

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 982**

51 Int. Cl.:
C07H 21/04 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07718885 .2**
96 Fecha de presentación: **11.05.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2018395**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.01.2009**

54 Título: **ÁCIDOS RIBONUCLEICOS PEQUEÑOS DE INTERFERENCIA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES ALÉRGICAS.**

30 Prioridad:
11.05.2006 AU 2006902491

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.01.2012

73 Titular/es:
**WHOLESOME BIOPHARMA PTY LTD
26 WALLACE AVENUE
TOORAK, VIC 3142, AU**

72 Inventor/es:
**CHIANG, Bor-Luen y
HUANG, Chung-Sheng**

74 Agente: **Vázquez Fernández-Villa, Concepción**

ES 2 372 982 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

Ácidos ribonucleicos pequeños de interferencia para el tratamiento de enfermedades alérgicas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a tratamientos de enfermedades alérgicas. Más particularmente, la presente invención proporciona compuestos, procedimientos y composiciones para el tratamiento de enfermedades alérgicas mediante la supresión de la expresión de los genes relacionados con la inflamación de las vías respiratorias a través de interferencias mediadas por ARN.

Antecedentes de la invención

10 El aumento de la prevalencia de las enfermedades alérgicas se ha apreciado en los países más desarrollados y en desarrollo. Las enfermedades alérgicas se definen como alteraciones funcionales causadas por hipersensibilidad de tipo I, es decir, respuesta inmune de tipo I mediada por anticuerpos IgE. Los síntomas incluyen polinosis, asma bronquial, rinitis alérgica, sinusitis, síndrome de distrés respiratorio, dermatitis atópica y choque anafiláctico. Actualmente, las enfermedades alérgicas tienden a ser más graves en las sociedades civilizadas y tienen un gran coste. Entre la gente que padece diversos síntomas alérgicos, la rinitis alérgica es la forma de alergia más común. Además, el ataque de alérgenos a veces puede ser mortal. De acuerdo con datos estadísticos de 1994 realizados por el Departamento de Pediatría del Colegio Médico de la Universidad Nacional de Taiwán, la tasa de prevalencia de la rinitis alérgica entre los estudiantes de la ciudad de Taipei (Taiwán) está sobre el 33%, aproximadamente 3 veces mayor que la del asma (10~11%). El número de pacientes también aumenta cada año. En particular, los pacientes niños pequeños son los que más rápido aumentan. Por lo tanto muchos investigadores se están dedicando a desarrollar una solución mejorada para reducir la carga económica y física del paciente de dichas enfermedades alérgicas.

25 En los últimos años, con el uso emergente de la tecnología de silenciación del gen post-transcripcional, en particular, la interferencia de ARN (ARNi), como una herramienta para eliminar la expresión de genes específicos en una diversidad de organismos (Mello y Conte, "Revealing the world of RNA interference", (2004) Nature 431, 338-342; y Scherer y Rossi, "Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA", (2003) Nature Biotechnology, 21, 1457-1465), actualmente es posible mapear las interacciones de proteínas en rutas de señalización celular mediante la silenciación sistemática de genes funcionales, y proporcionar de esta manera una nueva manera de desarrollar terapias para innumerables enfermedades. Los presentes inventores han realizado extensas investigaciones clínicas y experimentos y han identificado moléculas de ARN pequeñas no codificantes que son capaces de suprimir la expresión del gen relacionado con la inflamación de las vías respiratorias *in vitro* o *in vivo* a través de la interferencia de ARN, por lo tanto, estas moléculas de ARN pequeñas identificadas son útiles como medicamento para el tratamiento de la alergia con el fin de aliviar o minimizar la inflamación de las vías respiratorias de un sujeto.

Resumen

35 El objeto de esta invención es proporcionar compuestos, composiciones y procedimientos para suprimir la expresión del gen relacionado con la inflamación de las vías respiratorias usando moléculas de ARN pequeñas de interferencia (ARNsi). En particular, esta invención presenta moléculas de ácido ribonucleico pequeñas, tales como, moléculas de ARN pequeñas de interferencia de doble hebra o de una sola hebra; y procedimientos para suprimir la expresión de los genes relacionados con la inflamación de las vías respiratorias usando estas moléculas de ARNsi.

40 Por lo tanto, esta invención presenta una molécula de ARNsi de acuerdo con la reivindicación 1, un vector de expresión adecuado para expresar la molécula de ARNsi de acuerdo con la reivindicación 4 y un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8. La realizaciones preferidas son materia objeto de las reivindicaciones dependientes.

45 En una realización, la invención proporciona una molécula de ARNsi de doble hebra aislada que dirige la escisión de ARN gata-3 a través de la interferencia de ARN (ARNi), en la que (a) cada hebra de dicha molécula de ARNsi es de aproximadamente 19 a 21 nucleótidos de longitud; y (b) una hebra de dicha molécula de ARNsi comprende una secuencia de ribonucleótidos complementaria a dicho ARN gata-3 para dirigir la escisión del ARN gata-3 a través de la interferencia de ARN. En una realización, la molécula de ARNsi aislada de esta invención es de origen humano, que comprende una secuencia de ribonucleótidos complementaria a una secuencia de ARN codificada por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 32 a 45, en la que la SEQ ID NO: 32 representa las secuencias de ribonucleótidos del gen gata-3 en las posiciones 1080-1100.

50 En una realización, la invención presenta una molécula de ARNsi aislada que tiene actividad ARNi contra una ARN gata-3. La molécula de ARNsi es capaz de mediar la interferencia de ARN (ARNi) que da como resultado la escisión del ARN gata-3 *in vitro* o *in vivo*. En otra realización, una molécula de ARNsi aislada de esta invención es de origen humano. La molécula de ARNsi humana de esta invención comprende una secuencia que es al menos idéntica al 80% al ARNsi17.

55 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de la alergia, tal como polinosis, asma bronquial, sinusitis, síndrome de distrés respiratorio o rinitis alérgica mediante la supresión de la expresión del gen relacionado con la inflamación de las vías respiratorias, tal como la expresión del gen gata-3, usando

moléculas de ácido nucleico pequeñas de interferencia.

En una realización, la invención presenta una composición farmacéutica que comprende una molécula de ARNsi de la invención en un transportador farmacéuticamente aceptable.

5 En una realización, la invención proporciona un vector de expresión de al menos una molécula de ARNsi de esta invención, que contiene una porción de un gen diana de interés, de manera que permite la expresión de las moléculas de ARNsi para suprimir o contrarrestar la expresión del gen diana *in vitro* o *in vivo* a través de la interferencia de ARN (ARNi). El gen diana es un gen relacionado con la inflamación de las vías respiratorias, tal como el gen gata-3.

10 Estos y otros aspectos y ventajas serán evidentes cuando la Descripción se lea junto con los Ejemplos adjuntos. Se entenderá que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son ejemplos, y pretenden proporcionar una explicación adicional de la invención que se reivindica. Los ejemplos pueden comprender la materia objeto que no está incluida por las reivindicaciones adjuntas y se proporciona únicamente con fines de ilustración. El alcance de la protección se define por las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

15 Los dibujos adjuntos se incluyen para proporcionar un entendimiento adicional de la invención, y se incorporan en y constituyen una parte de esta memoria descriptiva. Los dibujos ilustran realizaciones de la invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

La fig. 1 son los dibujos esquemáticos de ARNsi gata-3 murinos en un plásmido pSEC hydro y un vector basado en lentivirus, en los que (A) es un diagrama esquemático del casete de expresión de ARNsi; (B) es un diagrama esquemático del plásmido pSEC hydro, que contiene un sitio de selección de hidromicina para seleccionar un clon estable que exprese los ARNsi; y (C) es un diagrama esquemático del vector de lentivirus que expresa ARNsi.

20

La fig. 2 ilustra la reducción de la expresión del gen gata-3 y la liberación de citocinas Th2 después de la transducción de los ARNsi gata-3 en células EL-4 que se trataron con una combinación de PMA (5 ng/ml) y cAMP (500 mM) durante 24 h, la detección del gen gata-3 expresado y las proteínas se confirmó por (A) PCR en tiempo real y (B) transferencia de western, respectivamente; y (C) la liberación de citocinas Th2 se detectó mediante ensayo ELISA sándwich. En la figura, "Simulado" se refiere al control de transducción simulada contenido en el control de ARNsi negativo de Ambion; "PTYenlazador" se refiere a un vector vacío. a** p<0,01, en comparación con el grupo de control sin tratamiento previo; b** p<0,01, en comparación con el grupo de control de PMA 5 ng/ml + cAMP 500 mM; c** p<0,01, en comparación con el grupo simulado (Mock) de PMA 5 ng/ml + cAMP 500 mM; d** P<0,01, en comparación con el grupo PTYenlazador de PMA 5 ng/ml + cAMP 500 mM.

25

30

La fig. 3 ilustra la línea cronológica del protocolo de OVA usado de acuerdo con una realización preferida de esta invención para establecer el modelo murino de asma.

La fig. 4 son los diagramas de barras que muestran el nivel de anticuerpos específicos del suero de OVA, incluyendo (A) IgE, (B) IgG1 y (C) IgG_{2a} en ratones BALB/c tratados con ARNsi gata-3 de acuerdo con una realización de esta invención.

35

La fig. 5 ilustra el nivel de eotaxina en fluido BAL de ratones del Ejemplo 3.2 según se midió mediante el ensayo ELISA.

La fig. 6 ilustra los perfiles celulares en el BALF recogido de los ratones de acuerdo con una realización de esta invención. El recuento total de células se determinó en 1 ml de HBSS, y los datos se expresaron como la media ± SEM, a** p<0,01, a*** p<0,001 en comparación con el grupo de solución salina.

40

La fig. 7 ilustra la supresión de la sensibilidad de las vías respiratorias inducida por Mch mediante ARNsi gata-3 en ratones sensibilizados a OVA de acuerdo con una realización preferida de esta invención. La AHR se midió por pletismografía de cuerpo entero, y los datos se expresaron como la media ± SEM de los valores Penh en la relación de los valores Penh después de la nebulización de PBS de 3 experimentos independientes. *P<0,05, ***P<0,001 en comparación con el grupo negativo, a*** p<0,001, en comparación con los grupos positivos respectivos, b*** p<0,001, en comparación con los grupos simulados respectivos.

45

La fig. 8 ilustra la reducción de la expresión de IL-5 después de la transducción de ARNsi de IL-5 en células EL-4 que se trataron con una combinación de PMA (5 ng/ml) y cAMP (500 mM) durante 24 h, la detección del IL-5 expresado se confirmó por ELISA. En la figura, "EL4" se refiere a las células EL-4 tratadas con PMA y cAMP; "SNeg" se refiere a las células EL-4 transfectadas con pSECNeg que contenía un fragmento de ARNsi no relacionado con ningún gen de los ratones; "S1, S4 y S7" se refiere a las células EL-4 transfectadas con vectores que contenían ARNsi4, ARNsi5 y ARNsi6, respectivamente.

50

55

- La fig. 9 ilustra el nivel expresado de eotaxina en (A) el medio de cultivo o (B) las células transfectadas con el ANsi de eotaxina sintetizada, incluyendo ARNsi7, ARNsi8 y ARNsi9 de acuerdo con una realización preferida de esta invención.
- 5 La fig. 10 ilustra la supresión de la sensibilidad de las vías respiratorias inducida por Mch mediante ARNsi de IL-5 y/o ARNsi de eotaxina en ratones sensibilizados con OVA de acuerdo con una realización preferida de esta invención. La AHR se midió por pletismografía de cuerpo entero.
- 10 La fig. 11 ilustra los perfiles celulares que incluyen (A) monocitos, (B) neutrófilos, (C) linfocitos, y (D) eosinófilos en BALF recogido de los ratones de acuerdo con una realización de esta invención. El recuento total de células se determinó en 1 ml de HBSS, y los datos se expresaron como la media (SEM, * p<0,01, en comparación con el grupo de solución salina.
- La fig. 12 ilustra el nivel de (A) IL-5 y (B) eotaxina en fluido BAL de ratones del Ejemplo 4 según se midió por ELISA.
- 15 La fig. 13 son los diagramas de barras que muestran el nivel de anticuerpos específicos del suero OVA, incluyendo (A) IgE, (B) IgG1 t (C) IgG2a en ratones BALB/c tratados con IL-5 y/o ARNsi de eotaxina de acuerdo con una realización de esta invención.
- 20 La fig. 14 ilustra la supresión de la sensibilidad de las vías respiratorias inducida por Mch mediante una dosis alta, media o baja de ARNsi5 en ratones sensibilizados con OVA de acuerdo con una realización preferida de esta invención. La AHR se midió mediante pletismografía de cuerpo entero. En la figura, "S4 Bajo" se refiere a animales tratados con una dosis baja de ARNsi5 (3 x 105 UFI/ratón), "S4 Med" se refiere a animales tratados con una dosis media de ARNsi5 (1,5 x 106 UFI/ratón) y "S4 Alto" se refiere a animales tratados con una dosis alta de ARNsi5 (3 x 106 UFI/ratón); "SNeg" se refiere a animales transfectados con pSECNeg que contenía un fragmento de ARNsi no relacionado con ningún gen de ratón.
- 25 La fig. 15 ilustra los perfiles celulares que incluyen monocitos, linfocitos, basófilos y eosinófilos en BALF recogido de los ratones del Ejemplo 5, que se trataron con una dosificación alta, media o baja de ARNsi5, respectivamente. El recuento total de células se determinó en 1 ml de HBSS, y los datos se expresaron como la media (SEM, *p<0,01, ** p< 0,001, en comparación con el grupo de control.
- 30 La fig. 16 ilustra el nivel de la concentración de eotaxina en fluido BAL de ratones del Ejemplo 5, que se trataron con una dosificación alta, media o baja de ARNsi5, respectivamente. Los datos se expresaron como la media (SEM, *p<0,01, en comparación con el grupo de control.
- La fig. 17 son los diagramas de barras que muestran el nivel de los anticuerpos específicos del suero OVA que incluyen (A) IgE, (B) IgG1 y (C) IgG2a en ratones BALB/c del Ejemplo 5, que se trataron con una dosificación alta, media o baja de ARNsi5, respectivamente.
- 35 La fig. 18 es un dibujo esquemático de un vector de ARNsi humano, en el que un inserto de ADN pequeño que codifica un ARN en horquilla pequeño que se dirige a un gen humano deseado puede clonarse en su vector entre los sitios Mlu I y Xho I, y se usa el promotor H1 para la expresión de ARNsi; este vector también contiene el GPF coral (cGFP) como un gen informador y un gen de resistencia a neomicina.
- 40 La fig. 19 ilustra la eficacia de la transfección de los ARNsi humanos para la eotaxina-1 en células BEAS-2B transfectadas con un vector que contiene (A) nada, (B) ARNsi 22, (C) ARNsi 23 o (D) ARNsi 24 por lipofectamina y se seleccionadas por G418 (500 (g/ml) durante 14 días. La frecuencia de las células transfectadas (GFP+) se analizó por FACS.
- 45 La fig. 20 ilustra la eficacia de supresión de los ARNsi humanos que se dirigen a la eotaxina en células BEAS-2B transfectadas con un vector que contiene nada (V), ARNsi 22 (SE-749-), ARNsi 23 (SE-269), o ARNsi 24 (SE-335), y estimuladas con TNF-(humano (50 ng/ml) e IL-4 humano (50 ng/ml) durante 24 h o 48 h, respectivamente. La expresión de la eotaxina-1 del grupo de control (células BEAS-2B transfectadas con un vector vacío) se tomó como el 100%. *, p<0,01 y **, p<0,001 en comparación con la eotaxina-1 producida por el grupo de control.
- 50 La fig. 21 ilustra las inhibiciones de la expresión génica de gata-3, IL-4 e IL-13 después de la transducción de RNash en células Jurkat. Se cultivaron 5 x 105 células en una placa de 24 pocillos, se transfectaron con ARNsh gata-3, IL-4 o IL-13, se expresó pARNin-H1.2/Retro plásmidos durante 4 h y se trataron con PMA (50 ng/ml) y PHA (1 (g/ml) durante 48 h. Las células se transfirieron a una placa con 24 pocillos, se trataron con PMA (50 ng/ml) y ionomicina (1 (g/ml) durante 24 h, y después se recolectaron las células para la expresión de ARN mediante PCR en tiempo real. *p<0,05 en comparación con los grupos respectivos.

Descripción de la invención

Las realizaciones descritas y la terminología usada en este documento únicamente tienen el fin de describir las realizaciones ejemplares, y no pretenden ser limitantes. El alcance de la presente invención pretende incluir realizaciones adicionales no descritas específicamente en este documento, pero que serán evidentes para un experto en la técnica tras leer la presente descripción y poner en práctica la invención en la medida de lo incluido por las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se refiere a una solución novedosa para el tratamiento de enfermedades alérgicas, tales como polinosis, asma bronquial, rinitis alérgica, sinusitis, síndrome de distrés respiratorio, dermatitis atópica y choque anafiláctico, mediante el uso de ácidos ribonucleicos pequeños de interferencia (ARNsi). El Solicitante demuestra en este documento que los ácidos ribonucleicos pequeños de interferencia aislados con secuencias de ribonucleótidos complementarias a al menos una porción del gen diana de ARN, tales como un ARN del gen relacionado con la inflamación de las vías respiratorias, son capaces de dar como resultado la escisión del gen diana expresado a través del mecanismo de interferencia del ARN.

La interferencia de ARN se refiere al procedimiento de silenciar el gen transcripcional específico en animales mediados por ARN de interferencia pequeños (ARNsi) (Fire y col., "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*" (1998) *Nature* 391, 806-811). El procedimiento de silenciar el gen post-transcripcional se cree que es un mecanismo de defensa celular evolutivamente conservado usado para evitar la expresión de genes extraños (Andrew Fire, "RNA-triggered gene silencing" (1999), *Trends Genet.* 15(9), 358-363). Dicha protección de la expresión de un gen extraño puede estar implicada en la respuesta de la producción de ARN de doble hebra (ARNds) obtenidos a partir de una infección viral o la integración aleatoria de elementos de transposones en un genoma huésped a través de una respuesta celular que destruye específicamente ARN de hebra sencilla homólogo o ARN genómico vírico. La presencia de ARNds en células activa la respuesta de ARNi a través de un mecanismo que todavía no se ha identificado completamente.

La presencia de ARNds en las células da como resultado la activación de la enzima de ribonucleasa denominada como Dicer. Dicer está implicado en el procesamiento de los ARNds en piezas pequeñas de ARNds conocidas como ARN pequeños de interferencia (ARNsi) (Berstein y col., "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference" (2001) *Nature*, 409, 363-366). Los ARN pequeños de interferencia obtenidos a partir de la acción de Dicer normalmente es de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos de longitud y comprende aproximadamente dúplex de 19 pares de bases. La respuesta de ARNi también presenta un complejo de endonucleasa que contiene un ARNsi, denominado comúnmente como un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que media la escisión del ARN de hebra sencilla que tiene una secuencia en homología con respecto al ARNsi. La escisión del ARN diana tiene lugar en el medio de la región complementaria a la secuencia guía del dúplex de ARNsi. Como tal, las moléculas de ARNsi de esta invención pueden usarse para mediar la silenciamiento del gen a través de la interacción con transcritos de ARN o mediante la interacción con secuencias génicas particulares, en las que dicha interacción da como resultado la silenciamiento del gen a nivel transcripcional o a nivel post-transcripcional. Para una revisión general de la técnica de interferencia de ARN, por favor véase Mello y Conte, "Revealing the world of RNA interference", (2004) *Nature* 431, 338-342; y Scherer y Rossi, "Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA", (2003) *Nature Biotechnology*, 21, 1457-1465.

Por lo tanto, en una realización, esta invención proporciona una o más moléculas de ARNsi que independientemente o en combinación suprimen la expresión del gen relacionado con la inflamación de las vías respiratorias de un sujeto a través de la interferencia de ARN, a fin de que la expresión del gen relacionado con la inflamación de las vías respiratorias, tal como el gen *gata-3* se suprima o se retrase, minimizando de esta manera y/o aliviando las respuestas de inflamación del sujeto.

En una realización, la invención proporciona una molécula de ARNsi de doble hebra aislada que dirige la escisión del ARN *gata-3* a través de la interferencia de ARN (ARNi), en la que (a) cada hebra de dicha molécula de ARNsi es de aproximadamente 19 a 21 nucleótidos de longitud; y (b) una hebra de dicha molécula de ARNsi comprende una secuencia de ribonucleótidos complementaria a dicho ARN *gata-3* para dirigir la escisión del ARN *gata-3* a través de la interferencia de ARN.

La molécula de ARNsi aislada de esta invención puede ser de origen humano. Una molécula de ARNsi de origen humano preferida de esta invención comprende una secuencia que es complementaria a un ARN del gen diana, o al menos idéntica al 80% a cualquier ARNsi17 (representado por la SEQ ID NO: 47, respectivamente) preparado de acuerdo con los procedimientos que se han descrito en el Ejemplo 7, dichos ARNsi humanos se codifican mediante una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada entre la SEQ ID NO: 32. Las secuencias de ácido nucleico humanas exactas para la SEQ ID NO: 31 al 45, y las secuencias de ácido ribonucleico para la SEQ ID NO: 46 a 60 se enumeran en la Tabla 2.

Actualmente, hay 5 maneras diferentes de generar ARNsi para estudios de silenciamiento de gen, incluyendo síntesis química, transcripción *in vitro*, digestión de ARNds grandes mediante una enzima de la familia de ARNasa III, expresión en células de un plásmido o un vector viral de expresión de ARNsi, y expresión en células de un casete de expresión de ARNsi obtenido por una reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR). El primero de los tres

procedimientos incluye la preparación *in vitro* de ARNsi que después se introducen directamente mediante lipofección, electroporación u otra técnica. Los dos últimos procedimientos dependen de la introducción de vectores basados en ARN y casetes que expresan ARNsi en las células.

5 Las moléculas de ARNsi se clonaron mediante un casete de expresión de RT-PCR como se describe en los Ejemplos usando una secuencia de gen diana seleccionada como patrón. Como alternativa, pueden obtenerse mediante la síntesis de preparación *in vitro* y/o química que se ha identificado anteriormente mediante protocolos conocidos en la técnica. Después, las moléculas de ARNsi se ponen en un vector apropiado y se administran a una célula para su expresión. Una vez expresadas, las moléculas de ARNsi interactúan con el ARNm diana y generan una respuesta de ARN de interferencia.

10 La molécula de ARNsi de esta invención puede usarse sola, o en combinación con otras terapias, para evitar o tratar enfermedades alérgicas, tales como polinosis, asma bronquial, rinitis alérgica, sinusitis, síndrome de distrés respiratorio, dermatitis atópica o choque anafiláctico. Las moléculas de ARNsi pueden comprender un vehículo de administración, tal como liposomas, para su administración a un sujeto, transportadores y diluyentes, y/o pueden presentarse en formulaciones farmacéuticamente aceptables. Los procedimientos para administrar moléculas de ácidos ribonucleicos son bien conocidos en esta técnica, incluyendo, pero sin limitación, encapsulación en liposomas, intoforesis, o mediante incorporación en otras vesículas, tales como polímeros biodegradables, hidrogel, ciclodextrinas o vectores proteináceos. Para un enfoque más general de la administración de moléculas ácido nucleico, se puede hacer referencia, por ejemplo, a la patente de Estados Unidos N° 6.395.713, su contenido completo se incorpora en este documento por referencia.

20 Por lo tanto, esta invención presenta una composición farmacéutica que comprende uno o más ARNsi en un transportador aceptable. Los ARNsi de esta invención pueden administrarse e introducirse en un sujeto mediante medios convencionales. Cuando se desea usar un mecanismo de administración de liposomas, como se ilustra en los Ejemplos, se prefiere una formulación de liposomas de lipofectamina y se administra en un protocolo convencional.

25 Las moléculas y composiciones de ácido ribonucleico pueden administrarse por vía oral, tópica, parenteral, por inhalación o pulverización en una formulación de dosis unitaria que contiene transportadores, adyuvantes y/o vehículos no tóxicos farmacéuticamente aceptables. La expresión "por vía parenteral" como se usa en este documento incluye técnicas de inyección o infusión percutánea, subcutánea, intravascular, intramuscular o intratecal y similares. Las composiciones diseñadas para su uso oral, tópico, parenteral y/o inhalación pueden prepararse de acuerdo con cualquier procedimiento conocido en la técnica. Preferiblemente, las moléculas de ARNsi se formulan en una formulación de aerosol o pulverización para su uso en un dispositivo de inhalación, tal como un nebulizador, un inhalador de dosis medida o un insuflador, proporcionando una captación local rápida de las moléculas de ácido nucleico en los tejidos de las vías respiratorias.

30 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque puede usarse en la práctica o muestreo cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los que se han descrito en este documento de la presente invención, los procedimientos y materiales preferidos se describen a continuación. Todas las publicaciones mencionadas se incorporan en este documento por referencia. A menos que se indique otra cosa, las técnicas empleadas o contempladas en este documento usan metodologías convencionales bien conocidas por un experto en la técnica. Los materiales, procedimientos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no son limitantes.

35 La forma singular "un", "una", "el" y "la" se usan en este documento para incluir referencias plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. A excepción de los ejemplos funcionales, o cuando se indique otra cosa, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción y así sucesivamente, usados en esta solicitud se entenderá que se modifican en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en esta solicitud son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se cree que pueden obtenerse por la presente invención.

Ejemplos

50 Los siguientes Ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertos aspectos de la presente invención y ayudar a los expertos en la técnica en la práctica de esta invención. Estos Ejemplos no se consideran de ningún modo limitantes del alcance de la invención. Los ejemplos pueden comprender la materia objeto que no se incluye por las reivindicaciones adjuntas y se proporciona únicamente con fines de ilustración. El alcance de la protección se define por las reivindicaciones adjuntas.

Análisis estadístico

55 Todos los valores en este estudio se refieren a la media \pm S.E.M. (error estándar de la media) de al menos tres experimentos separados. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se analizaron con un ANOVA de una vía seguido de Scheffe para una comparación *post hoc* usando un software de SPSS. El nivel mínimo de significancia fue un valor p de $<0,05$.

Construcción de ARNsi Murinos y sus Usos en la Supresión de la Inflamación de las Vías Respiratorias**Ejemplo 1. Producción de Construcciones de ARNsi Murinos Gata-3 y la Transfección de Células EL-4 con los ARNsi Gata-3 Obtenidos**Construcción de ARNsi gata-3 murinos

5 Se seleccionaron tres secuencias diana de gata-3 murino para la preparación de ARNsi gata-3: ARNsi1, usando una secuencia diana en la posición 316-336: GAAGCTCAGTATCCGCTGACG (SEQ ID NO: 1); ARNsi2, usando una secuencia diana en la posición 1733-1753: CCACTGAATCCGGATCCCAT (SEQ ID NO: 2); y ARNsi3, usando una secuencia diana en la posición 1306-1324: GATGTCTAGCAAATCGAAA (SEQ ID NO: 3). El ARNsi de control negativo (kit comercial suministrado por Ambion, Austin, Texas, Estados Unidos) se sintetizó por casetes de expresión de ARNsi obtenidos por PCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Ambion) y después se clonó en plásmido pSEC™ hygro (Ambion). El casete de expresión de ARNsi y la construcción de ARNsi gata-3 murinos en plásmidos pSEC™ hygro se ilustraron en la fig. 1A y 1B, respectivamente.

Transfectar células EL-4 con las Construcciones de ARNsi Gata-3 Murinos Sintéticos

15 Líneas celulares de linfoma de ratón, las células EL-4 (obtenidas en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 4 x 10⁵ células/ml) se mantuvieron y se cultivaron en placas de 6 pocillos y se transfectaron con los plásmidos del Ejemplo 1 el día siguiente con la ayuda de la lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carisbad, CA, Estados Unidos). Específicamente, se dejó que 5 µg de plásmido pSEC™ hygro contenidos en ANsi gata-3 murinos y 9 µl de lipofectamina 2000 formaran complejos en un periodo de 25 min a temperatura ambiente en un medio DMEM libre de antibióticos. Después, se añadieron los complejos a las células EL-4 mantenidas y cultivadas en placas de 6 pocillos y se incubaron durante 24 h más. Para la selección de células con una alta tasa de expresión de ARNsi, se seleccionaron clones estables de células de ARNsi Gata-3 murino expresadas y ARNsi de control negativo mediante el uso de 500 µg/ml de medio que contenía higromicina, y los clones seleccionados se mantuvieron en 250 µg/ml de medio que contenía higromicina. La transfección de ARNsi gata-3 murinos en células EL-4 se confirmó mediante la detección de la expresión del gen gata-3 murino en el nivel de ARN mediante el análisis por RT-PCR o en el nivel de proteínas mediante un ensayo ELSA.

25 RT-PCR EL ARN total de células EL-4 transfectadas con ARNsi gata-3 murinos se aisló usando ARNbee (AMS Biotechnology, Abingdon, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El análisis por RT-PCR se realizó para determinar las cantidades relativas de GATA-3 y β-actina. La transcripción inversa de ARN se realizó en un volumen final de 20 µl. Los tubos de reacción contenían 4 µl de 5 x primer tampón de hebra (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM); 1 µl de una mezcla 10 mM de los 4 desoxinucleótidos; 1 µl de ditiotretitol 0,1 M; y 1 µl de transcriptasa inversa Superscript. El ARN y el agua desionizada en un volumen final de 12 µl se calentaron a 70 °C durante 10 min, y después se enfriaron en hielo. A los tubos de reacción se le añadieron muestras de ARN, se incubaron a 42 °C durante 50 min, se calentaron a 70 °C durante 10 min para desnaturalizar la transcriptasa inversa y después se almacenaron a -20 °C. Las secuencias de cebador de GATA-3 murino son: GAAGGCATCCAGACCCGAAAC de sentido directo (SEQ ID NO: 61), ACCCATGGCGGTGACCATGC de sentido contrario (SEQ ID NO: 62); β-actina murina: AAGGTGTGATGGTGGGAATG de sentido directo (SEQ ID NO: 63), ATGGCTACGTACATGGCTGG de sentido contrario (SEQ ID NO: 64). En la mezcla de reacción de PCR, se añadieron los siguientes componentes: 0,5 µl de dNTP 2,5 µM; 2,5 µl de cebador de sentido directo y cebador de sentido contrario; 2,5 µl de tapón PCR 10 x, 1 µl de ADNc; 0,1 µl de Taq polimerasa; y 15,9 µl de agua desionizada. Después de una incubación inicial a 94 °C durante 3 min, estos cebadores se amplificaron en ciclos como se indica a continuación: (1) 94 °C durante 30 s; (2) 56 °C durante 45 s; (3) 72 °C durante 40 s para β-actina; y (1) 94 °C durante 1 min; (2) 62 °C durante 1 min; (3) 72 °C durante 1 min para GATA-3, y por último 72 °C durante 10 min.

45 Después de la amplificación, los productos de PCR se sometieron a electroforesis, que se realizó durante 0,5 h a 100 voltios en gel agarosa al 2% preparada en tampón TBE (Tri-Borato 80 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0). Después de la electroforesis, los geles se tiñeron con 0,1 µg/ml de bromuro de etidio, se examinaron en luz ultravioleta y se fotografiaron.

50 Ensayo ELISA Las células EL-4 (1 x 10⁷ células/ml) del Ejemplo 1 se lavaron dos veces con una solución salina tamponada con fosfato enfriada con hielo. Después, a cada placa se le añadieron 200 µl de tapón de lisis (Tris-HCl 50 mM, NP-40 al 1%, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonil 1 mM, 1 mg/ml de leupeptina, 1 mg/ml de pepstatina, NaVO₄ 0,5 M, pH 7,4); las células lisadas se rasparon de las placas y después se incubaron en matraces eppendorf durante 30 min a 4 °C. Después, estos matraces eppendorf se centrifugaron a una velocidad de 14.000 rpm a 4 °C durante 20 min, y el sobrenadante de cada matraz eppendorf se recogió. Las alícuotas del sobrenadante recogido se mezclaron con un tampón de muestra de proteínas 4 x (Tris-HCl 31,25 mM, pH 6,8, SDS al 1%, β-mercaptoetanol al 25%, azul de bromofenol al 0,00625%, y glicerol al 50% (v/v)) y se hicieron hervir durante 5 min. Las muestras de proteínas se realizaron en geles SDS-PAGE al 10% y las proteínas de la electroforesis se transfirieron sobre una membrana de PVDF. Después, las membranas se bloquearon con leche al 5% en una solución salina tamponada con Tris que contenía Tween al 0,1% y se incubaron con el anticuerpo primario. Se usó el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano picante, las bandas se detectaron con reactivos de quimioluminiscencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante (PerkinElmer Life Science, Inc. Boston, MA) y después se expusieron a

película de rayos X.

Ejemplo 2. Efectos del ARNi Gata-3 murino sobre la Liberación de Citocinas en las Células EL-4 del Ejemplo 1

El nivel de citocinas secretadas por las células EL-4 del Ejemplo 1 se midió, para confirmar adicionalmente el efecto de las construcciones de ARNsi gata-3 en la expresión génica de citocinas Th2 relacionadas con la inhibición alérgica. Para este fin, después de 3 días desde la infección, las células EL-4 del Ejemplo 1 se estimularon con o sin el tratamiento combinado de forbol-12-miristato 13-acetato (PMA, 5 ng/ml) y cAMP (500 μ M) durante 24 h, después el medio celular se recogió para realizar una medición de la expresión del gen gata-3 y la expresión de la proteína GATA-3 de acuerdo con los procedimientos que se han descrito en el Ejemplo 1, y las liberaciones de citocinas (incluyendo IL-4 e IL-5) se midieron de acuerdo con procedimientos que se describen a continuación.

Medición de las Citocinas El nivel de citocinas se detectó mediante el ensayo ELISA sándwich. En resumen, se añadieron anticuerpos de anticitocinas (anticuerpos anti-IL-4 o anti-IL-5) diluidos con una solución de tampón NaHCO₃ (pH 9,6) a una placa de cultivo de 96 pocillos y se incubaron durante una noche a 4 °C. Al día siguiente, la placa de cultivo se aclaró 3 veces con PBS que contenía BSA al 3% a temperatura ambiente durante un periodo de 1 h. Después, las muestras que se iban a ensayar se añadieron y se hicieron reaccionar a 37 °C durante 2 h o a 4 °C durante una noche. Después de que se completara la reacción, los anticuerpos de anticitocina conjugados con biotina diluidos con PBS que contenía BSA al 1% se añadieron a la placa de cultivo y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora, posteriormente se añadió peroxidasa conjugada con estreptavidina y se hizo reaccionar durante 1 h más. Finalmente, a cada pocillo se le añadieron 0,2 ml de una solución de sustrato de enzimas (4 mg de O-fenilendiamina disuelta en 20 ml de una solución de fosfato-citrato que contenía H₂O₂ al 0,001%), y se dejó en reposo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. Se detectó la absorbancia a 450 nm de cada pocillo y se leyó por un autolector de microplaca. La sensibilidad de este ensayo ELISA sándwich es 15 pg/ml para IL-4, y 20 pg/ml para IL-5, respectivamente.

Los resultados se ilustraron en la fig. 2. Los niveles de tanto el gen gata-3 (fig. 2A) como la proteína GATA-3 (fig. 2B) se inhibieron significativamente en presencia del tratamiento combinado de PMA y cAMP, en comparación con el de control, indicando que el ARNi gata-3 es eficaz para contrarrestar tanto las expresiones del gen dependiente de PMA y el gen dependiente de cAMP como las expresiones de proteínas. Además, tanto los niveles de IL-4 como de IL-5 liberados tras la estimulación del tratamiento combinado de PMA y cAMP también se suprimieron por el ARNi gata-3 a través de la expresión del gen gata-3 (fig. 2C).

Ejemplo 3. Efectos del ARNi Gata-3 en el Modelo Murino de Asma

3.1. Clonación de los ARNsi gata-3 murinos en Vectores de Lentivirus

Los ARNsi gata-3 murinos que incluyen ARNsi1, ARNsi2 y ARNsi3 como se ha descrito en el Ejemplo 1.1, se clonaron en el vector pGEM-T easy (Promega, Madison, WI) mediante clonación TA, y la enzima de restricción digirió los vectores pGEM-T easy que contenían ARNsi en el sitio EcoRI. Los fragmentos de ARNsi con tamaño EcoRI en ambos extremos se clonaron en enlazadores pTY (fig. 1C). Los vectores de lentivirus usados en este experimento fueron el tercer vector auto-inactivado generado (SIV) proporcionado por el Dr. Li-Hua Hwang (Hepatitis Research Center, Hospital Nacional de la Universidad de Taiwán). Los vectores de lentivirus de ARNsi se produjeron mediante la transfección transitoria mediada por fosfato cálcico de células HEK-293T. En resumen, las células HEK-293T se co-transfectaron con las cantidades apropiadas de plásmidos de vector que incluyen la construcción auxiliar, el plásmido envoltorio, el plásmido tat, y el plásmido del vector de lentivirus. Los virus se recogieron de los sobrenadantes de cultivos el día 2 después de la transfección y se concentraron 33 veces mediante ultra-centrifugación. La concentración de vectores víricos diferentes usados para la transducción en EL-4 fue MOI = 1,4.

3.2. Aplicación de Lentivirus de ARNsi Gata-3 en el Modelo Murino de Asma

Modelo Murino de Asma Los ratones BALB/c hembra se adquirieron y se mantuvieron en el Centro de Animales del Colegio de Medicina de la Universidad Nacional de Taiwán (Taiwán, R.O.C.). Los animales se usaron entre las 6 y 10 semanas de edad y se emparejaron por edad en cada experimento. El protocolo de experimentos con animales se aprobó por el Comité de Animales del Colegio de Medicina de la Universidad Nacional de Taiwán (Taiwán, R.O.C.) y se describe brevemente como se indica a continuación. El día 0, los ratones se sensibilizaron mediante una inyección intraperitoneal (i.p.) de 50 μ g de Ovalbúmina (OVA) (Calidad V, Sigma chemical co., St. Louis, MO) emulsificada en 4 mg de hidróxido de aluminio (Alumlmuject; Pierce Chemical, Rockford, IL) en un volumen total de 200 μ l. Todos los ratones se reforzaron con otra inyección de 25 μ g de OVA emulsionada en 4 mg de hidróxido de aluminio el día 14 y el día 28, respectivamente. Los ratones del grupo de control negativo se inyectaron con una solución salina de tampón fosfato (PBS). El día 35, se midió la IgE de OVA en suero de cada animal. Los ARNsi de lentivirus del Ejemplo 3.1 (incluyendo ARNsi1, ARNsi2 y ARNsi3; 2,2 x 10⁶ UFI cada uno) se administraron por vía intratraqueal (i.t.) a animales anestesiados el día 40, seguido por la exposición de OVA (100 μ g) por vía intranasal los días 42 a 44. Se usó un virus simulado (vector de lentivirus de ARNsi de control negativo) o una solución salina normal como control. La 1 x 10⁵ UFP de lentivirus se seleccionó de datos de valoración preliminares (datos no mostrados). Para la inyección intratraqueal, los virus en 50 μ l de solución salina normal se inyectaron con un catéter dotado con 0,61 mm (DI) de tubos de polietileno. La hipersensibilidad de las vías respiratorias (AHR) de cada animal se midió el día 45, y a todos los

ratones se les extrajo sangre y se sacrificaron el día 46 para finalizar el experimento, y las células de pulmón se aislaron para su análisis adicional, que incluía las mediciones de los perfiles celulares y los niveles de citocinas en el fluido de lavado broncoalveolar (BALF). La fig. 3 ilustra la cronología del protocolo que se ha identificado anteriormente usado en este estudio.

5 Mediciones de IgE, IgG1 e IgG_{2a} específicas de OVA Las IgE e IgG1 (indicadoras de la respuesta Th2) e IgG_{2a} específicas de OVA (indicadoras de la respuesta Th1) se midieron mediante ELISA sándwich como se ha descrito previamente (Lee y col., "Construction of single chain interleukin 12 plasmid to treat airway hyperresponsiveness in an animal model of asthma", Human Gene Therapy (2001) 12: 2065-2079). Las placas ELISA se recubrieron con 2 ug/ml de OVA y se incubaron a 4 °C durante una noche. Las placas ELISA se lavaron con PBS que contenía Tween 20 al 10 0,05%, a las placas se les añadió suero diluido (dilución de 10 veces para anticuerpos de IgE específicos de OVA y dilución de 100 veces para la determinación de IgG1 e IgG_{2a} específicos de OVA) y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, se añadieron anticuerpos de anti-IgE, anti-IgG1 y anti-IgG_{2a} conjugados con 15 biotina y la avidina conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma, St. Louis, MI, Estados Unidos). La actividad enzimática se evaluó usando tampón TMB (KPL Gaithersburg, MI, Estados Unidos) como sustrato y se leyó usando un lector de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (MRX-TC; Dynex Technology, Chantilly, VA, Estados Unidos). Las lecturas a 450 nm se convirtieron en nanogramos por mililitro usando los valores obtenidos a partir de las curvas convencionales. Las curvas convencionales se obtuvieron a partir de la dilución de concentraciones conocidas de IgE, IgG1 e IgG_{2a} de ratón purificadas (Pharmingen, San Diego, CA). Los resultados se ilustraron en la fig. 4. Es evidente que se indujeron niveles comparables de todos los anticuerpos específicos de OVA que incluían IgE, IgG1 e IgG_{2a} tras el 20 tratamiento con ARNsi, solos o en combinación, en comparación con los del control positivo.

Medición de Citocinas El nivel de citocinas en BALF recogido de los animales del Ejemplo 3.2 se detectó por ensayo ELISA de acuerdo con procedimientos que se han descrito en el Ejemplo 2. Los resultados se ilustraron en la fig. 5. El nivel de eotaxina en animales que se habían tratado con ANsi2 gata-3 o ANsi gata-3, solo o en combinación, era significativamente inferior que el de los animales del grupo de control positivo (fig. 5).

25 Medición de los Perfiles Celulares en BALF Los perfiles celulares que incluyen macrófagos, eosinófilos, neutrófilos y linfocitos en BALF recogidos de los animales del Ejemplo 3.2 se confirmaron por tinción de Liu (Lee y col., "Administration of IL-12 exerts therapeutic instead of longterm preventive effect on Der p1 allergen-induced animal model of airway inflammation". (1999) Immunology 97: 232-240.), y los resultados se ilustraron en la fig. 6. Los animales que se habían tratado con ARNsi2 gata-3 o ARNsi3 gata-3, solo o en combinación, mostraron un número significativamente 30 reducido de eosinófilos, indicando que los ARNsi del Ejemplo 3.1 habían suprimido con éxito la activación de eosinófilos, que son un indicativo de inflamación.

Medición de AHR La AHR se midió en animales no codificados mediante pletismografía barométrica de cuerpo entero (Buxco, Troy, NY, Estados Unidos). En resumen, los ratones se colocaron en la cámara principal, y las lecturas 35 iniciales se tomaron y se hizo la media durante 3 min. Se nebulizaron PBS o metacolina (MCh) en aerosol a una concentración en aumento (3,125 a 25 mg/ml) a través de una entrada de la cámara principal durante 3 min, y las lecturas se tomaron y se hizo la media durante 3 min después de cada nebulización. Los registros de cada 10 inhalaciones se extrapolaron para definir la respiración en inhalaciones por minuto. La reactividad de las vías respiratorias se expresó como una pausa aumentada (Penh) y los datos se expresaron como la relación de los valores de Penh_{MCh} en comparación con Penh_{PBS} de tres experimentos independientes de acuerdo con procedimientos descritos por Hogan y col., "Aeroallergen-induced eosinophilic inflammation, lung damages and airway hyper-reactivity in mice can occur independently of IL-4 and allergen-specific immunoglobulins", (1997) J. Clin. Invest. 99: 1329-1339.

40 Los resultados se ilustraron en la fig. 7. Se descubrió que la AHR inducida por Mch se redujo significativamente en animales tratados con ARNsi1, ARNsi2 o ARNsi3, en comparación con los animales de control, que confirmó 45 adicionalmente que la inhibición de la expresión del gen IL-5 y eotaxina es eficaz al contrarrestar los síntomas relacionados con la alergia.

Ejemplo 4. Supresión de la Expresión de IL-5 y Eotaxina por ARNi Murino

Las secuencias diana para el ARNi de IL-5 y ARNi de eotaxina se seleccionaron y se sintetizaron de acuerdo con procedimientos similares que se han descrito en el Ejemplo 1. En particular, se seleccionaron tres secuencias diana de IL-5 para la producción de ARNsi murinos de IL-5, incluyendo ARNsi4, usando una secuencia diana en la posición 263-283: AAGAATCAAAGTGTCCGTGGG (SEQ ID NO: 4); ARNsi5, usando una secuencia diana en la posición 636-656: AAGAAATTCCTGTAGCGCAGG (SEQ ID NO: 5); y ARNsi6, usando una secuencia diana en la posición 1166-1186: AATCAGACTGTGCCATGACTG (SEQ ID NO: 6). Se seleccionaron tres secuencias diana de eotaxina y se usaron para la producción de ARNsi murinos de eotaxina, incluyendo ARNsi7, usando una secuencia diana en la posición 134-152: CTTCTGTCTGCTTTATCAT (SEQ ID NO: 7); ARNsi8, usando una secuencia diana en la posición 282-294: GTGGGTCCAGGATGCCACA (SEQ ID NO: 8); y ARNsi9, usando una secuencia diana en la posición 583-595: CACAATGGGACGAGTTAGG (SEQ ID NO: 9).

La supresión de la expresión de IL-5 mediante los ARNsi murinos seleccionados (es decir, ARNsi4, ARNsi5 y ARNsi6) en células EL-3 se detectó por ELISA de acuerdo con los procedimientos que se han descrito en el Ejemplo 2, y el resultado se representa en la fig. 8. La expresión de IL-5 se suprimió significativamente por uno de los ANsi murinos

sintetizados.

De forma análoga, la supresión de la expresión de eotaxina mediante ARNsi (es decir, ARNsi7, ARNsi8 y ARNsi9) se representa en la fig. 9. En resumen, las células de pulmón primarias de ratones BALB/c hembra se prepararon y se cultivaron en placas de 48 pocillos y se incubaron a 37 °C. Después, las células de pulmón cultivadas se transfectaron con vectores que contenían ARNsi de eotaxina, y la eotaxina expresada se detectó por ELISA. Los resultados mostraron que la expresión de eotaxina/IL-4 se inhibieron significativamente por los ARNsi murinos de eotaxina sintetizados seleccionados.

Los ARNsi dirigidos a ARNi de IL-5 y ARNi de eotaxina se clonaron en vectores de lentivirus de acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 3.1, y después se aplicaron al modelo murino de asma del Ejemplo 3.2 de una manera similar, y la AHR, las poblaciones celulares en BALF y los niveles de citocina se midieron de acuerdo con los procedimientos que se han descrito en el Ejemplo 3.2. Los resultados se ilustraron en las figs. 10-13.

La fig. 10 ilustra la hipersensibilidad de las vías respiratorias mediante ARNsi de IL-5/eotaxina. La fig. 11 ilustra las poblaciones celulares que incluyen monocitos (fig. 11A), neutrófilos (fig. 11B), linfocitos (fig. 11C) y eosinófilos (fig. 11D) en BALF recogido de los animales tratados previamente con ARNsi de IL-5/eotaxina. La fig. 12 ilustra la concentración de citocinas que incluye IL-5 (fig. 12A) y eotaxina (fig. 12B) en BALF recogido de los animales tratados previamente con ARNsi de IL-5/eotaxina. La fig. 13 muestra el nivel en suero de anticuerpos específicos de OVA que incluyen IgE, IgG1 e IgG_{2a} en animales tratados previamente con ARNsi de IL-5/eotaxina.

Ejemplo 5. Aislamiento de ARNsi murinos para ARNi de IL-4 e IL-13 y sus Usos en la Supresión de la Inflamación de las Vías Respiratorias

Las secuencias diana para ARNi de IL-4 y ARNi de IL-13 se seleccionaron y se usaron para producir ARNsi de acuerdo con procedimientos similares a que se han descritos en el Ejemplo 1. En particular, se usaron tres secuencias de IL-4 para la producción de ARNsi murinos, incluyendo ARNsi10, usando una secuencia diana en la posición 336-356: AAGCTGCACCATGAATGAGTC (SEQ ID NO: 10); ARNsi11, usando una secuencia diana en la posición 181-201: AACACCACAGAGAGTGAGCTC (SEQ ID NO: 11); y ARNsi1 2, usando una secuencia diana en la posición 47-67: AATGTACCAGGAGCCATATCC (SEQ ID NO: 12). Se sintetizaron tres ARNsi murinos para IL-13, incluyendo ARNsi 3, usando una secuencia diana en la posición 238-258: AATGCCATCTACAGGACCCAG (SEQ ID NO: 13); ARNsi1 4, usando una secuencia diana en la posición 154-174: AACGGCAGCATGGTATGGAGT (SEQ ID NO: 14); y ARNsi1 5, usando una secuencia diana en la posición 100-120: AAGGAGCTTATTGAGGAGCTG (SEQ ID NO: 15).

Los ARNsi murinos aislados de IL-4 y/o IL-13 se ensayaron de formas análogas a las que se ha descrito anteriormente, y los resultados confirmaron que estos ARNsi murinos aislados de IL-4 y/o IL-13 son eficaces en la inhibición de la expresión génica de IL-4 y/o IL-13, así como al contrarrestar los síntomas relacionados con la alergia (resultados no mostrados).

Ejemplo 6. Efectos de la Dosificación de ARNsi murino en la Supresión de la Inflamación de las Vías Respiratorias

El ARNsi murino, particularmente el ARNsi5 (con una secuencia complementaria a la secuencia de ARN codificada por la SEQ ID NO.: 5), se clonó en Lentivirus de acuerdo con los procedimientos del Ejemplo 3.1, y se aplicaron tres dosificaciones, incluyendo una dosis alta (3×10^6 UFI/ratón), media ($1,5 \times 10^6$ UFI/ratón) y baja (3×10^5 UFI/ratón) de los vectores víricos que contenían ARNsi5 al Modelo Murino de Asma del Ejemplo 3.2, respectivamente; y la AHR, las poblaciones celulares en BALF, los niveles de citocina y los niveles de anticuerpos en suero se midieron de acuerdo con los procedimientos que se han descrito en el Ejemplo 3.2. Los resultados se ilustraron en las figs. 14-17.

La fig. 14 ilustra los efectos de la dosificación de ARNsi5 murino en la hipersensibilidad de las vías respiratorias. La fig. 15 ilustra las poblaciones celulares que incluyen monocitos, linfocitos, basófilos y eosinófilos en BALF recogido de los animales tratados previamente con una dosis alta, media y baja de ARNsi5, respectivamente. La fig. 16 ilustra la concentración de eotaxina en BALF recogido de los animales tratados previamente con una dosis alta, media o baja de ARNsi5, respectivamente. La fig. 17 muestra el nivel en suero de anticuerpos específicos de OVA que incluyen IgE, IgG1 e IgG_{2a} en animales tratados previamente con una dosis alta, media o baja de ARNsi5, respectivamente. Los resultados indicaron que todas las dosificaciones seleccionadas de ARNsi5 murino eran eficaces al contrarrestar los síntomas relacionados con la alergia, siendo una dosis media de ARNsi5 la dosificación preferida que expresaba los efectos más significativos.

50 Construcción de ARNsi humanos y sus Usos en la Supresión de la Inflamación de las Vías Respiratorias

Ejemplo 7. Aislamiento de ARNsi humanos

7.1 Construcción de vectores de expresión de ARNsi humanos

Las secuencias diana para el ARNi humano se seleccionaron y se usaron para producir ARNsi de acuerdo con procedimientos similares que se han descrito en el Ejemplo 1, con la excepción de que se clonaron ARNsi humanos en pARNT-H 1.1/Retro (SD1255, GenScript, NJ, Estados Unidos) plásmidos (fig. 18) y estos plásmidos que expresaban

ARNsi humanos se transfectaron en células A549 (una línea celular epitelial basal alveolar humana) o en células BEAS-2B (una línea celular epitelial bronquial humana) mediante lipofectamina (Invitrogen, Gaithersburg, MD), y 48 h después de la transfección, se añadieron G418 (500 µg/ml) durante 14 días para la selección. Por ejemplo, se usaron tres secuencias de IL-5 para producir ARNsi humanos, incluyendo ARNsi19, usando una secuencia diana en la posición 196-216: GGATTCCTGTTCCCTGTACATA (SEQ ID NO: 34); ARNsi20, usando una secuencia diana en la posición 328-348: AGAAATACATTGACGGCCAAA (SEQ ID NO: 35); y ARNsi21, usando una secuencia diana en la posición 457-477: CTGGTTTGTTCAGCCAAAGA (SEQ ID NO: 36). Los ARNsi humanos, incluyendo ARNsi16-30 producidos de esta manera para gata-3, eotaxina, IL-4, IL-5 e IL-13, respectivamente, se proporcionan en la Tabla 2.

7.2 PCR Cuantitativa en Tiempo Real

El ARNm se extrajo de células A549 transfectadas con el vector de expresión del ARNsi seleccionado usando tubos de hibridación GeneStrips™ (BNAture, Inc., CA, Estados Unidos). La síntesis de ADNc se realizó con cebadores hexámeros aleatorios y transcriptasa inversa ARNasa H⁻ superscript™ II. (Invitrogen, Gaithersburg, MD, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El análisis por PCR cuantitativa en tiempo real se realizó en un ciclador ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) usando los ensayos de expresión génica TaqMan de IL-5 humana o eotaxina (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). Todos los niveles de ARNm indicados se normalizaron hasta el nivel de ARNm de GAPDH. Como ejemplo, la eficacia de la transfección de ARNsi humanos para la eotaxina-1, incluyendo ARNsi 22, 23 y 24, en células BEAS-2B se ilustra en la fig. 19.

7.3. La Eficacia Supresora de ARNsi dirigido a eotaxina-1 humana

La línea celular de epitelio bronquial humana transformada en virus BEAS-2B puede secretar eotaxina-1 con la estimulación de TNF-α humano e IL-4 humana. Para investigar la eficacia de la supresión de ARNsi dirigidos a la eotaxina-1 humana, las células BEAS-2B transfectadas con ARNsi se estimularon con TNF-α humano (50 ng/ml) e IL-4 humana (50 ng/ml) durante 24 h y 48 h, respectivamente. La concentración de eotaxina-1 en el sobrenadante se detectó por ELISA. La eficacia de la supresión de ARNsi humanos dirigidos a eotaxina-1 en células BEAS-2B se ilustra en la fig. 20. 24 h después de la estimulación, la producción de eotaxina-1 en células BEAS-2B transfectadas con ARNsi23 se redujo a un nivel bajo del 9 ± 14%, en comparación con la de las células de control (es decir, células BEAS-2B transfectadas con un vector vacío). 48 h después de la estimulación, la producción de eotaxina-1 a partir de células BEAS-2B transfectadas con ARNsi23 o ARNsi24 disminuyó al 29 ± 4% o al 55 ± 3%, respectivamente, en comparación con la del grupo de control.

7.4. La Eficacia Supresora de ARNsi dirigido a gata-3, IL-4 o IL-13 humano

Las células Jurkat se transfectaron con ARNsi humanos construidos de acuerdo con los procedimientos que se han descrito en el Ejemplo 7.1, y la eficacia de supresión de la expresión de los genes gata-3, IL-4 o IL-13 se controló usando PCR en tiempo real de acuerdo con los procedimientos que se han descrito en el Ejemplo 7.2. Los resultados se ilustraron en la fig. 21.

Tabla 1. La secuencia de los genes y ARNsi murinos diana seleccionados

Gen Diana	Posición	Secuencia de Ácido Nucleico (Hebra codificante)	Nº de ARNsi	Secuencia de Ácido Ribonucleico (Hebra codificante)
Gata-3	316-336	GAAGCTCAGTATCCGCTGACG (SEQ ID NO 1)	1	GAAGCUCAGUAUCCGCUGACG (SEQ ID NO 16)
	1733-1753	CCACTGAATCCGGATCCCATT (SEQ ID NO 2)	2	CCACUGAAUCCGGAUCCCAUU (SEQ ID NO 17)
	1306-1324	GATGTCTAGCAAATCGA A (SEQ ID NO 3)	3	GAUGUCUAGCAAUUCGAAA (SEQ ID NO 18)
IL-5	263-283	AAGAATCAAACGTCCGTGGG (SEQ ID NO 4)	4	AAGAAUCAAACUGUCCGUGGG (SEQ ID NO 19)
	636-656	AAGAAATTCCTGTAGCGCAGG (SEQ ID NO 5)	5	AAGAAUUCUGUAGCGCAGG (SEQ ID NO 20)
	1166-1186	AATCAGACTGTGCCATGACTG (SEQ ID NO 6)	6	AAUCAGACUGUGCCAUGACUG (SEQ ID NO 21)
eotaxina	134-152	CTTCCTGCTGCTTTATCAT (SEQ ID NO 7)	7	CUUCCUGCUGCUUUAUCAU (SEQ ID NO 22)

	282-294	GTGGGTCCAGGATGCCACA (SEQ ID NO 8)	8	GUGGGUCCAGGAUGCCACA (SEQ ID NO 23)
	583-595	CACAATGGGACGAGTTAGG (SEQ ID NO 9)	9	CACAAUGGGACGAGUUAGG (SEQ ID NO 24)
IL-4	47-67	AAGCTGCACCATGAATGAGTC (SEQ ID NO 10)	10	AAGCUGCACCAUGAAUGAGUC (SEQ ID NO 25)
	181-201	AACACCACAGAGAGTGAGCTC (SEQ ID NO 11)	11	AACACCACAGAGAGUGAGCUC (SEQ ID NO 26)
	336-356	AATGTACCAGGAGCCATATCC (SEQ ID NO 12)	12	AAUGUACCAGGAGCCAUUCC (SEQ ID NO 27)
IL-3	100-120	AATGCCATCTACAGGACCCAG (SEQ ID NO 13)	13	AAUGCCAUCUACAGGACCCAG (SEQ ID NO 28)
	154-174	AACGGCAGCATGGTATGGAGT (SEQ ID NO 14)	14	AACGGCAGCAUGGUAUGGAGU (SEQ ID NO 29)
	238-258	AAGGAGCTTATTGAGGAGCTG (SEQ ID NO 15)	15	AAGGAGCUUUAUGAGGAGCUG (SEQ ID NO 30)

Tabla 2. La secuencia de los genes y ARNsi humanos diana seleccionados

Gen Diana	Posición	Secuencia de Ácido Nucleico (Hebra codificante)	Nº de ARNsi	Secuencia de Ácido Ribonucleico (Hebra codificante)
Gata-3	537-557	CGAGAAAGAGTGCCTCAAGTA (SEQ ID NO 31)	16	CGAGAAAGAGUGCCUCAAGUA (SEQ ID NO 46)
	1080-1100	CATCCAGACCAGAAACCGAAA (SEQ ID NO 32)	17	CAUCCAGACCAGAAACCGAAA (SEQ ID NO 47)
	185-205	CCTACTACGGAAACTCGGTCA (SEQ ID NO 33)	18	CCUACUACGGAAACUCGGUCA (SEQ ID NO 48)
IL-5	196-216	GGATTCTGTTCTGTACATA (SEQ ID NO 34)	19	GGAUUCCUGUCCUGUACAUA (SEQ ID NO 49)
	328-348	AGAAATACATTGACGGCCAAA (SEQ ID NO 35)	20	AGAAAUACAUIUGACGGCCAAA (SEQ ID NO 50)
	457-477	CTGGTTTGTTCAGCCAAAGA (SEQ ID NO 36)	21	CUGGUUUGUUGCAGCCAAAGA (SEQ ID NO 51)
eotaxina	749-769	TTGTAAAGGTCCTGGCAAAGA (SEQ ID NO 37)	22	UUGUAAAGGUCCUGGCAAAGA (SEQ ID NO 52)
	269-289	TTCAGCGACTAGAGAGCTACA (SEQ ID NO 38)	23	UUCAGCGACUAGAGAGCUACA (SEQ ID NO 53)
	335-355	AGACCAAACCTGGCCAAGGATA (SEQ ID NO 39)	24	AGACCAAACUGGCCAAGGAUA (SEQ ID NO 54)
IL-4	133-153	AAGAACACAACCTGAGAAGGAA (SEQ ID NO 40)	25	AAGAACACAACUGAGAAGGAA (SEQ ID NO 55)
	355-375	AACTTCTTGAAAGGCTAAAG (SEQ ID NO 41)	26	AACUUCUUGGAAAGGCUAAAG (SEQ ID NO 56)
	87-107	CACCTTACAGGAGATCATCAA (SEQ ID NO 42)	27	CACCUACAGGAGAUCAUCA (SEQ ID NO 57)

IL-3	389-409	AGGACCTGCTCTTACATTTAA (SEQ ID NO 43)	28	AGGACCUGCUCUUACAUIIUA (SEQ ID NO 58)
	137-157	TCATTGAGGAGCTGGTCAACA (SEQ ID NO 44)	29	UCAUUGAGGAGCUGGUCAACA (SEQ ID NO 59)
	431-451	AGTTCAACCGAAACTTCGAAA (SEQ ID NO 45)	30	AGUUCAACCGAAACUUCGAAA (SEQ ID NO 60)

Aplicabilidad industrial

5 Ésta es una ventaja de la presente invención que proporciona una solución novedosa para el tratamiento de enfermedades alérgicas mediante el uso de ARNsi especialmente diseñados para contrarrestar la expresión de al menos un gen relacionado con la inflamación de las vías respiratorias, tal como el gen gata-3. Los ARNsi, procedimientos y composiciones de acuerdo con la presente invención pueden aumentar la inmunidad de un huésped para inhibir la inflamación y controlar la alergia, y proporcionar de esta manera tratamiento a un sujeto que padece enfermedades alérgicas, tales como polinosis, asma bronquial, rinitis alérgica, sinusitis, síndrome de distrés respiratorio, dermatitis atópica y choque anafiláctico, minimizando y/o aliviando la inflamación de las vías respiratorias del sujeto.

10 La descripción anterior de diversas realizaciones de la invención se ha presentado con fines de ilustración y descripción. No pretende ser exhaustiva ni limitar la invención a las realizaciones precisas descritas. Son posibles numerosas modificaciones y variaciones a la luz de los contenidos anteriores. Las realizaciones analizadas se eligieron y describieron para proporcionar la mejor ilustración de los principios de la invención y su aplicación práctica para permitir de esta manera a un experto en la técnica utilizar la invención en diversas realizaciones y con diversas modificaciones según sean adecuadas al uso particular contemplado. Todas estas modificaciones y variaciones están dentro del alcance de la invención según se determina por las reivindicaciones adjuntas cuando se interpretan de acuerdo con la extensión a la que tengan derecho de forma justa, legal y equitativa.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> FlySun Development Co. Ltd.
- 20 <120> Ácidos ribonucleicos pequeños de interferencia para el tratamiento de enfermedades alérgicas
- <130> 764990C
- <150> AU 2006902491
- <151> 2006-05-11
- <160> 64
- 25 <170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Mus sp.
- 30 <400> 1
- gaagctcagt atccgctgac g 21
- <210> 2
- <211> 21
- <212> ADN
- 35 <213> Mus sp.
- <400> 2
- ccactgaatc cggatccat t 21
- <210> 3

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 <400> 3
 5 gatgtctagc aaatcgaaa 19
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 10 <400> 4
 aagaatcaaa ctgtccgtgg g 21
 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Mus sp.
 <400> 5
 aagaaattcc thtagcgag g 21
 <210> 6
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 <400> 6
 aatcagactg tgccatgact g 21
 <210> 7
 25 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 <400> 7
 cttcctgctg cttatcat 19
 30 <210> 8
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 <400> 8
 35 gtgggtccag gatgccaca 19
 <210> 9
 <211> 19

<212> ADN
 <213> Mus sp.
 <400> 9
 cacaaatggga cgagttagg 19
 5 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 <400> 10
 10 aagctgcacc atgaatgagt c 21
 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 15 <400> 11
 aacaccacag agagtgagct c 21
 <210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Mus sp.
 <400> 12
 aatgtaccag gagccatc c 21
 <210> 13
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 <400> 13
 aatgcatct acaggacca g 21
 <210> 14
 30 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 <400> 14
 aacggcagca tggatggag t 21
 35 <210> 15
 <211> 21
 <212> ADN

<213> Mus sp.
 <400> 15
 aaggagctta ttgaggagct g 21
 <210> 16
 5 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Mus sp.
 <400> 16
 gaagcucagu auccgcugac g 21
 10 <210> 17
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Mus sp.
 <400> 17
 15 ccacugaauc cggaucccau u 21
 <210> 18
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Mus sp.
 20 <400> 18
 gaugucuagc aaaucgaaa 19
 <210> 19
 <211> 21
 <212> ARN
 25 <213> Mus sp.
 <400> 19
 aagaaucaaa cuguccgugg g 21
 <210> 20
 <211> 21
 30 <212> ARN
 <213> Mus sp.
 <400> 20
 aagaaauucc uguagcgag g 21
 <210> 21
 35 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Mus sp.

	<400> 21	
	aaucagacug ugccaugacu g	21
	<210> 22	
	<211> 19	
5	<212> ARN	
	<213> Mus sp.	
	<400> 22	
	cuuccugcug cuuuaucau	19
	<210> 23	
10	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Mus sp.	
	<400> 23	
	guggguccag gaugccaca	19
15	<210> 24	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Mus sp.	
	<400> 24	
20	cacauggga cgaguuagg	19
	<210> 25	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Mus sp.	
25	<400> 25	
	aagcugcacc augaaugagu c	21
	<210> 26	
	<211> 21	
	<212> ARN	
30	<213> Mus sp.	
	<400> 26	
	aacaccacag agagugagcu c	21
	<210> 27	
	<211> 21	
35	<212> ARN	
	<213> Mus sp.	
	<400> 27	

	aauguaccag gagccauauc c	21
	<210> 28	
	<211> 21	
	<212> ARN	
5	<213> Mus sp.	
	<400> 28	
	aaugccaucu acaggacca g	21
	<210> 29	
	<211> 21	
10	<212> ARN	
	<213> Mus sp.	
	<400> 29	
	aacggcagca ugguauggag u	21
	<210> 30	
15	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Mus sp.	
	<400> 30	
	aaggagcuua uugaggagcu g	21
20	<210> 31	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 31	
25	cgagaaagag tgcctcaagt a	21
	<210> 32	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 32	
	catccagacc agaaaccgaa a	21
	<210> 33	
	<211> 21	
	<212> ADN	
35	<213> Homo sapiens	
	<400> 33	
	cctactacgg aaactcggtc a	21

<210> 34
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 34
 ggattcctgt tcctgtacat a 21
 <210> 35
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 35
 agaaatacat tgacggccaa a 21
 <210> 36
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 36
 ctggtttgtt gcagccaaag a 21
 <210> 37
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 37
 ttgtaaaggt cctggcaaag a 21
 25 <210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 38
 30 ttcagcgact agagagctac a 21
 <210> 39
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 39
 agaccaaact ggccaaggat a 21
 <210> 40

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 40
5 aagaacacaa ctgagaagga a 21
 <210> 41
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
10 <400> 41
 aacttctgg aaaggctaaa g 21
 <210> 42
 <211> 21
 <212> ADN
15 <213> Homo sapiens
 <400> 42
 caccttacag gagatcatca a 21
 <210> 43
 <211> 21
20 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 43
 aggacctgct cttacatta a 21
 <210> 44
25 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 44
 tcattgagga gctgtcaac a 21
30 <210> 45
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 45
35 agttcaaccg aaactcgaa a 21
 <210> 46
 <211> 21

<212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 46
 cgagaaagag ugccucaagu a 21
 5 <210> 47
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 47
 10 cauccagacc agaaaccgaa a 21
 <210> 48
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 48
 ccuacuacgg aaacucgguc a 21
 <210> 49
 <211> 21
 <212> ARN
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 49
 ggauuccugu uccuguacau a 21
 <210> 50
 <211> 21
 25 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 50
 agaaauacau ugacggccaa a 21
 <210> 51
 30 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 51
 cugguuuguu gcagccaaag a 21
 35 <210> 52
 <211> 21
 <212> ARN

<213> Homo sapiens
 <400> 52
 uuguaaaggu ccuggcaaag a 21
 <210> 53
 5 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 53
 uucagcgacu agagagcuac a 21
 10 <210> 54
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 54
 15 agaccaaacu ggccaaggau a 21
 <210> 55
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 55
 aagaacacaa cugagaagga a 21
 <210> 56
 <211> 21
 <212> ARN
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 56
 aacuucuugg aaaggcuaaa g 21
 <210> 57
 <211> 21
 30 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 57
 caccuuacag gagaucauca a 21
 <210> 58
 35 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

<400> 58
 aggaccugcu cuuacauua a 21
 <210> 59
 <211> 21
 5 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 59
 ucauugagga gcugguac a 21
 <210> 60
 10 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 <400> 60
 aguucaaccg aaacuucgaa a 21
 15 <210> 61
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 <400> 61
 20 gaaggcatcc agaccgaaa c 21
 <210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus sp.
 25 <400> 62
 acccatggcg gtgaccatgc 20
 <210> 63
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Mus sp.
 <400> 63
 aaggtgtgat ggtgggaatg 20

ES 2 372 982 T3

<210> 64

<211> 20

<212> ADN

<213> Mus sp.

<400> 64

5 atggctacgt acatggctgg 20

REIVINDICACIONES

1. Un ácido ribonucleico pequeño de interferencia (ARNsi) de doble hebra aislado que dirige la escisión de un ARN del gen gata-3 a través de la interferencia de ARN, en el que (a) cada hebra de dicha molécula de ARNsi es de aproximadamente 19 a 21 ribonucleótidos de longitud; y (b) una hebra de dicha molécula de ARNsi comprende una secuencia de ribonucleótidos complementaria a dicho ARN gata-3 codificado por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 32 o una porción del mismo para dirigir la escisión del ARN gata-3 en la posición 1080-1100 a través de la interferencia de ARN.
2. La molécula de ARNsi de la reivindicación 1, en la que dicha molécula de ARNsi es de origen humano.
3. La molécula de ARNsi de la reivindicación 2, en la que dicha molécula de ARNsi es al menos idéntica al 80% al ARNsi 17 que tiene una secuencia de ácido ribonucleico de la SEQ ID NO: 47.
4. Un vector de expresión adecuado para expresar la molécula de ARNsi de la reivindicación 1 en un sujeto para el tratamiento de la alergia, que comprende un ácido nucleico de la SEQ ID NO: 32 o una porción del mismo que codifica la molécula de ARNsi de la reivindicación 1.
5. El vector de expresión de la reivindicación 4, en el que la alergia es polinosis, asma bronquial, sinusitis, síndrome de distrés respiratorio o rinitis alérgica.
6. El vector de expresión de la reivindicación 4, en el que dicha molécula de ARNsi es de origen humano.
7. El vector de expresión de la reivindicación 6, en el que dicha molécula de ARNsi es al menos idéntica al 80% al ARNsi 17 que tiene una secuencia de ácido ribonucleico de la SEQ ID NO: 47.
8. Un uso del ARNsi de la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la alergia, en el que dicho ARNsi contrarresta la alergia mediante la supresión de la expresión del gen gata-3.
9. El uso de la reivindicación 8, en el que dicha molécula de ARNsi es de origen humano.
10. El uso de la reivindicación 9, en el que dicha molécula de ARNsi es al menos idéntica al 80% al ARNsi 17 que tiene una secuencia de ácido ribonucleico de la SEQ ID NO: 47.

FIG 2
(A)

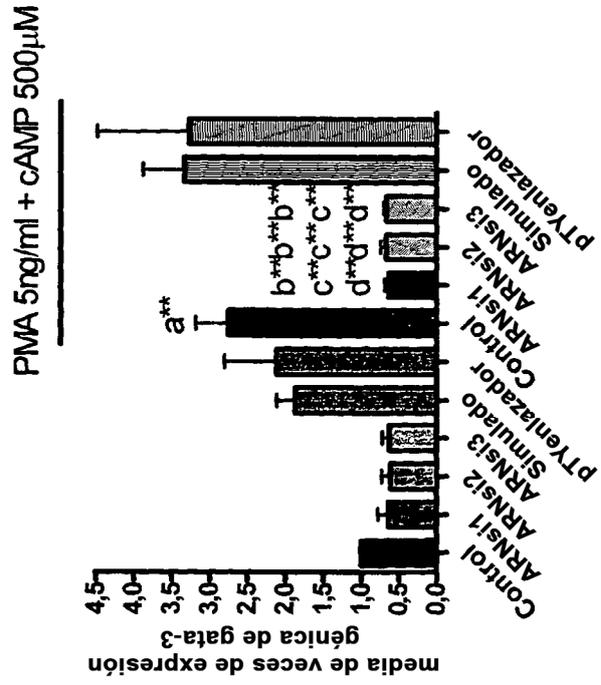


FIG 2

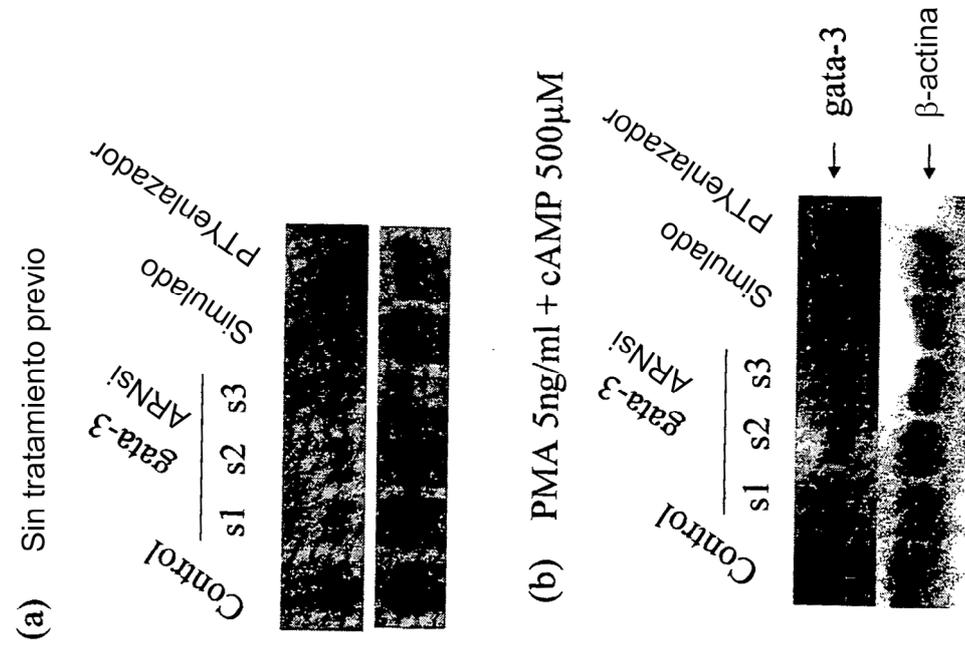


FIG 2
(C)

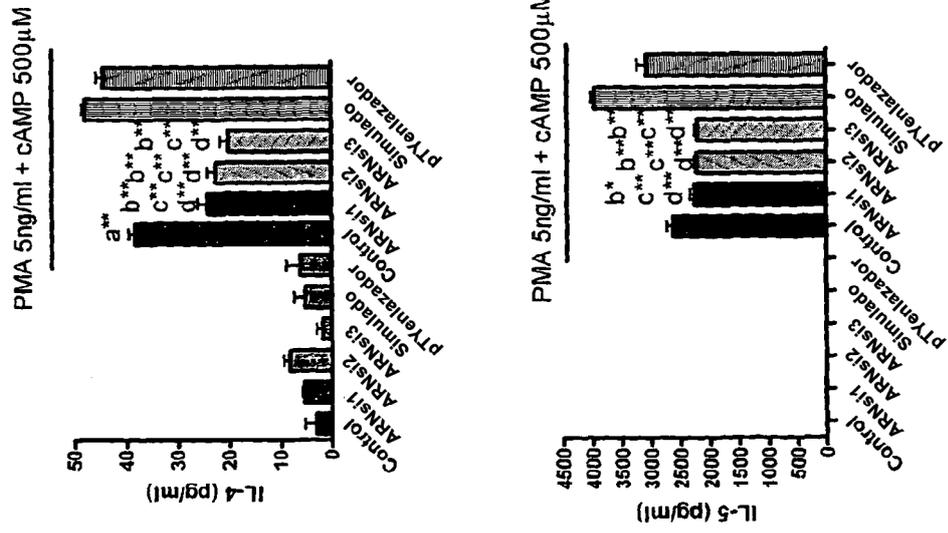
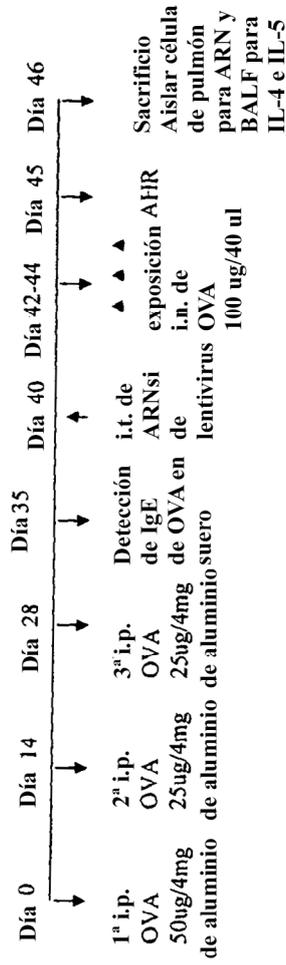


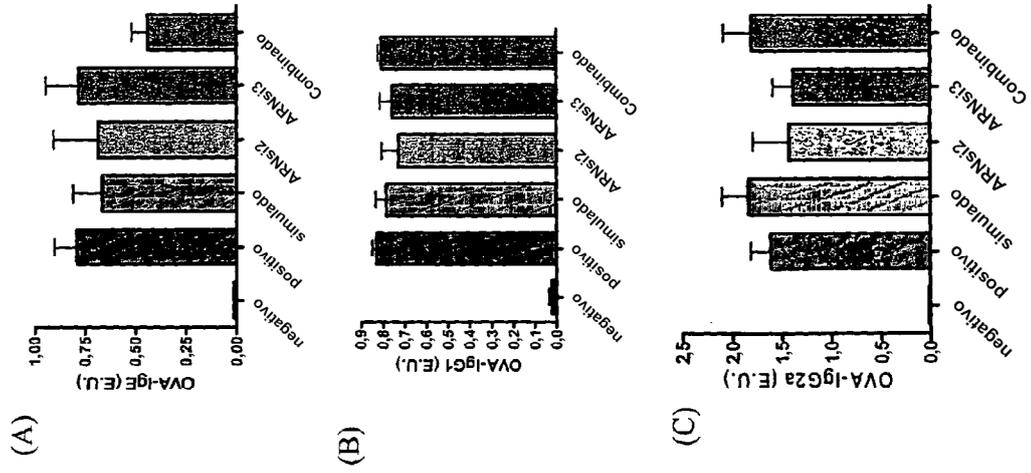
FIG 3



Grupos

- 1) negativo: sólo PBS
- 2) positivo: sólo OVA + aluminio (adyuvante)
- 3) Simulado (2,2 x 106 UFI): vector de lentivirus que contenía un control negativo de ARNsi de Ambion
- 4) ARNsi2 de lentivirus (2.2x10⁶ IFU)
- 5) ARNsi3 de lentivirus (2.2x10⁶ IFU)
- 6) Combinado (ARNsi1 + ARNsi2 + ARNsi3 de lentivirus) (2.2x10⁶ IFU)

FIG 4



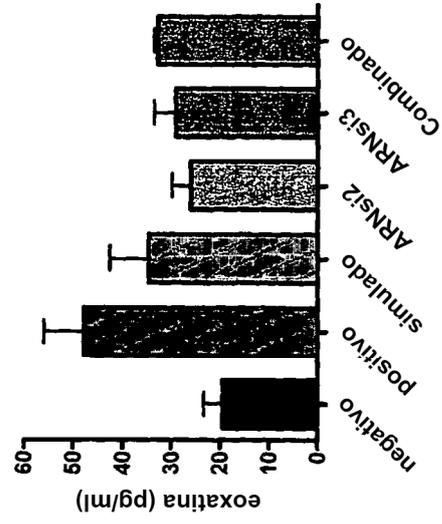


FIG 5

FIG 6

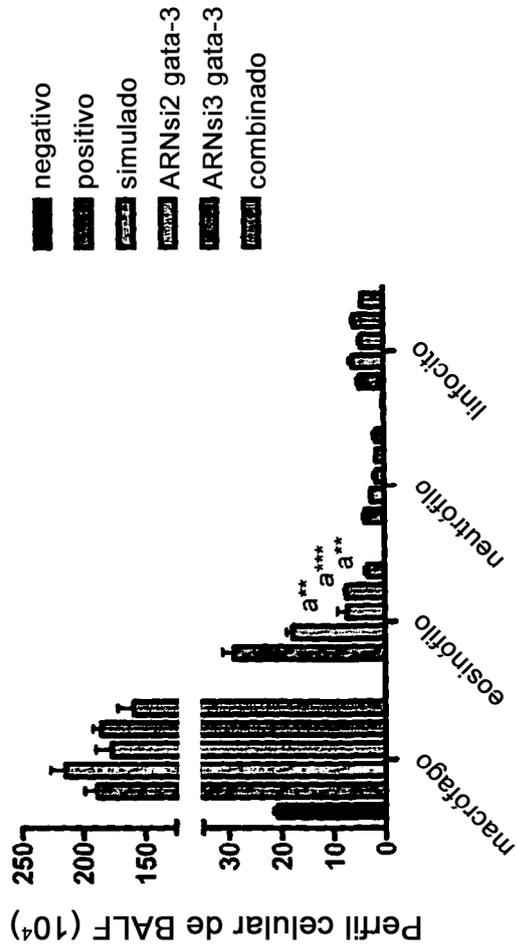
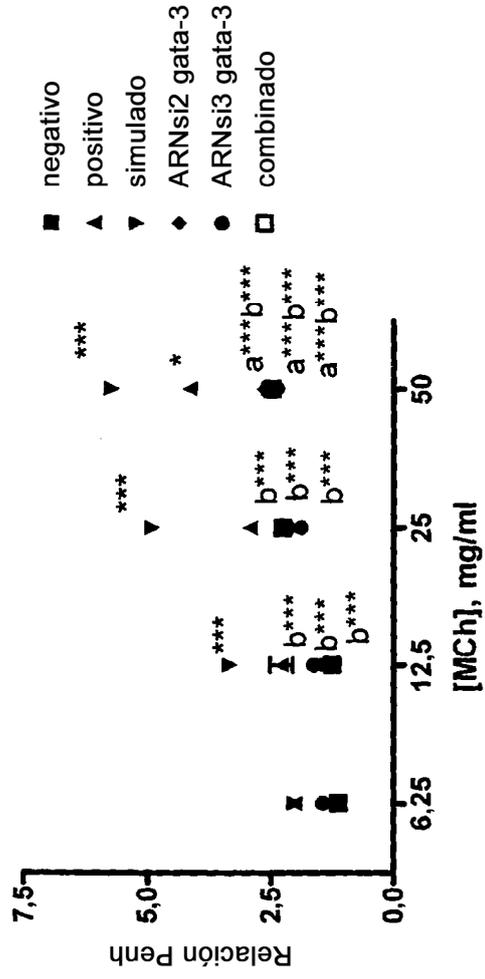


FIG 7



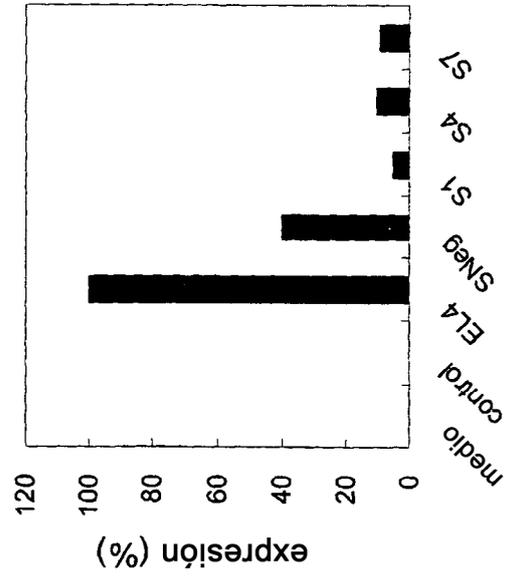


FIG 8

FIG 9

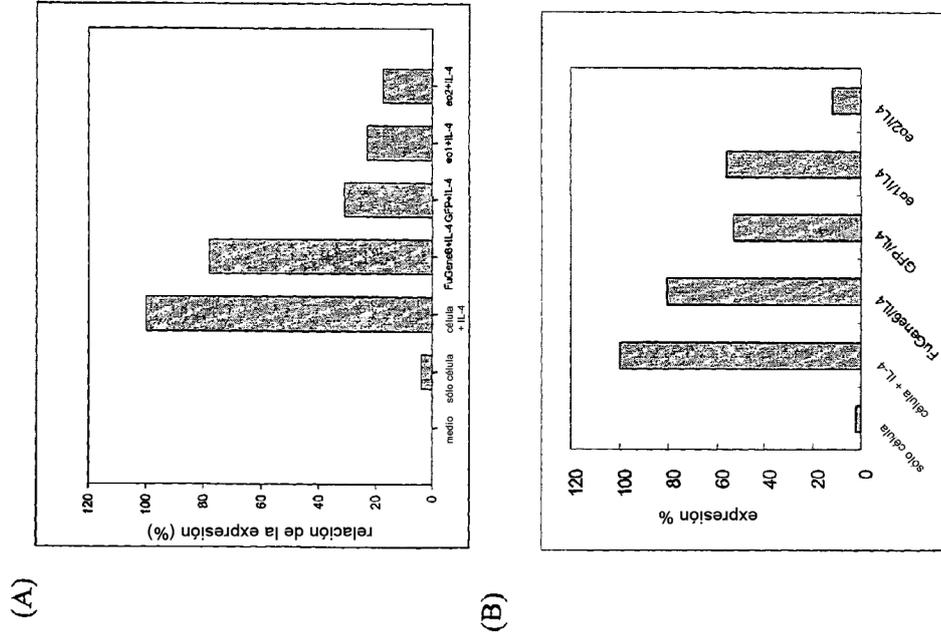


FIG 10

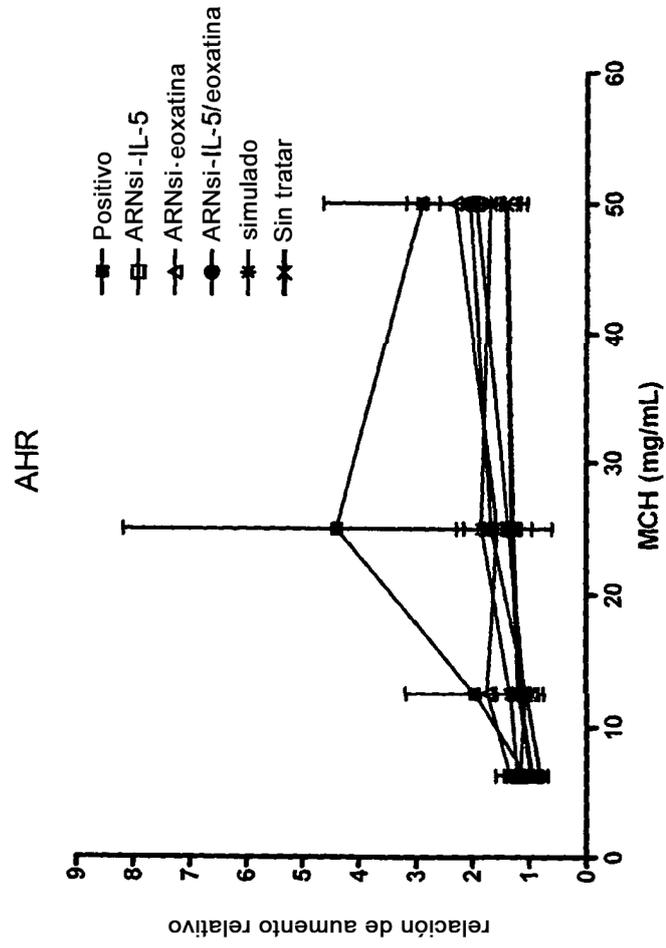
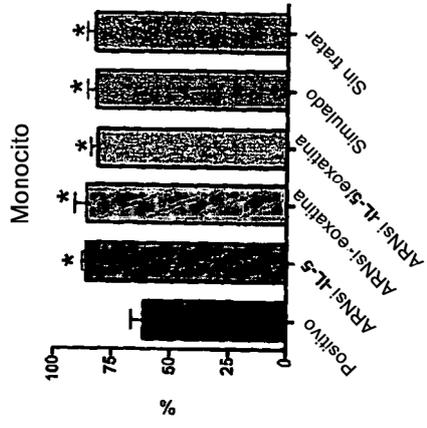


FIG 11

(A)



(B)

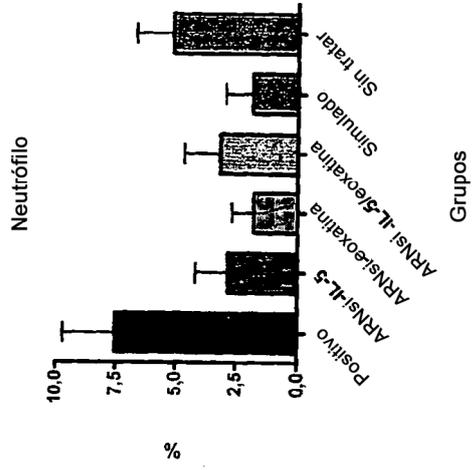


FIG.11

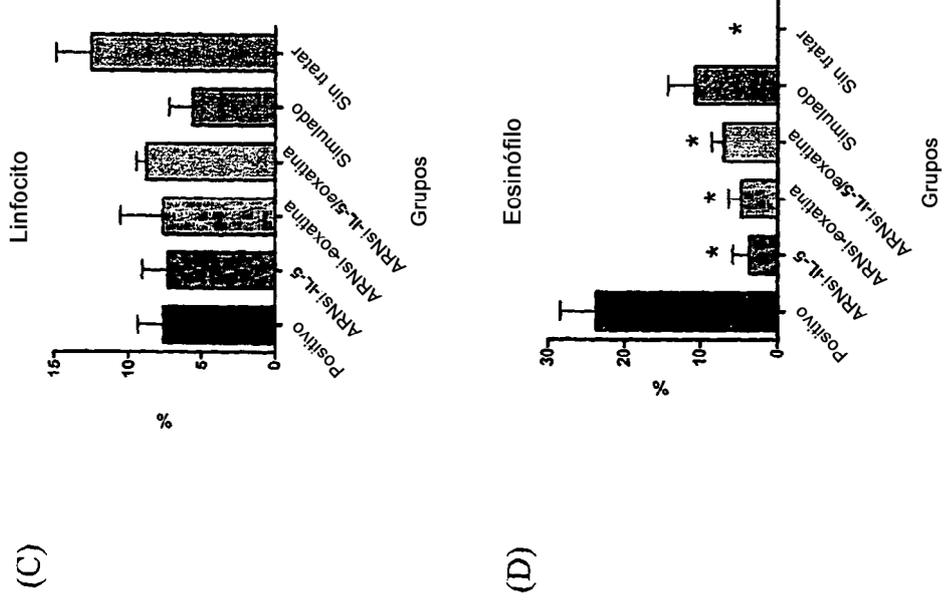


FIG 12

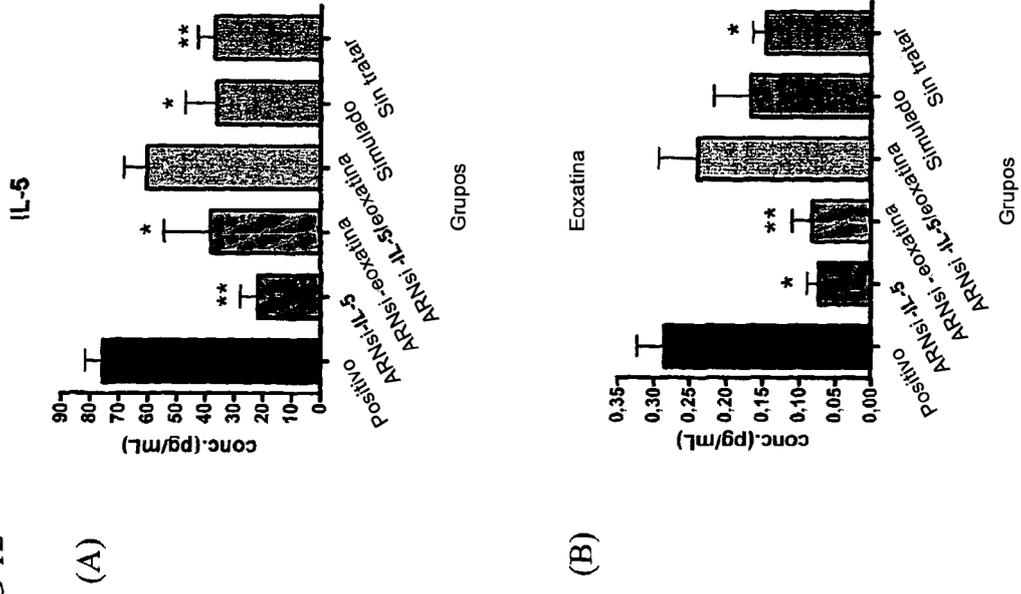


FIG 13
(A)

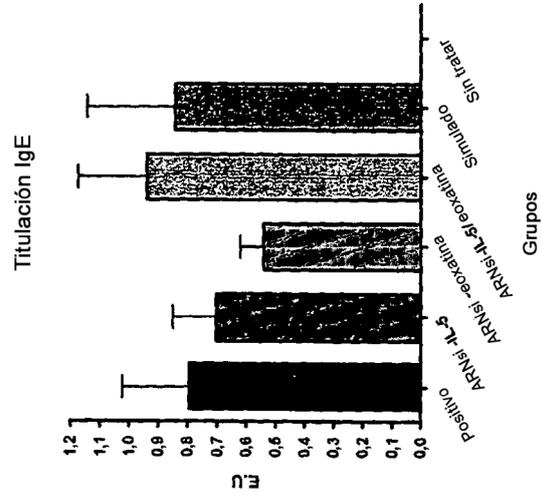


FIG 13

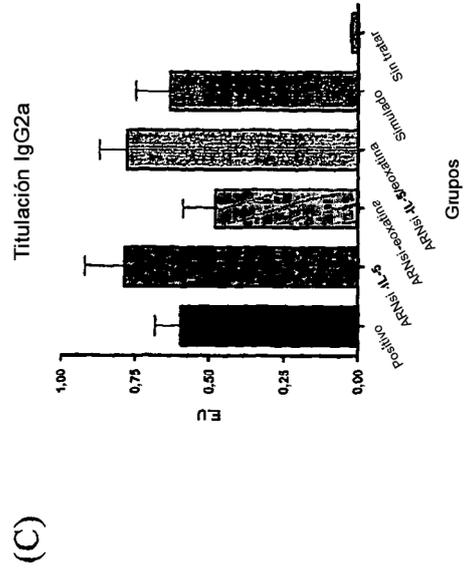
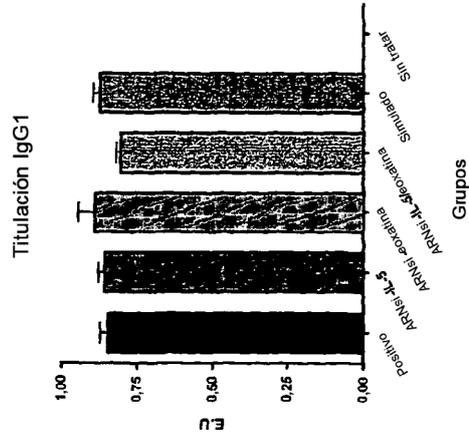


FIG 14

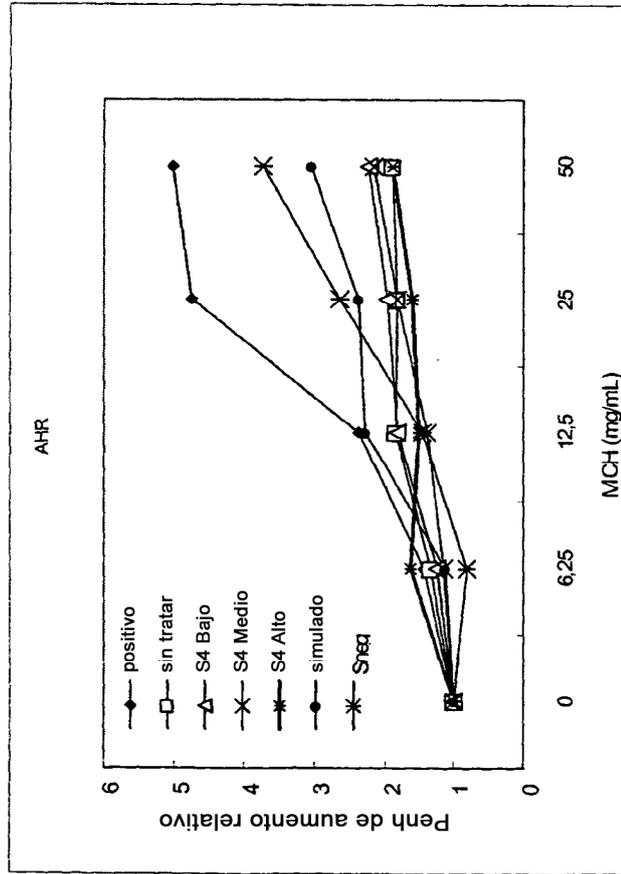


FIG 15

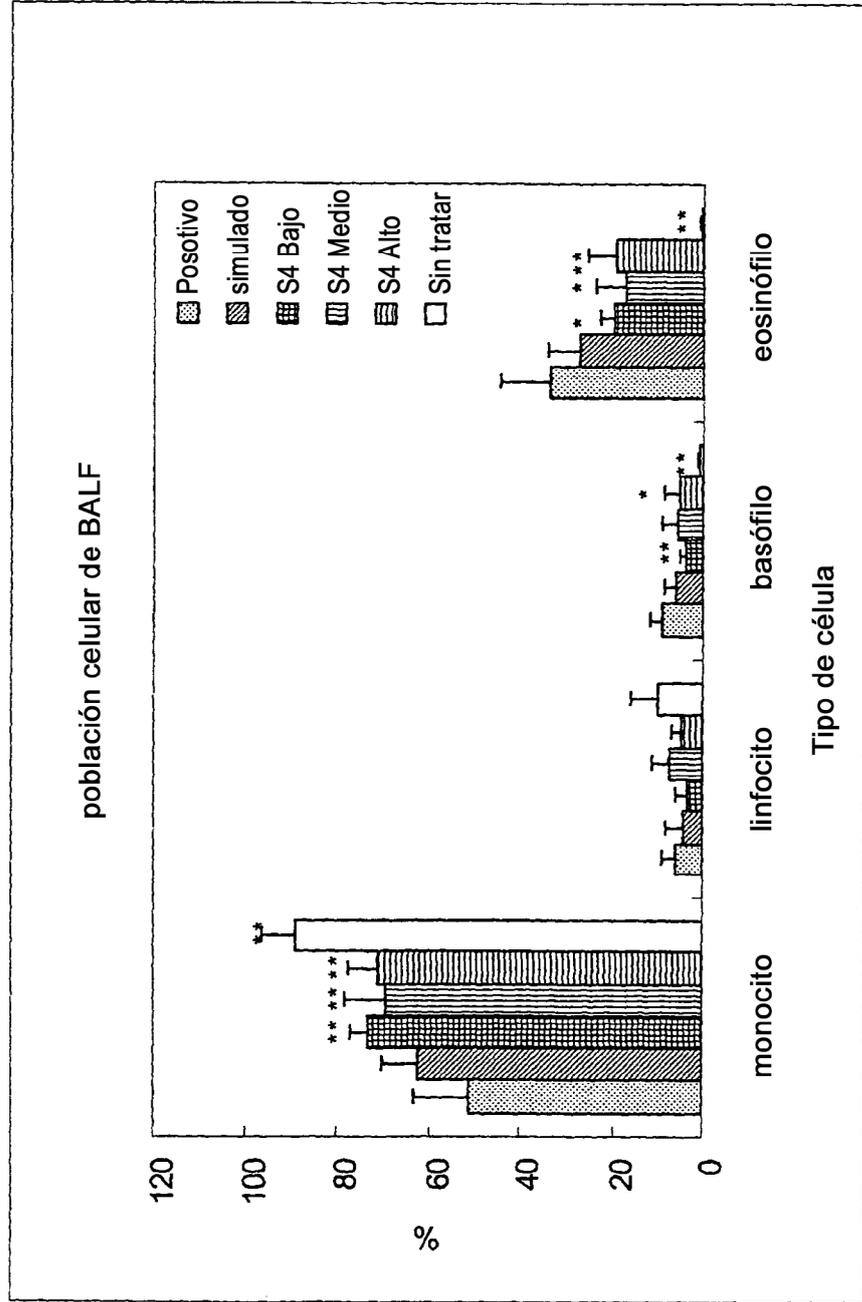


FIG 16

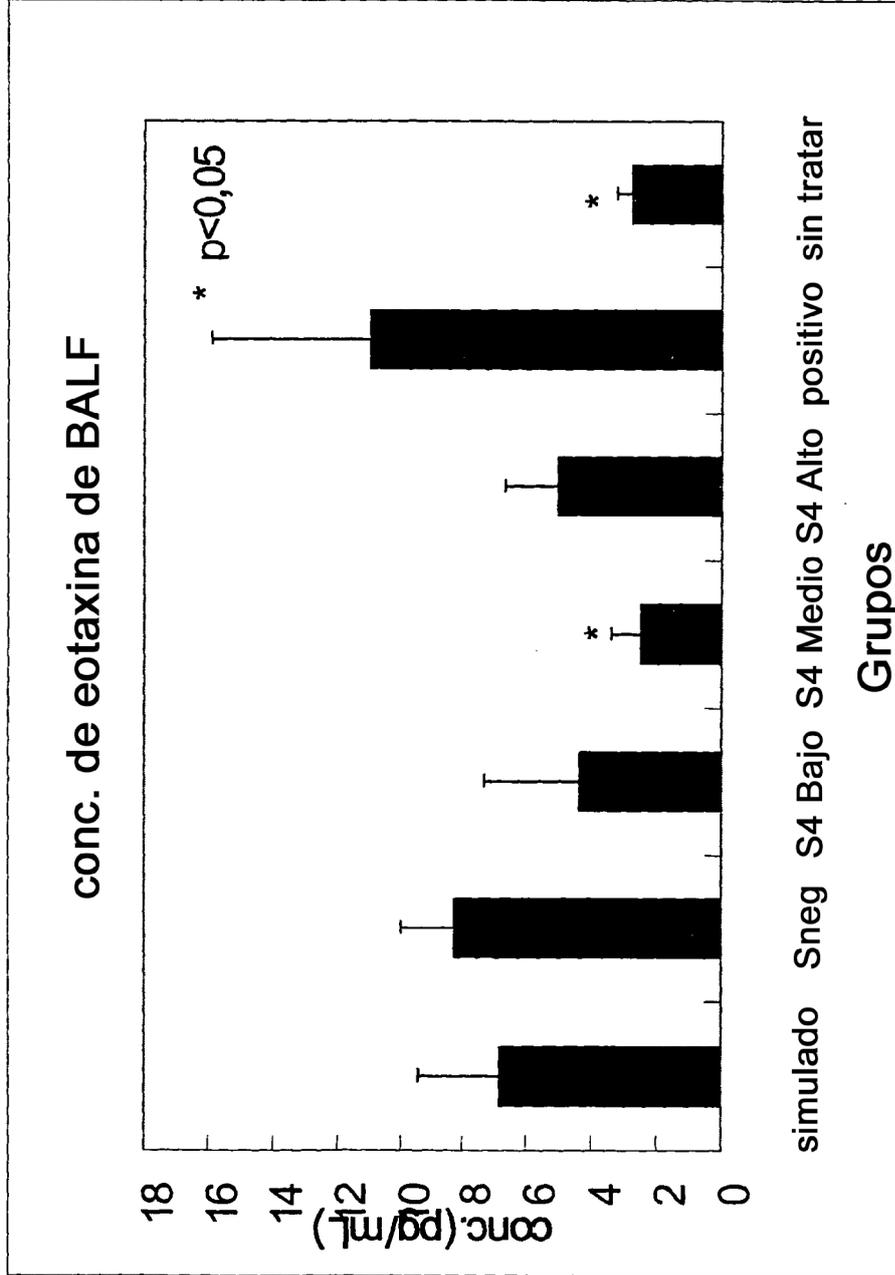


FIG 17

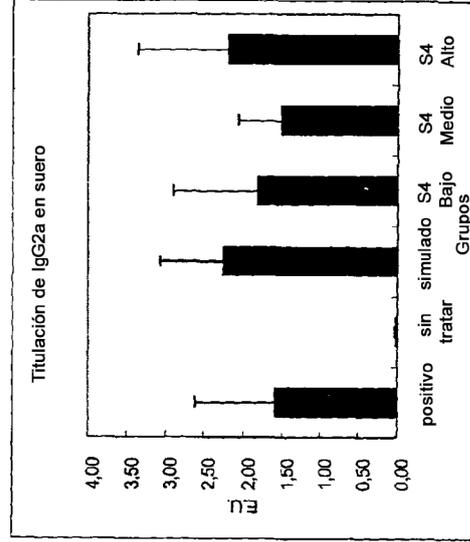
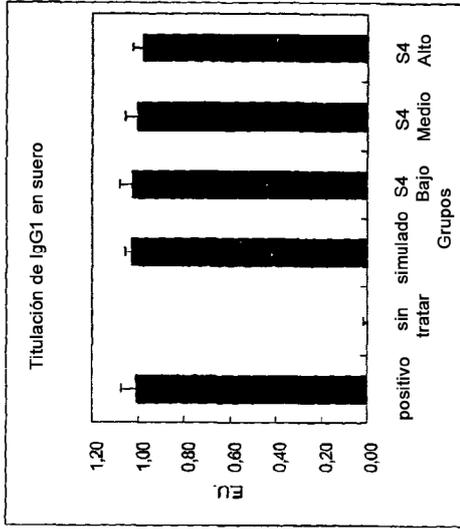
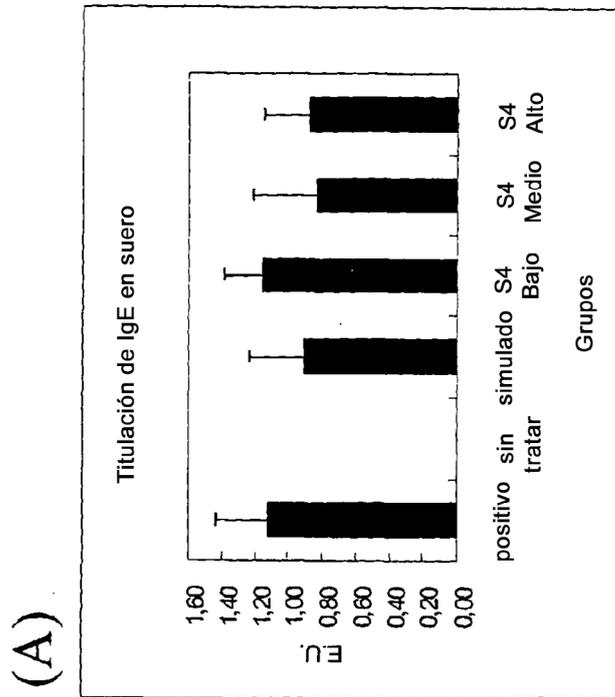


FIG 18

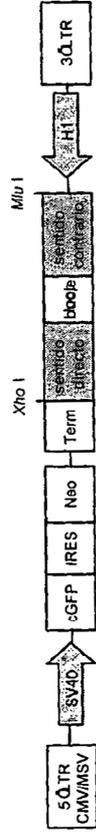


FIG 19

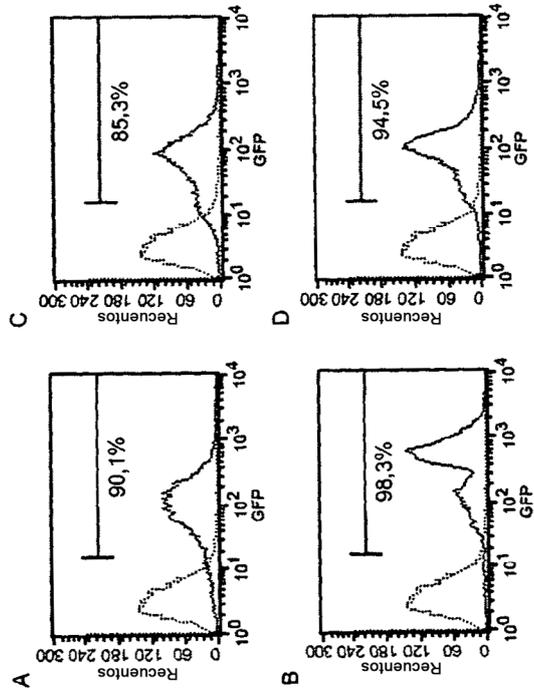


FIG 20

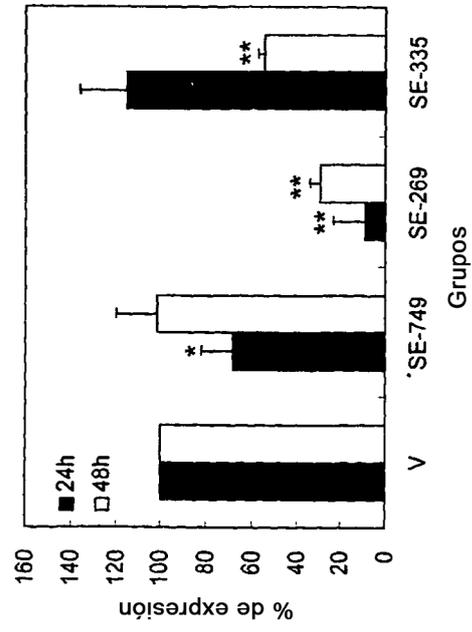


FIG 21

Expresión de ARN gata-3, IL4, IL13 después de la transfección de ARNsh en células Jurkat

