

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 371**

51 Int. Cl.:

C07H 21/00 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/88 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2003 E 10158898 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2012 EP 2266995**

54 Título: **Oligonucleótidos contra la infección de VIH y su uso en la prevención y tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida**

30 Prioridad:

18.12.2002 CN 02156785

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

21.02.2013

73 Titular/es:

**BEIJING SOLOBIO GENETECHNOLOGY
COMPANY LTD. (100.0%)**

**No. 5 Rongjing East St.
Beijing BDA 100176, CN**

72 Inventor/es:

**ZHOU, ZHIWEN;
FENG, YUXIA;
ZUO, CONGLIN y
LI, YUEJUAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 396 371 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

Oligonucleótidos contra la infección de VIH y su uso en la prevención y tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida

5

Area técnica

La invención se refiere a un conjunto de oligonucleótidos contra la infección por el VIH y a su aplicación en la prevención y el tratamiento del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

10

Antecedentes de la tecnología

Los descubrimientos recientes demostraron que el ARN bicatenario corto actúa como ARN de interferencia en diversas células de mamíferos y que la expresión de genes puede ser silenciada específicamente. La expresión génica viral (incluido el VIH) puede ser silenciada por esta vía. Debido a la alta frecuencia de mutación del genoma del VIH, la mayor parte del ARN de interferencia puede silenciar la expresión de genes de cepas específicas y no se puede utilizar como un método universal en la genoterapia del SIDA.

15

Wee-Sung et al (Nucleic Acid Res., vol. 30, N° 22, 2002, páginas 4830-4853) dan a conocer la inhibición a través de ARNi de la replicación y la expresión de genes del VIH-1 en células transinfectadas tratadas con ARNbc más largo correspondiente a regiones en gag y env. Esto se lleva a cabo sin optimización de la secuencia diana.

20

Capodici et al (J. Immunol., vol.169, 2002, páginas 5196-5201) dan a conocer la inhibición de la infección por el VIH-1 mediante interferencia de ARN mediada por ARNip utilizando dos ARNip bicatenarios cortos diferentes, dirigidos al VIH-gag en la represión de la replicación viral. Esto se lleva a cabo sin optimización de la secuencia diana.

25

Novina et al (Nature Medicine, vol. 7, N° 8, 2002, páginas 681-686) dan a conocer la inhibición de la infección por el VIH-1 y la replicación en células por ARNip bicatenarios dirigidos a gag - p24. Esto se lleva a cabo sin optimización de la secuencia diana.

30

WO 99/09154 da a conocer métodos de inhibición de la infección por el VIH-1 por ARN antisentido (monocatenario). Los diversos ARN antisentido se derivan de los nucleótidos 324-345 del VIH-1, que abarca el codón de inicio ATG del gen gag.

35

Jacque J M et al.. (Nature, vol. 418, N° 6896, 2002, páginas 435-438) dan a conocer la inhibición por ARNi de la replicación con diversas moléculas de ARNip bicatenario corto dirigidas contra 5'-LTR, vif y nef.

Yamamoto et al (Microbiol. and Immunol., vol. 46, N° 11, 2002, páginas 809-817) dan a conocer la inhibición de la replicación del VIH-1 con ARN bicatenario largo de nef.

40

Coburn et al (J. Virol., vol. 76, N° 18, páginas 9225-9231) dan a conocer la inhibición por ARNi de la replicación del VIH con diversas moléculas de ARNip bicatenario corto dirigidas contra tat y rev.

Lee et al (Nature Biotechnology, vol. 20, 2002, páginas 500-505) dan a conocer la inhibición por ARNi de la replicación del VIH con diversas moléculas de ARNip bicatenario corto dirigidas contra rev.

45

WO 03/070193 da a conocer la inhibición por ARNip de la replicación del VIH y la infección por el VIH, y otras realizaciones utilizando ARNip específicos. Esto se lleva a cabo sin optimización de la secuencia diana.

50

Divulgación de la invención

El propósito de la invención es proporcionar un conjunto de nucleótidos para la prevención de la infección por el VIH y el tratamiento del SIDA.

55

El otro propósito es proporcionar la aplicación de los oligonucleótidos mencionados antes.

Para esos fines, se emplearon los métodos siguientes.

Un conjunto de secuencias de ARN que se muestran de acá en adelante, o todos los fragmentos de las secuencias, que demuestren actividad contra la infección por el VIH y sean empleados en la prevención y el tratamiento del SIDA. Los nucleótidos incluyen ARN bicatenario y cualquier fragmento derivado de las secuencias derivadas por apareamiento de las secuencias con sus secuencias complementarias.

60

(4) uauuggguaccugugugga ;

(5) gccaaaucccauacauauuguc ;
 (6)uuaaauggcagucuagcagaa;

En la invención se obtuvieron secuencias de oligonucleótidos conservadas entre todo el genoma del VIH publicado mediante alineamiento de homología. La expresión de genes del VIH pudo ser silenciada y el genoma del VIH se pudo degradar cuando el ARN se introdujo en células de mamíferos. Los productos farmacéuticos derivados de las secuencias conservadas pueden disminuir significativamente los problemas de resistencia a los fármacos que resultaron de la mutagénesis genómica.

Un conjunto de secuencias de ARN, que pueden ser modificadas por otro nucleótido en el extremo 5' o 3' terminal. Generalmente se agregaron UU en el extremo 3' del fragmento de ARN para asegurar la coincidencia entre el ARN y el ARNm deseado.

Un conjunto de secuencias de ARN en horquilla para el control de la infección por el VIH y para la prevención y el tratamiento del SIDA, las secuencias en horquilla se derivaron por hibridación de las secuencias (SEC. ID N° 4 ~ SEC. ID N° 6), o los segmentos pertinentes en el extremo 5' terminal, con sus secuencias complementarias, en el cual las secuencias de ARN y las secuencias complementarias se unieron mediante una secuencia no complementaria. El ARN tipo horquilla mantiene la actividad de interferencia de ARN, y se emplea particularmente para expresar ARN interferente en la célula porque es un ARN molecular.

Un conjunto de secuencias de ADN o de sus fragmentos que actúan contra la infección por el VIH y se utilizan en la prevención y el tratamiento del SIDA:

1) las secuencias de ADN o sus fragmentos, que corresponden a las secuencias de ARN que se muestran antes o sus fragmentos (SEC. ID N° 4 ~ SEC. ID N° 6 en la tabla 1) como secuencia de ARN bicatenario formado por hibridación de los ARN que se muestran antes con su secuencia complementaria, o,

2) las secuencias de ADN o sus fragmentos, que corresponden a las secuencias de ARN descritas en 1) o a sus fragmentos que fueron modificados en sus extremos 5' o 3' añadiendo nucleótidos; o

3) una secuencia de ADN bicatenario, que corresponde a la secuencia de ARN tipo horquilla como el descrito antes.

Un conjunto de vectores de expresión, que incluyen tanto los vectores de ADN como los vectores de ARN contra la infección por el VIH y que se usan en la prevención o el tratamiento del SIDA, en el cual están contenidas las secuencias de ARN o ADN descritas antes. El ARN de interferencia se puede expresar cuando los vectores que contienen las secuencias de ADN y ARN mencionadas antes se introdujeron en las células bajo el control de elementos reguladores. Los vectores son vectores de ARN y vectores de ADN. Los vectores de ARN incluyen, pero no exclusivamente, vectores retrovirales, vectores de ADN que tienen las secuencias de ADN indicadas y los elementos de control incluyen vectores plasmídicos y virales como el virus asociado a adenovirus (AAV).

Un conjunto de liposomas contra la infección por el VIH y para la prevención y el tratamiento del SIDA, en el cual se recubrieron las secuencias de ARN y ADN así como los vectores de expresión indicados antes contra la infección por el VIH y el tratamiento y la prevención del SIDA. El ARN interferente, o vectores que expresan el ARN interferente, fueron introducidos en la célula por el liposoma indicado antes.

El método para luchar contra la infección por el VIH y para la prevención y el tratamiento del SIDA, mediante el cual los ARN, los ADN, los vectores de expresión o los liposomas indicados antes, se introdujeron en líneas celulares eucariotas, animales o seres humanos. Por ejemplo, métodos que emplean liposomas y vectores virales.

La aplicación de los nucleótidos en la prevención de la infección por el VIH y el tratamiento del SIDA. Los productos farmacéuticos para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de la infección por el VIH y el SIDA se derivaron de los ARN, los ADN, los vectores de expresión, los liposomas o los métodos mencionados antes.

Descripciones de las figuras adjuntas

Fig. 1. Construcción del plásmido reportero pEGFP-gp120.

Fig. 2. La expresión de EGFP gp120 fue silenciada por ARN interferente bicatenario.

Fig. 3. La expresión de EGFP gp120 fue silenciada por ARN interferente bicatenario como se demostró por inmunotransferencia tipo Western.

Fig. 4. La construcción de p-H1-gp120i a partir del cual se pudo expresar el ARN en horquilla en las células.

Fig. 5. Construcción del plásmido pAAV-120i.

Fig. 6. La expresión de GP120 GFP fue silenciada por el ARN bicatenario en horquilla expresado por el AAV recombinante.

Mejores métodos para realizar la invención

Todos los protocolos se basan en general en los protocolos descritos en Molecular Cloning, 3ª edición.

Ejemplo 1: Secuencia de ARN del VIH más conservada:

Las secuencias publicadas del genoma del VIH se seleccionaron y separaron en fragmentos de 70 nt basándose en los genes funcionales del VIH. Se analizó la homología de cada fragmento con más de 140 000 secuencias de Genebank (Centro Nacional de Información Biológica, EE.UU), EMBL (Base de datos de secuencias de nucleótidos en el Laboratorio de Biología Molecular de Europa), DDBJ (Base de datos de nucleótidos de Japón) y GDB (Base de datos de genes) utilizando BlastN 2.2.4/2.2.5. Las secuencias de ARN conservadas se seleccionaron según los criterios siguientes: (1) la secuencia es igual o más larga de 19 nt; (2) la secuencia tuvo 100% de homología con por lo menos 1000 secuencias de VIH de la base de datos; (3) si no se podían encontrar fragmentos con 100% de homología, se incluían las secuencias que contenían 1 nucleótido no coincidente. Los resultados del análisis se muestran en la tabla 1 y la tabla 2.

Tabla 1 Secuencias del ARN del VIH más conservadas encontradas por análisis de homología

Nº	Gen del VIH	Secuencia del ARN
1	gag-pol	Aucaaugaggaagcugcagaaugg
2	gag-pol	Gggaagugacauagcaggaacuacuag
3	gag-pol	uaaauaaaaauaguaagauguauagcccu
4	env	Uaugggguaccugugugga
5	env	Gccaauucccauacauuuuugugc
6	Env	Uuaaauggcagucuaagcagaa
7	Nef	Accacacacaaggcuacuuccugau
8	3-UTR	Acagccgccuagcauuucaucac
9	LTR	Ggauggugcuucaagcuaguaccaguu

Tabla 2. Análisis de homología de las secuencias de ARN conservadas con las secuencias de la base de datos

Nº	Gen del VIH	Tamaño del fragmento (nt)	Secuencia del VIH comparada	Secuencias con 100% de homología	Secuencia(s) con 1 nt no coincidente
1	Gag-pol	24	1050	1050	0
2	Gag-pol	27	1051	1050	1
3	Gag-pol	29	1050	1048	2
4	env	19	1050	1050	0
5	env	24	1050	1050	0
6	env	21	1050	1050	0
7	nef	26	1082	1082	0
8	3-UTR	23	1070	1070	0
9	LTR	27	1069	1069	0

Ejemplo 2. La expresión del gen env del VIH fue silenciada por ARN bicatenario sintetizado químicamente

Las hebras de ARN positiva y negativa (hebra complementaria) se sintetizaron de acuerdo con SEC. ID Nº 1 con modificación UU en el extremo 3' de las secuencias
 5' uaugggguaccuguguggauu
 3' uuauaccccauggacacaccu

Como se muestra en la figura 1, el plásmido pEGFPC1 (Clontech, CA) fue doblemente digerido con EcoRI y BamHI a 37 °C durante 1 hora. El fragmento grande se extrajo y se usó como vector; el gen del VIH gp120 se obtuvo por PCR utilizando 2 ng de ADNc del VIH (cepa Bru) como plantilla, más cebadores para gp120 (A:5' cggaaattctaaagagcacaaga cagtggac, B: 5' cggatcctactctaccgtcagcagtcattga 100 ng de cada uno) en un tampón que contenía 2.5 u de ADN polimerasa de alta fidelidad Pfu, dNTP 250 µmol/L, MgCl₂ 2.5 mmol/L, TrisHCl (pH 8.3) 25 mmol/L. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo utilizando un termociclador Perkin Elmer 9700 (94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 ciclos), el fragmento de ADN que resultó de la PCR fue doblemente digerido por EcoRI y BamHI (Biolabs) después de ser purificado con el kit de extracción en gel de Qiagen y ligado con el vector descrito antes. La mezcla ligada se transformó en E. coli JM109 (Promega) y se obtuvo el plásmido pEGFP-gp120. La proteína de fusión de GFP y gp120 del VIH se debe expresar mediante transfección del plásmido en células de mamíferos.

Se co-transfectaron células HEK 293 (de ATCC) con 1 µg de plásmido pEGFP-gp120 y 1 µg del ARN bicatenario descrito antes utilizando LIPOFECTamina (rf. Manul de Invitrogen). Las células se analizaron mediante microscopia de fluorescencia y el lisado de células se analizó por inmunotransferencia con anticuerpo anti-GFP (Clontech) 36 h después de la transfección. Un ARN bicatenario falso (rf. ARNbc que corresponde al gen GAG del VIH, consulte el ejemplo 3) se empleó como control.

Resultados: como se muestra en la figura 2, la expresión de la proteína de fusión fue silenciada por el ARN bicatenario específico para env en comparación con el control. El experimento se repitió dos veces y se mostró como ARNbc1 y ARNbc2, respectivamente. Como se muestra en la figura 3, el nivel de expresión de la proteína de fusión GFP-VIH GP120 fue silenciado hasta un 80%.

Ejemplo 3. La expresión del gen gag del VIH fue silenciada por ARN bicatenario sintetizado

Basándose en la secuencia de ARN de gag conservada (SEC. ID N° 2 en la tabla 1), se sintetizaron un oligonucleótido de 21 nt y su secuencia complementaria. Las secuencias contienen 19 nt de SEC. ID N° 2 y dos U en el extremo 3' de cada fragmento. Se obtuvo ARN bicatenario por apareamiento.

5' g u g a c a u a g c a g g a a c u a c u u
3' u u c a c u g u a u c g u c c u u g a u g

El gen gag del VIH (LAV-1, cepa Bru) se amplificó y clonó en el vector pEGFP C1 (Clontech, CA) como se describe en el ejemplo 2, se esperaba que la proteína de fusión GFP-VIH gag fuera expresada por el plásmido cuando éste se transfectó en las células.

El plásmido así como el ARN bicatenario fueron co-transfectados en células HEK 293 mediante el protocolo de LIPOFECTamina, se demostró que la proteína GFP-VIH gag era silenciada por el ARN bicatenario en comparación con el bicatenario falso, como se muestra mediante microscopía de fluorescencia de las células 36 h después de la transfección.

Ejemplo 4: La expresión del gen nef fue silenciada por ARN bicatenario sintetizado

De acuerdo con la secuencia de nef conservada (SEC. ID N° 7 en la tabla 1), se sintetizó un oligonucleótido de 21 nt con su secuencia de ARN complementaria, en la cual el 5' de 19 nt se derivó de SEC. ID N° 7 y se agregaron dos U al extremo 3' de cada oligonucleótido. Se obtuvo ARN bicatenario por apareamiento.

5' a c c a c a c a a g g c u a c u u u u
3' u u g g u g u g u g u u c c g a u g a a

El gen que codifica la proteína nef se amplificó y clonó en pEGFPC1 como se muestra en el ejemplo 2, se esperaba que la proteína de fusión GFP-Nef fuera expresada por las células que contenían el plásmido recombinante.

Se co-transfectaron células HEK 293 con el plásmido obtenido y el ARN bicatenario sintetizado, lo que demostró que la expresión de la proteína de fusión GFP-VIH nef fue silenciada por el ARN bicatenario específico para nef por comparación con el ARN bicatenario falso, como se muestra mediante microscopía de fluorescencia 36 horas después de la transfección.

Ejemplo 5: La expresión de otras proteínas del VIH podría ser silenciada por ARN bicatenario sintetizado (Tapbe 3).

Tabla 3 La expresión de otros genes del VIH fue silenciada por el ARN bicatenario novo

N°	ARNbc	Gen del VIH de destino	Eficacia de la inhibición
1	5' a u c a a u g a g g a a g c u g c a g u u 3' u u u a g u u a c u c c u u c g a c g u c	gag-pol	++++
2	5' g u a a g a a u g u c u a g c c c u g u u 3' u u c a u u c u u a c a g a u c g g g a c	gag-pol	+++
3	5' u u c c c a u a c a u u a u u g u g c u u 3' u u a a g g g u a u g u a a u a a c a c g	env	+++
4	5' a a a u g g c a g u c u a g c a g a a u u 3' u u u u u a c c g u c a g a u c g u c u u	env	+++

: + + +60-80% de inhibición; ++++ 80-100% de inhibición.

Ejemplo 6: La expresión de la envoltura del VIH fue silenciada por ARNi expresado por un vector eucariota que contenía fragmentos de ADN bicatenario que codifican el ARNi en horquilla conservado.

Se sintetizaron el ADN correspondiente al fragmento de secuencia de ARN Sec. ID N° 5 que se muestra en la tabla 1 y su secuencia híbrida (en cursiva y negrita), el fragmento de ADN bicatenario se obtuvo por apareamiento. Se incluyeron los sitios BamHI y HindIII en sus extremos 5' y 3', respectivamente. Hay un espacio de 9 bp entre la secuencia conservada y su secuencia de hibridación. El fragmento B es la secuencia complementaria del fragmento A:

A:5' gatccccctcccatacattattgtgdtcaagagagcacaatgtatgggaatmttgaaa
 B:5 agctttccaaaaattcccatacattattattgtgctcttgaagcacaataatgtatgggaaggg

5 Como se muestra en la figura 4, el promotor H1 humano se amplificó mediante el cebador 1 (5'-
 TAATTAATGCGGCCGCAATTCGAACGCTGACGTC-3') y el cebador 2 (5'-
 GCACTAGTAAGCTTGGATCCGTGGTCTCATACAGAAGTTATAAGATTCCC-3' utilizando 1 µg de ADN genómico
 humano como plantilla y se clonó en los sitios AseI y XbaI del plásmido pEGFP (Clontech). La mezcla ligada se
 transformó en E.coli JM109, y se obtuvo el plásmido recombinante pH1. El fragmento de ADN bicatenario apareado
 10 descrito, se clonó en pH1 en sus sitios BamHI y HindIII, y se obtuvo un nuevo plásmido recombinante, pH1-gp120i.
 El ARN en horquilla pudo ser transcrito por la ARN polimerasa III en las células que albergaban pH1-gp120i.

15 Se co-transfectaron células HEK293 con 4 µg de plásmido pH1-gp120i (se utilizó como control la misma cantidad
 de pH1) y un plásmido que expresaba EGFP-VIH GP120. Se analizó la expresión diferencial de EGFP-VIH GP120
 como se describe en el ejemplo 2. Los resultados demostraron que el ARNi codificado por el plásmido que contenía
 un fragmento de ADN que codifica el ARN en horquilla puede inhibir eficazmente la expresión del gen del VIH diana.

20 Ejemplo 7: La expresión del GP120 del VIH fue silenciada por ARNi transcrito en las células infectadas por virus
 asociado a adenovirus (AAV) las cuales contienen el promotor H1 y el fragmento de ADN pertinente que codifica el
 ARN en horquilla como se describe en el ejemplo 6.

25 Como se muestra en la figura 5, se digirió el plásmido pAAV-MCS (Stratagene) con NotI y HindIII; el fragmento de
 ADN que contiene el promotor H1 y el fragmento de ADN que codifica el ARN en horquilla correspondiente a gp120
 se obtuvo por digestión de pH1-gp120 con NotI y HindIII. El fragmento se ligó al vector mediante la T4 ADN ligasa y
 se construyó el plásmido pAAV-gp120i. Se co- transfectaron células HEK 293FT con el plásmido (4 µg), el
 30 plásmido colaborador pHelper(1 µg, Stratagene) y el plásmido pAAV-RC(2 µg Stratagene) mediante
 LIPOFECTamina, y se usó un vector vacío (pAAV-MCS) como control. EL AAV recombinante y el AAV de control se
 cosecharon 48 horas después de la transfección.

35 Se transfectaron células HEK 293 con pEGFP-GP120 (1 µg) como se describe y se infectaron con el AAV
 recombinante que codifica el ARNi o el AAV vacío, se analizó la fluorescencia de GFP expresada 24 h después de la
 infección, con el microscopio de fluorescencia.

40 Como se muestra en la figura 6, la expresión de GFP-GP120 fue inhibida significativamente por el AAV
 recombinante que codificó el ARN en horquilla.

35 Aplicabilidad industrial

La invención fue superior a la tecnología actual como se muestra a continuación:

40 Se obtuvieron fragmentos de ARN altamente conservados en todo el genoma del VIH publicado mediante análisis de
 homología. El ARN bicatenario derivado del ARN altamente conservado pudo silenciar eficazmente la expresión del
 gen del VIH. La expresión del gen del VIH también pudo ser inhibida por ARNbc codificado por plásmido así como
 por el virus asociado a adenovirus recombinante que contenía la secuencia de ADN correspondiente

45 Listado de secuencias

<110> Beijing Joinn Pharmaceutical Center
 <120> Un conjunto de oligonucleótidos contra la infección por el VIH y su aplicación en la prevención y el tratamiento
 del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
 50 <130>
 <160> 9
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 <211> 24
 55 <212> ARN
 <213> Lentivirus VIH
 <400> 1
 aucaaugagg aagcugcaga augg 24
 <210> 2
 60 <211> 27
 <212> ARN
 <213> Lentivirus VIH
 <400> 2
 gggaagugac auagcaggaa cuacuag 27

ES 2 396 371 T3

<210> 3
 <211> 29
 <212> ARN
 <213> Lentivirus VIH
 <400> 3
 5 uaaaauaaaau aguaagaaug uauagcccu 29
 <210> 4
 <211> 19
 <212> ARN
 10 <213> Lentivirus VIH
 <400> 4
 uaugggguac cugugugga 19
 <210> 5
 <211> 24
 15 <212> ARN
 <213> Lentivirus VIH
 <400> 5
 gccaaauccc auacauuuu gugc 24
 <210> 6
 20 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Lentivirus VIH
 <400> 6
 25 uaaaauggca gucuagcaga a 21
 <210> 7
 <211> 26
 <212> ARN
 <213> Lentivirus VIH
 <400> 7
 30 accacacaca aggcuacuuc ccugau 26
 <210> 8
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Lentivirus VIH
 35 <400> 8
 acagccgccu agcauuuau cac 23
 <210> 9
 <211> 27
 <212> ARN
 40 <213> Lentivirus VIH
 <400> 9
 ggauggugcu ucaagcuagu accaguu 27

REIVINDICACIONES

1. Un ARN, donde dicho ARN posee actividad contra la infección por el VIH y donde dicho ARN se selecciona del grupo que consiste en:
- 5 a) un ARN bicatenario derivado por apareamiento de SEC ID N°: 4 y la secuencia complementaria de ésta, SEC ID N°: 5 y la secuencia complementaria de ésta, o SEC ID N°: 6 y la secuencia complementaria de ésta;
- 10 b) un ARN bicatenario derivado por apareamiento de un fragmento de SEC ID N°: 4 y la secuencia complementaria de éste, un fragmento de SEC ID N°: 5 y la secuencia complementaria de éste o un fragmento de SEC ID N°: 6 y la secuencia complementaria de éste:
- (1) uaugggguaccugugugga (SEC.ID N°:4);
- (2) gccaaaucccauacauuuuugugc (SEC.ID N°:5);
- 15 (3) uuaaauggcagucuagcagaa (SEC.ID N°:6);
- donde dicho(s) fragmento (s) de SEC.ID N°:4, SEC.ID N°:5 o SEC.ID N°:6 en b) se seleccionan del grupo que consiste en
- un fragmento de 18 nt de SEC. ID N°: 4, SEC. ID N°: 5 o SEC. ID N°: 6;
- 20 un fragmento de 19 nt de SEC. ID N°: 5 o SEC. ID N°: 6;
- un fragmento de 20 nt de SEC. ID N°: 5 o SEC. ID N°: 6;
- un fragmento de 21 nt de SEC. ID N°: 5;
- un fragmento de 22 nt de SEC. ID N°: 5;
- un fragmento de 23 nt de SEC. ID N°: 5.
- 25 2. El ARN de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho ARN se modifica en su extremo 5' o extremo 3' añadiendo dos nucleótidos uracilo.
3. El ARN de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho ARN es un ARN en horquilla que consta de una parte tallo y una parte bucle, y dicha parte tallo es una parte de ARN bicatenario de acuerdo con la reivindicación 1, derivado por apareamiento de
- 30 SEC. ID N°: 4 y la secuencia complementaria de ésta;
- SEC. ID N°: 5 y la secuencia complementaria de ésta;
- SEC. ID N°: 6 y la secuencia complementaria de ésta;
- 35 un fragmento de secuencia SEC. ID N°: 4 y la secuencia complementaria de éste;
- un fragmento de secuencia SEC. ID N°: 5 y la secuencia complementaria de éste;
- o un fragmento de secuencia SEC. ID N°: 6 y la secuencia complementaria de éste;
- y dicha parte bucle es un espaciador no complementario.
- 40 4. Un ADN bicatenario que codifica el ARN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Un vector de expresión que contiene el ADN de acuerdo con la reivindicación 4.
6. El ARN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, un ADN de acuerdo con la reivindicación 4 o un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5, recubiertos por liposomas.
- 45 7. Una línea celular eucariota que contiene un ARN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 6, un ADN de acuerdo con la reivindicación 4 o 6, o un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5 o 6.
- 50 8. Un ARN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 6, un ADN de acuerdo con la reivindicación 4 o 6, o un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, para usar en la prevención o el tratamiento de la infección por el VIH o la prevención o el tratamiento del sida.
9. El uso del ARN o el ADN descritos en cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 6, o los vectores de expresión de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 en el diagnóstico del VIH y el sida.
- 55

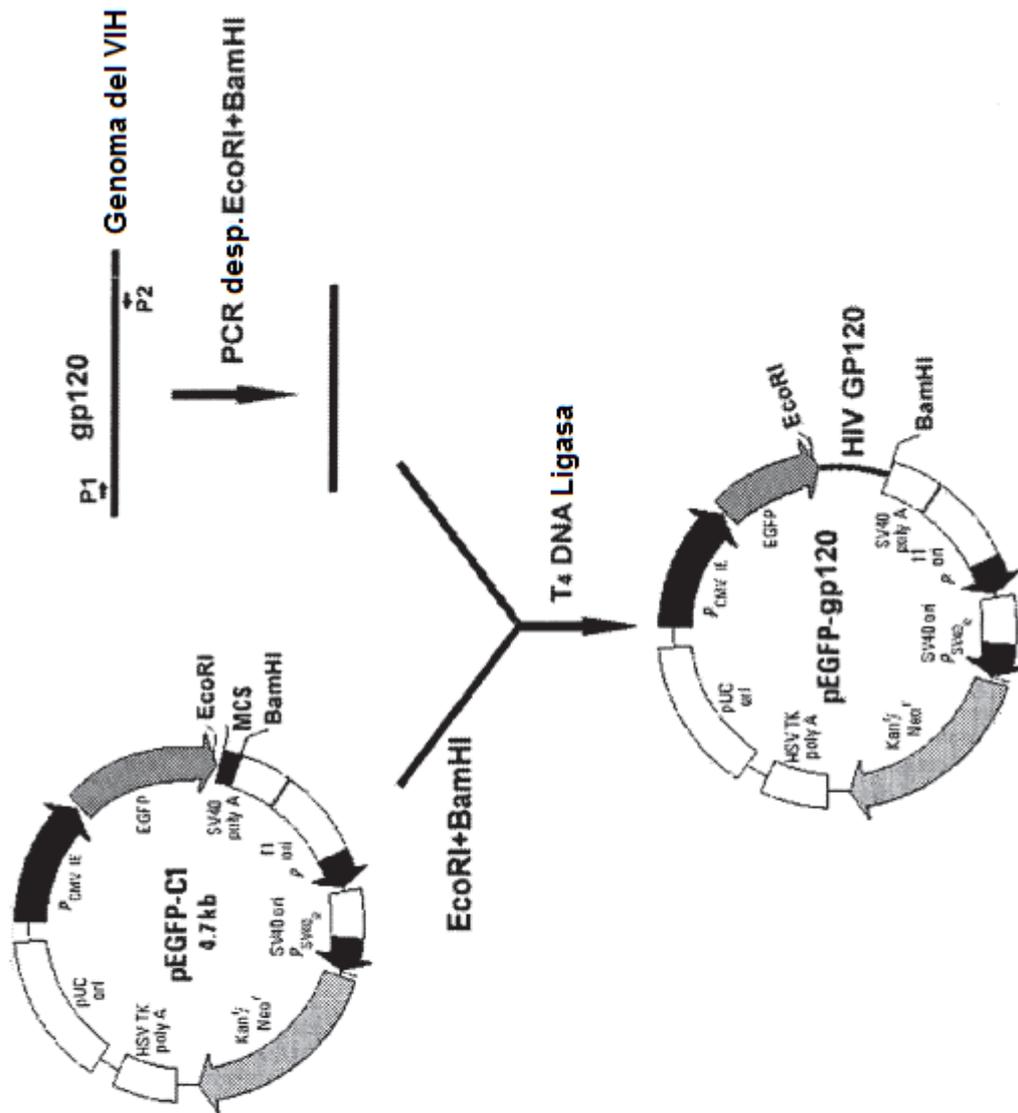


Fig. 1

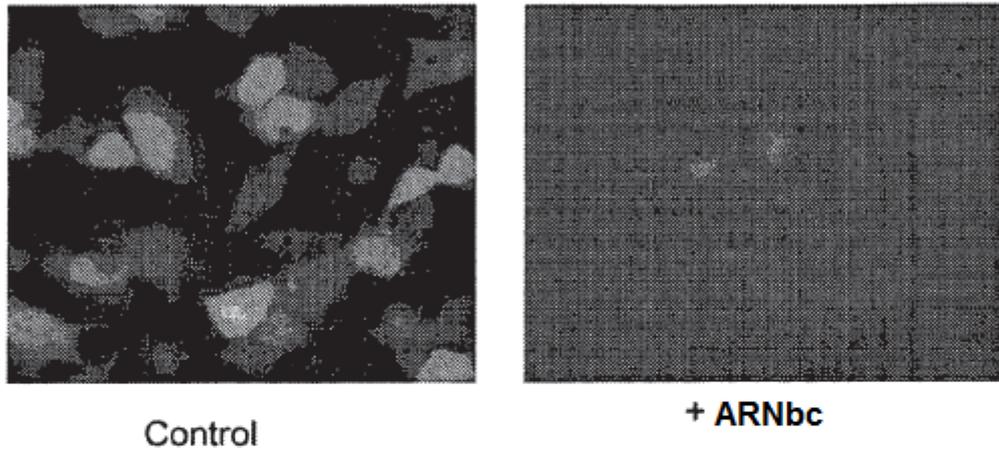


Fig. 2

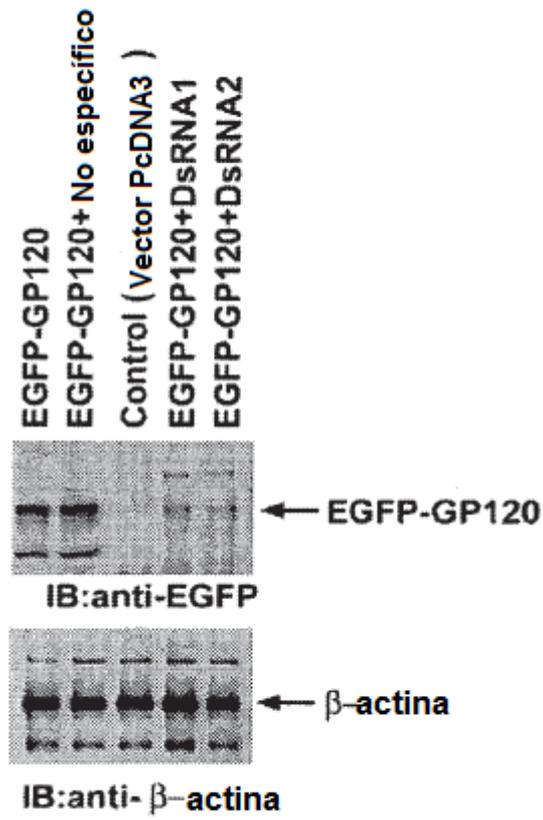


Fig. 3

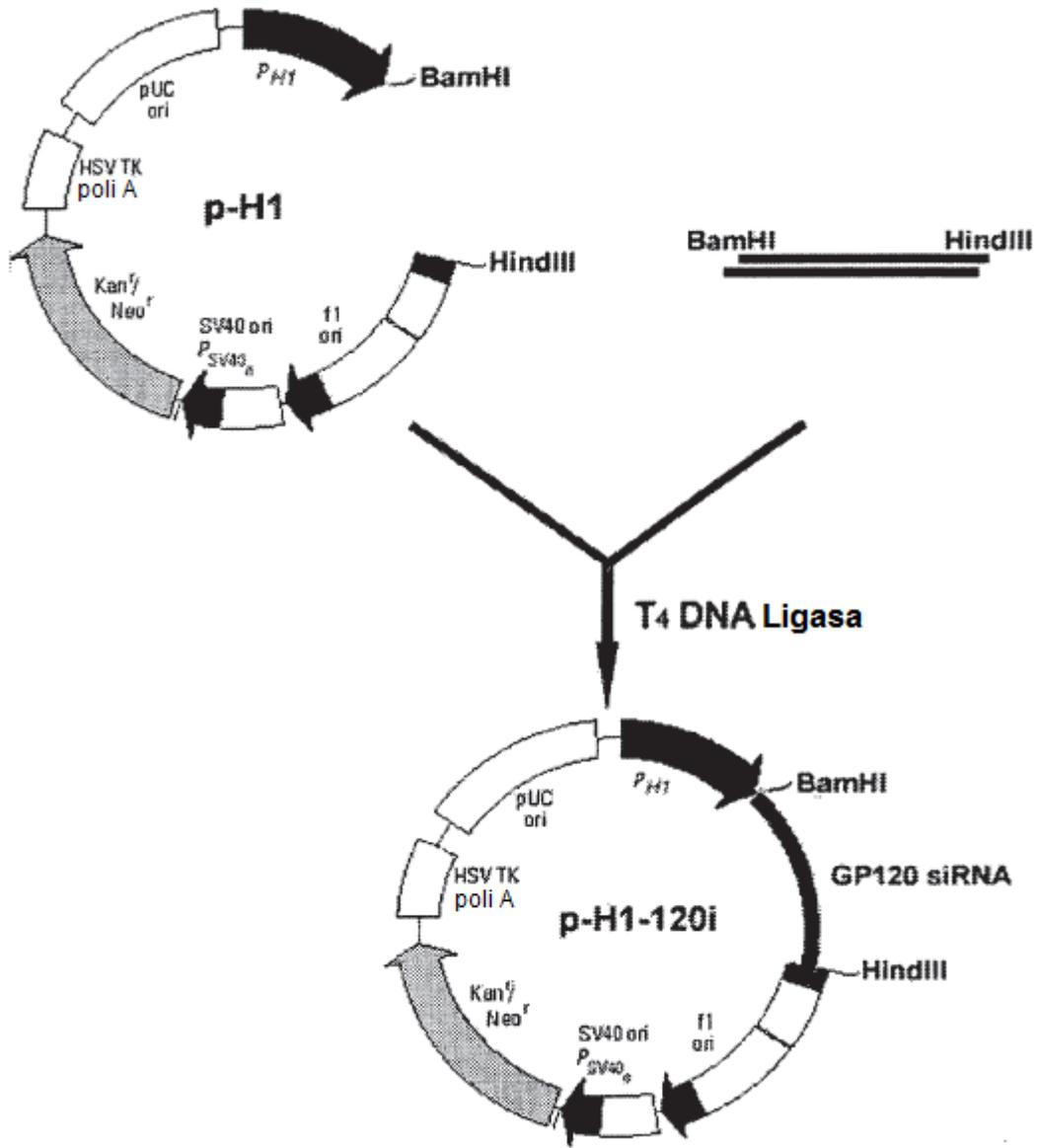


Fig. 4

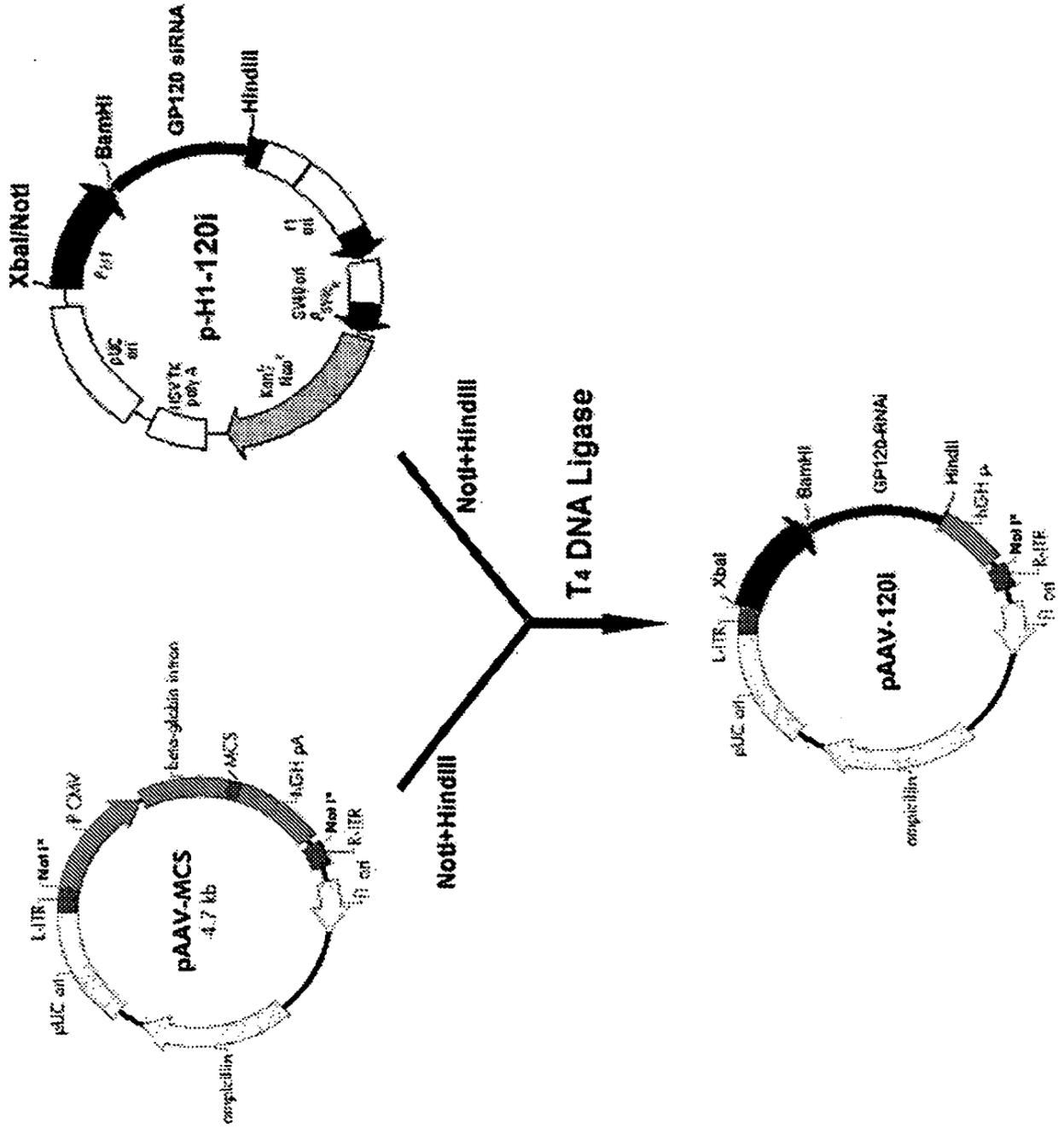


Fig. 5

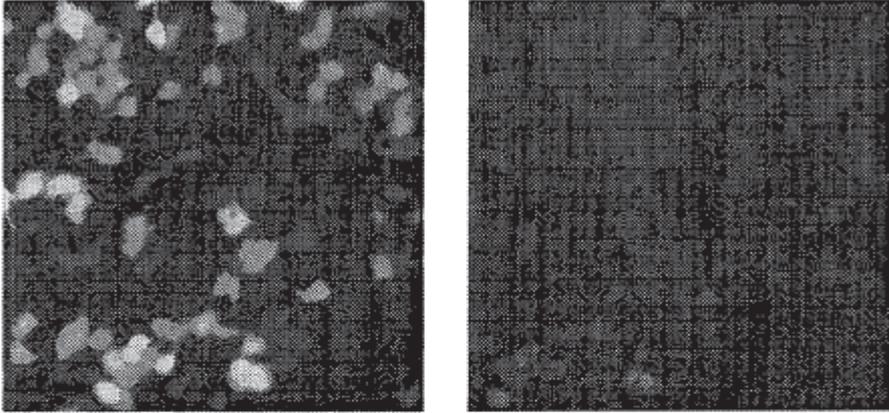


Fig. 6