARN celular que la hebra no codificante del virus se reduce un 20% o más respecto a las células transfectadas con un vector de control que contiene 10 permutaciones altamente mutadas de las secuencias de ARNhc.

Ejemplo 4

- 15 **[0097]** Vector plasmídico de ADN que expresa múltiples ARNhc, incluyendo ARNhc orientados a secuencias conservadas tanto de hebra no codificante (hebra antígenómica) como de hebra codificante (hebra genómica) de 3' UTR de HCV.

- 20 **[0098]** En este ejemplo, se siguen los procedimientos y procesos del ejemplo 3, con la excepción de que solo dos de las secuencias de ARNhc orientadas a la hebra no codificante (por ejemplo, dos cualesquiera seleccionadas de las SEQ ID NO: 23 o 22 o 19 o 17 de la Tabla 2) se incluyen en el vector de expresión (por ejemplo, R1 y R2, o R5 y R7, etc.) y los otros dos módulos de expresión se usan para incluir los ARNhc correspondientes a sequitopos orientados a la hebra codificante (en este caso, orientados ambos a una secuencia conservada de la hebra codificante de 3' UTR de HCV o región "X"), por ejemplo, SEQ ID NO:7, y un ARNbc basado en el ARNip número 122 (SEQ ID NO:59). Las secuencias que codifican los ARNhc seleccionados se clonan en el vector de expresión 25 plasmídico, ligado operativamente cada uno a un promotor de polimerasa III, que puede ser igual o diferente, por ejemplo, U6, 7SK, H1, etc.

Ejemplo 5

- 30 **[0099]** Vector plasmídico de ADN que expresa múltiples ARNhc, incluyendo ARNhc que se orientan a secuencias conservadas de ambas UTR 5' y 3' de ambas hebras no codificante (hebra antígenómica) y codificante (genómica) de HCV.

- 35 **[0100]** En este ejemplo, se siguen los procedimientos y procesos del ejemplo 3, con la excepción de que las secuencias que codifican los ARNhc orientados tanto a 3' UTR de la hebra codificante de HCV como a 3' UTR de la hebra no codificante de HCV (por ejemplo, las SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:59, y una secuencia seleccionada, por ejemplo, de las SEQ ID NO: 23 o 22 o 19 o 17), se clonan en el vector de expresión y, además, se seleccionan secuencias conservadas que codifican ARNhc orientados tanto a 5' UTR de la hebra codificante de HCV (por ejemplo, las SEQ. ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 38, 40, 42, 45, 47 o 49) como a 5' UTR de la hebra no codificante 40 de HCV (SEQ. ID NO: 25, 27, 29, 39, 41, 46, 48, 50 o 52) y se clonan en el vector de expresión, por ejemplo, cada una ligada operativamente con un promotor de polimerasa III, que puede ser igual o diferente, por ejemplo, U6, 7SK, H1, etc.

LISTA DE SECUENCIAS

45

[0101]

- <110> Nucleonics, Inc.
- <120> Orientación a intermedios de replicación de hebra no codificante de virus monocatenarios por ARNi
- <130> 26788-023
- 50 <160> 59
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 21
- <212> ADN
- 55 <213> Artificial
- <220>
- <223> Nucleótidos 9382-9402 de 3' NTR de HCV
- <400> 1

gctaaacact ccaggccaat a 21

<210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Nucleótidos 9502-9522 de 3' NTR de HCV
 <400> 2
 tcctttggtg gctccatctt a 21
 <210> 3
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Nucleótidos 9512-9532 de 3' NTR de HCV
 15 <400> 3
 gctccatctt agccctagtc a 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Nucleótidos 9518-9538 de 3' NTR de HCV
 <400> 4
 tcttagccct agtcaaggct a 21
 25 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Nucleótidos 9525-9545 de 3' NTR de HCV
 <400> 5
 cctagtcaag gctagctgtg a 21
 <210> 6
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Nucleótidos 9526-9546 de 3' NTR de HCV
 <400> 6
 ctagtcaagg ctagctgtga a 21
 40 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Nucleótidos 9552-9572 de 3' NTR de HCV
 <400> 7
 cgtgagcgc ttgactgcag a 21
 <210> 8
 50 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Nucleótidos 9577-9597 de 3' NTR de HCV
 55 <400> 8
 gctgatacg gctctctgc a 21

<210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Nucleótidos 9579-9599 de 3' NTR de HCV
 <400> 9
 tgatactggc cctctgcag a 21
 <210> 10
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Nucleótidos 9583-9603 de 3' NTR de HCV
 15 <400> 10
 actggcctct cgcagatca a 21
 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Nucleótidos 9509-9529 de 3' NTR de HCV
 <400> 11
 gtggctccat cttagcccta g 21
 25 <210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Nucleótidos 9520-9540 de 3' NTR de HCV
 <400> 12
 ttagccctag tcaaggctag c 21
 <210> 13
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Nucleótidos 9534-9554 de 3' NTR de HCV
 <400> 13
 40 ggctagctgt gaaaggtcog t 21
 <210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Nucleótidos 9560-9580 de 3' NTR de HCV
 <400> 14
 gcttgactgc agagagtgc t g 21
 <210> 15
 50 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Nucleótidos 9581-9601 de 3' NTR de HCV
 55 <400> 15
 atactggcct cctgcagat c 21
 <210> 16

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> Nucleótidos 9506-9526 de 3' NTR de HCV
 <400> 16
 ttggtggctc catcttagcc c 21
 <210> 17
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Nucleótidos 9514-9534 de 3' NTR de HCV
 <400> 17
 15 tccatcttag ccttagtca c g 21
 <210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Nucleótidos 9520-9540 de 3' NTR de HCV
 <400> 18
 ttagccctag tcaaggctag c 21
 <210> 19
 25 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Nucleótidos 9537-9557 de 3' NTR de HCV
 30 <400> 19
 tagctgtgaa aggtcogtga g 21
 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Nucleótidos 9544-9563 de 3' NTR de HCV
 <400> 20
 gaaaggtcog tgagcogctt 20
 40 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> Nucleótidos 9554-9574 de 3' NTR de HCV
 <400> 21
 tgagcogctt gactgcagag a 21
 <210> 22
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Nucleótidos 9567-9587 de 3' NTR de HCV
 <400> 22
 55 tgcagagagt gctgatactg g 21
 <210> 23

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> Nucleótidos 9584-9604 de 3' NTR de HCV
 <400> 23
 ctggcctctc tgcagatcaa g 21
 <210> 24
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Región 1 de hebra codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 24
 cctgtgagga actactgtct t 21
 15 <210> 25
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Región 1 de hebra no codificante de ARNip de 5' NTR de HCV
 <400> 25
 atcactcccc tgtgaggaac t 21
 25 <210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Región 1 de hebra codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 30 <400> 26
 aagcagaaag cgtctagcca t 21
 <210> 27
 <211> 21
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Región 1 de hebra no codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 27
 ttcaagcaga aagcgtctag c 21
 40 <210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> Región 1 de hebra codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 28
 cgtctagcca tggcgttagt a 21
 <210> 29
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Región 1 de hebra no codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 29
 55 tagccatggc gttagtatga g 21
 <210> 30
 <211> 21

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Región 1 de hebra codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 5 <400> 30
 gtctagccat ggogttagta t 21
 <210> 31
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Región 1 de hebra no codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 31
 atcactcccc tctgaggaac tactg 25
 15 <210> 32
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Región 1 de hebra codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 32
 ctccccctgtg aggaactact gtctt 25
 <210> 33
 <211> 27
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Región 1 de hebra no codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 33
 30 atcactcccc tctgaggaac tactgtc 27
 <210> 34
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Región 1 de hebra codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 34
 gaggaactac tctctcaog cagaa 25
 <210> 35
 40 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Región 1 de hebra no codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 45 <400> 35
 aactactgtc tcaogcaga aagog 25
 <210> 36
 <211> 27
 <212> ADN
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> Región 1 de hebra codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 36
 gtgaggaact actgtctca ogcagaa 27
 55 <210> 37
 <211> 27
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> Región 1 de hebra no codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 37
 5 aactactgtc ttcacgcaga aagcgtc 27
 <210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Región 2 de hebra codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 38
 gagccatagt ggtcggga a 21
 <210> 39
 15 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Región 2 de hebra no codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 20 <400> 39
 atagtgtct ggggaaccgg t 21
 <210> 40
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Región 2 de hebra codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 40
 gaaccggtga gtacaccgga a 21
 30 <210> 41
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Región 2 de hebra no codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 41
 tagtggctc ggggaaccgg g 21
 <210> 42
 <211> 21
 40 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Región 2 de hebra codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 42
 45 accggtgagt acaccggaat t 21
 <210> 43
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Región 2 de hebra no codificante de ARNip de 5' UTR de HCV minus strand region 2
 <400> 43
 aaccggtgag tacaaccgga ttgcc 25
 <210> 44
 55 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Región 2 de hebra codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 44
 gggagagcca tagtggtdg cggaa 25
 5 <210> 45
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Región 5 de hebra codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 45
 ggccctgtgg tactgctga t 21
 <210> 46
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Región 5 de hebra no codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 46
 20 aaaggcctg tggtactg cct 21
 <210> 47
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Región 5 de hebra codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 47
 gccctgtgt actgctgat a 21
 <210> 48
 30 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Región 5 de hebra no codificante de ARNip de 5' UTR de HBV
 35 <400> 48
 aaggcctgt ggtactg cct g 21
 <210> 49
 <211> 21
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> Región 5 de hebra codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 49
 gtactgctg atagggtgct t 21
 45 <210> 50
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Región 5 de hebra no codificante de ARNip de 5' NTR de HCV
 <400> 50
 ttgtgtact gctgatagg g 21
 <210> 51
 <211> 27
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

<223> Región 5 de hebra codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 51
 aaggccttgt ggtactgcct gataggg 27
 <210> 52
 5 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Región 5 de hebra no codificante de ARNip de 5' NTR de HCV
 10 <400> 52
 tactgcctga tagggtgctt g 21
 <210> 53
 <211> 27
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Región 5 de hebra codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 53
 cgaaaggcct tgtggtactg cctgata 27
 20 <210> 54
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Región 5 de hebra no codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 54
 ttgtgtacl gcctgatagg gtgcttg 27
 <210> 55
 <211> 27
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Región 5 de hebra codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 55
 35 ctgcgagtg cccgggagg tctcgta 27
 <210> 56
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Región 5 de hebra no codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 56
 tactgcctga tagggtgctt gcgag 25
 <210> 57
 45 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Región 5 de hebra no codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 50 <400> 57
 tagggtgctt gcgagtgccc cggg 24
 <210> 58
 <211> 27
 <212> ADN
 55 <213> Artificial
 <220>

<223> Región 5 de hebra no codificante de ARNip de 5' UTR de HCV
 <400> 58
 ttgogagtgc cccgggaggt ctgtag 27
 <210> 59
 5 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de la región conservada de 3' UTR de HCV
 10 <400> 59
 ggtggctcca tcttagccct a 21

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de una molécula efectora de ARN bicatenaria adecuada para uso en la inhibición de la replicación de un virus de la hepatitis C (HCV), o una construcción de expresión que exprese dicha molécula, comprendiendo dicho procedimiento:
- seleccionar la región del intermedio de replicación de hebra no codificante correspondiente a la región 3' no traducida conservada de dicho virus HCV como diana;
 - diseñar una molécula efectora de ARN bicatenaria para orientarse selectivamente a dicha región del intermedio de replicación de hebra no codificante, comprendiendo dicha molécula efectora de ARNbc una hebra efectora que tiene una secuencia de al menos 19 nucleótidos contiguos de un complemento inverso de dicha región del intermedio de replicación de hebra no codificante; y
 - producir dicha molécula efectora de ARNbc o una construcción de expresión que exprese dicha molécula.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa b) comprende diseñar una molécula efectora de ARNbc de modo que la hebra efectora se asocie preferiblemente con el complejo RISC en comparación con el complemento efector.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa b) comprende predecir la termoestabilidad relativa del ARN bicatenario en el extremo 5' y 3' de la hebra efectora, y seleccionar una molécula efectora de ARNbc si el extremo 5' de la hebra efectora está presente en una cadena doble con menor estabilidad que su extremo 3'.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la secuencia efectora es de aproximadamente 19 a aproximadamente 27 nucleótidos de longitud.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha construcción de expresión comprende además uno o más promotores seleccionados de un promotor de ARN polimerasa II y un promotor de ARN polimerasa III, en el que dichos uno o más promotores se disponen en la construcción para controlar la expresión de dichas moléculas efectoras de ARNbc.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicha construcción de expresión comprende al menos dos promotores de ARN polimerasa III diferentes.
7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicha construcción de expresión comprende al menos tres promotores de ARN polimerasa III, en el que dichos al menos tres promotores de ARN polimerasa III pueden ser iguales o diferentes.
8. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicha construcción de expresión comprende al menos dos moléculas efectoras de ARNbc diferentes.
9. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que al menos una de las una o más moléculas efectoras de ARNbc es una construcción de horquilla bc.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicha horquilla bc se selecciona de una horquilla bc de un tallo, una horquilla bc de dos dedos y una horquilla bc de múltiples dedos.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha secuencia efectora tiene una A o U en posición 1 del extremo 5' de dicho complemento inverso.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además formular dicha molécula efectora de ARNbc o construcción de expresión como una composición terapéutica.
13. Procedimiento *in vitro* de inhibición de la replicación de un virus de ARN monocatenario que ha infectado una célula de vertebrado, que comprende producir una molécula efectora de ARNbc o un vector de expresión según un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y administrar dicha molécula efectora de ARNbc o vector a dicha célula de vertebrado.

Fig. 1

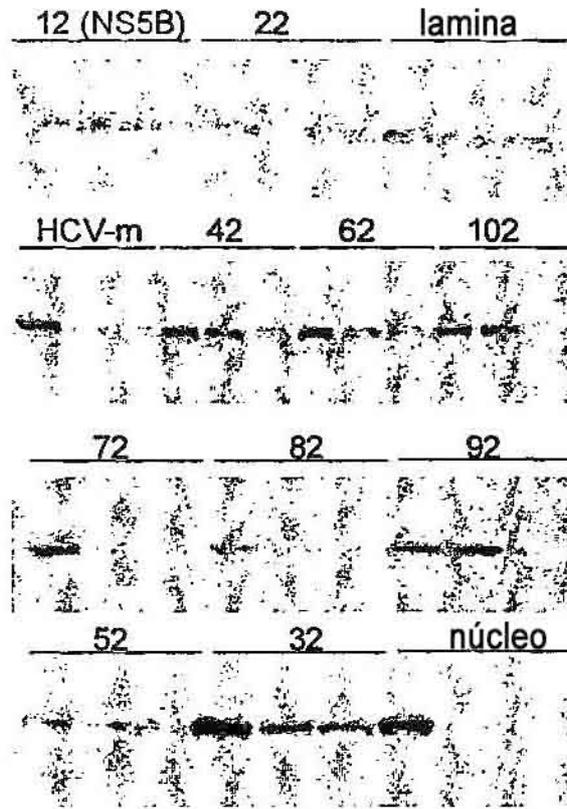


Fig. 2

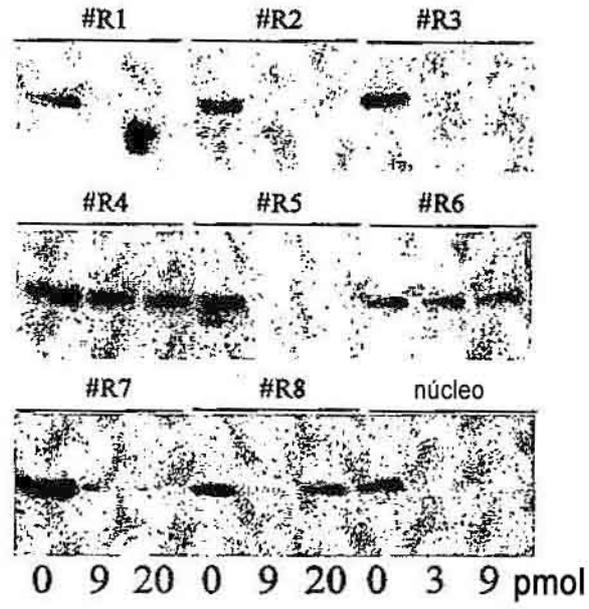


Fig. 3

