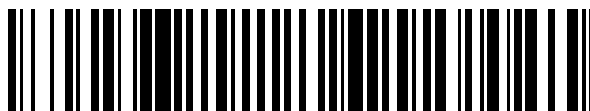


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 326**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2002** **E 02803555 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012** **EP 1445312**

54 Título: **Procedimiento para inhibir la expresión génica**

30 Prioridad:

21.11.2001 JP 2001355896

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

18.04.2013

73 Titular/es:

ASTELLAS PHARMA INC. (50.0%)
3-11, Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-ku
Tokyo 103-8411, JP y
SAIGO, KAORU (50.0%)

72 Inventor/es:

TEI, KUMIKO;
KAJI, TAKAHIDE;
UEDA, RYU y
SAIGO, KAORU

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 401 326 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para inhibir la expresión génica.

CAMPO TÉCNICO

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para inhibir la expresión de un gen objetivo mediante la transfección de un polinucleótido bicatenario que comprende ADN y ARN, con una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a al menos una secuencia parcial de nucleótidos del gen objetivo, en una célula.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

- 10 Los procedimientos para inhibir la expresión de un gen objetivo en una célula, tejido u organismo individual incluyen un procedimiento (en lo sucesivo, denominado a menudo como "procedimiento del ARNi") en el que un ARN bicatenario es transfectado en la célula, tejido u organismo individual para acelerar así la degradación del ARNm que tiene homología con su secuencia, y como resultado, inhibir la expresión de un gen que es el molde del ARNm (en lo sucesivo, este efecto se denomina a menudo como "efecto del ARNi"). Hasta la fecha se ha informado de que esta técnica es eficaz en individuos vegetales (Waterhouse, P. M., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 95, 13959 -13964 (1998)), tripanosomas (Ngo, H. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 95, 14687 - 14692 (1998)), hidras (Lohmann J. U., y col., Dev. Biol., 214, 211 - 214 (1999)), planarias (Sánchez Alvarado, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 96, 5049 - 5054 (1999)), nematodos (Fire, A., y col., Nature, 391, 806 - 811 (1998)), Drosophila (Rannerdell, J. R., y col., Cell, 95, 1017 - 1026 (1998); Misquitta, X., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 96, 1451 - 1456 (1999)).

- 15 Además, aunque se ha informado de que el efecto es limitado en vertebrados, se ha informado de que el uso de un ARN bicatenario teniendo cada uno 19 nucleótidos unidos por salientes de 2 nucleótidos en 3' permite la exhibición del efecto del ARNi en células cultivadas de vertebrados (Elbashir, S., y col., Nature, 411, 494 - 498 (2001)). En la identificación de la función génica descrita a continuación, y el procedimiento de cribado de líneas celulares adecuadas para la producción de sustancias útiles, la superioridad del uso del procedimiento del ARNi es apreciable, pero existen problemas ya que el ARN es extremadamente fácilmente degradado por una ribonucleasa, especialmente en estado monocatenario, y porque el coste de la producción es elevado. Por lo tanto, se ha deseado desarrollar un polinucleótido altamente estable que pueda usarse en el procedimiento del ARNi.

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

- 20 Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para inhibir la expresión de un gen objetivo con una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleótidos parcial de un polinucleótido, mediante la introducción en la célula de un polinucleótido bicatenario con una estabilidad mejorada gracias a la incorporación de ADN.

- 25 Como resultado de amplios estudios para conseguir el objeto anterior, los presentes inventores han averiguado que, en una célula cultivada de hámster, CHO-K1, la transfección con un polinucleótido bicatenario de un híbrido de ARN y ARN con una parte de la secuencia de bases de un gen de luciferasa, y con un polinucleótido bicatenario de una quimera de ADN y ARN, se inhibe la expresión del gen de la luciferasa en la célula. Por lo tanto, hemos conseguido la presente invención.

A saber, según la presente invención, se proporcionan las invenciones descritas en los siguientes (1) a (8).

- 30 (1) Un procedimiento para inhibir la expresión de un gen objetivo en una célula que comprende la introducción en la célula de un polinucleótido bicatenario que comprende una quimera de ADN y ARN con una secuencia de polinucleótidos sustancialmente idéntica a al menos una secuencia de nucleótidos parcial del gen objetivo, en el que el polinucleótido bicatenario consiste en 19 - 25 nucleótidos, y al menos la mitad de la región del polinucleótido bicatenario desde el extremo 3' de la hebra antisentido es ARN.

(2) El procedimiento según (1) anterior, en el que el polinucleótido bicatenario comprende una hebra simple autocomplementaria.

- 35 (3) Un procedimiento *in vitro* para inhibir la expresión de dos o más genes objetivo en una célula, que comprende introducir dos o más polinucleótidos bicatenarios que comprenden una quimera de ADN y ARN con una secuencia de polinucleótidos sustancialmente idéntica a al menos una secuencia de nucleótidos parcial del gen objetivo en la célula,

en el que los polinucleótidos bicatenarios consisten en de 19 a 25 nucleótidos, y al menos la mitad de la región del polinucleótido bicatenario desde el extremo 3' de la hebra antisentido es ARN.

- 40 (4) Un procedimiento para analizar la función de un gen, que comprende analizar un cambio fenotípico que aparece en la célula o en el tejido como resultado de la inhibición de la expresión de un gen objetivo mediante el procedimiento según uno cualquiera de los puntos 1 a 3.

(5) Un procedimiento para impartir una propiedad específica a una célula, que comprende inhibir la expresión de un gen objetivo en la célula usando el procedimiento según uno cualquiera de los puntos 1 a 3.

- 45 (6) Un procedimiento para preparar un polinucleótido bicatenario que inhibe la expresión de un gen objetivo en una célula, en el que

el polinucleótido bicatenario comprende una quimera de ADN y ARN con una secuencia de polinucleótidos sustancialmente idéntica a al menos una secuencia de nucleótidos parcial del gen objetivo, y

el polinucleótido bicatenario consiste en de 19 a 25 nucleótidos, y al menos la mitad de la región del polinucleótido bicatenario desde el extremo 3' de la hebra antisentido es ARN.

(7) Una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido bicatenario que comprende una quimera de ADN y ARN con una secuencia de polinucleótidos sustancialmente idéntica a al menos una secuencia parcial de nucleótidos del gen objetivo,

en el que el polinucleótido bicatenario consiste en de 19 a 25 nucleótidos, y al menos la mitad de la región del polinucleótido bicatenario desde el extremo 3' de la hebra antisentido es ARN.

(8) Una composición para su uso como un medicamento, que comprende un polinucleótido bicatenario que comprende una quimera de ADN y ARN con una secuencia de polinucleótidos sustancialmente idéntica a al menos una secuencia parcial de nucleótidos del gen objetivo,

en el que el polinucleótido bicatenario consiste en de 19 a 25 nucleótidos, y al menos la mitad de la región del polinucleótido bicatenario desde el extremo 3' de la hebra antisentido es ARN.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 es un dibujo que ilustra las secuencias de los polinucleótidos monocatenarios sentido consistentes en 21 nucleótidos y los polinucleótidos monocatenarios antisentido consistentes en 21 nucleótidos que se usaron para la preparación de los polinucleótidos bicatenarios. En cada secuencia, la izquierda significa 5' terminal y la derecha significa 3' terminal, y se muestra que la parte con caracteres en negrita es ARN y la parte subrayada es ADN.

La Fig. 2 es un dibujo que ilustra la inhibición de la expresión de un gen *luc* en el caso de que las células CHO-K1 sean transfectadas con los polinucleótidos bicatenarios del híbrido de ADN-ARN.

La Fig. 3 es un dibujo que ilustra la inhibición de la expresión de un gen *luc* en el caso de que las células S2 sean transfectadas con los polinucleótidos bicatenarios en los que cada hebra sentido es ARN y cada hebra antisentido es la quimera de ADN-ARN.

La Fig. 4 es un dibujo que ilustra la inhibición de la expresión de un gen *luc* en el caso de que las células HeLa y HEK293 sean transfectadas con los polinucleótidos bicatenarios en los que cada hebra sentido es ARN y cada hebra antisentido es la quimera de ADN-ARN.

La Fig. 5 es un dibujo que ilustra la inhibición de la expresión de un gen *luc* en el caso de que las células CHO-K1 sean transfectadas con los polinucleótidos bicatenarios que son la quimera de ADN-ARN.

MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

A continuación se describirá la presente invención con más detalle.

(1) Polinucleótido bicatenario que comprende ADN y ARN para su uso en el procedimiento del ARNi

La presente invención es un procedimiento para inhibir la expresión de un gen objetivo en una célula que comprende introducir en la célula un polinucleótido bicatenario que comprende una quimera de ADN y ARN con una secuencia de polinucleótidos sustancialmente idéntica a al menos una secuencia parcial de nucleótidos de un gen objetivo, en el que el polinucleótido bicatenario consiste en de 19 a 25 nucleótidos, y al menos la mitad de la región del polinucleótido bicatenario desde el extremo 3' de la hebra antisentido es ARN.

En la presente invención, el gen objetivo puede ser cualquier gen, siempre que pueda producir ARNm y pueda ser opcionalmente traducido en una proteína en la célula. Específicamente, puede ser endógeno de la célula en la que se va a introducir o un transgen. Además, puede ser un gen ubicado en un cromosoma o uno extracromosómico. Algunos ejemplos de los extracromosómicos incluyen los obtenidos a partir de patógenos, tales como virus, bacterias, hongos o protozoos. La función puede ser conocida o desconocida, o la función puede ser conocida en una célula de otro organismo pero es desconocida en el receptor.

El polinucleótido bicatenario que comprende una quimera de ADN y ARN con una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a al menos una secuencia parcial de nucleótidos de estos genes (en lo sucesivo, esto se denomina a menudo como "polinucleótido bicatenario") comprende una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a una secuencia de 19 - 25 nucleótidos que puede ser cualquier parte de la secuencia de nucleótidos del gen objetivo. En este documento, "sustancialmente idéntica" significa que la secuencia tiene una homología del 50% o más, preferiblemente del 70% o más, más preferiblemente del 80% o más, con la secuencia del gen objetivo. La longitud de la hebra de nucleótidos puede ser cualquier longitud de 19 - 25 nucleótidos en el marco abierto de lectura (ORF) del gen objetivo. Sin embargo, en las células derivadas de mamíferos, se conoce la presencia de un sistema de transducción de señales que se activa en respuesta a un ARN bicatenario con una longitud de hebra de 30 nucleótidos o más. Esto se denomina una respuesta de interferón (Mareus, P. I. y col., Interferon, 5, 115 - 180 (1983)). Cuando se introduce dicho ARN bicatenario en una célula, el inicio de la traducción de muchos genes no es inhibido específicamente por la PKR (cinasa de proteínas sensible a ARNbc: Bass, B. L., Nature, 411, 428 - 429 (2001)), y al mismo tiempo, se activa la ARNasaL a través de la sintetasa de 2',5'-oligoadenilato (Bass, B. Z., Nature, 411, 428 - 429 (2001)) para provocar una degradación no específica del ARN en la célula. Debido a estas reacciones no específicas, se oculta una reacción específica en el gen objetivo. Por lo tanto, en el caso de usar un mamífero, o una célula o un tejido derivado de dicho mamífero, como receptor, se usa un polinucleótido bicatenario consistente en de 19 a 25, preferiblemente de 19 a 23, más preferiblemente de 19 a 21 nucleótidos. El polinucleótido bicatenario de la presente invención no es necesariamente bicatenario en su totalidad, e incluye aquellos con salientes en 5' o 3', y el saliente terminal puede ser de 1 a 5 nucleótidos, preferiblemente de 1 a 3 nucleótidos, más preferiblemente de 2 nucleótidos. Además, el ejemplo más preferible incluye aquel con una estructura que contiene

un saliente en 3' de 2 nucleótidos en el extremo 3' de cada hebra del polinucleótido. Un polinucleótido bicatenario significa un polinucleótido en el que una parte con complementariedad es monocatenaria, pero puede ser un polinucleótido en el que una hebra simple autocomplementaria del polinucleótido ha hibridado consigo misma. Algunos ejemplos de polinucleótido monocatenario autocomplementario incluyen aquellos con una repetición invertida, y similares.

Adicionalmente, como mezclas de ADN y ARN, se usa un tipo híbrido de una hebra de ADN y una hebra de ARN, un tipo quimera de ADN y ARN, o similares. El híbrido de una hebra de ADN y una hebra de ARN puede ser cualquiera siempre que tenga una actividad que inhiba la expresión del gen objetivo cuando un receptor es transfectado con él, pero preferiblemente se usa aquel en el que la hebra sentido es ADN y la hebra antisentido es ARN. También, el tipo quimera de ADN y ARN puede ser cualquiera siempre que tenga una actividad para inhibir la expresión del gen objetivo cuando un receptor es transfectado con él.

Con objeto de mejorar la estabilidad del polinucleótido bicatenario es preferible que contenga tanto ADN como sea posible. Sin embargo, de entre los polinucleótidos bicatenarios de tipo quimera de la presente invención, es preferible determinar adecuadamente una secuencia que es necesario que sea ARN para inhibir la expresión del gen objetivo dentro de un intervalo en el que se produce la inhibición de la expresión, llevando a cabo un análisis de un grado de inhibición de la expresión del gen objetivo, según se describe a continuación. De este modo, también puede identificarse un dominio funcional de ARN en el procedimiento del ARNi. Como ejemplo preferido del tipo quimera así determinado, puede mencionarse aquel en el que una región parcial secuencia arriba del polinucleótido bicatenario es ARN, por ejemplo. En este documento, la región parcial secuencia arriba significa el extremo 5' de la hebra sentido y el extremo 3' de la hebra antisentido. La región parcial secuencia arriba significa preferiblemente un dominio de 9 a 13 nucleótidos desde el extremo de la secuencia arriba del anterior polinucleótido bicatenario. Además, algunos ejemplos preferidos de dicho polinucleótido bicatenario de tipo quimera incluyen un polinucleótido bicatenario con una longitud de hebra de 19 a 21 nucleótidos en el que al menos la mitad de la región secuencia arriba del polinucleótido es ARN y la otra es ADN. Adicionalmente, en dicho polinucleótido bicatenario, el efecto inhibidor de la expresión del gen objetivo es mucho mayor cuando toda la hebra antisentido es ARN.

El procedimiento de preparación del polinucleótido bicatenario no está particularmente limitado, pero es preferible usar un procedimiento de síntesis química conocido *per se*. En la síntesis química se sintetizan por separado polinucleótidos monocatenarios complementarios, y estos hibridan entre sí mediante un procedimiento apropiado, mediante el cual puede obtenerse uno bicatenario. Un ejemplo específico del procedimiento de hibridación incluye un procedimiento en el que los polinucleótidos monocatenarios sintetizados se mezclan en una proporción molar de preferiblemente al menos aproximadamente 3:7, más preferiblemente de aproximadamente 4:6, y muy preferiblemente sustancialmente una cantidad equimolar (es decir, una proporción molar de aproximadamente 5:5) y se calientan a una temperatura en la cual se disocia el bicatenario, y después se enfría gradualmente la totalidad. El polinucleótido bicatenario hibridado se purifica mediante un procedimiento empleado habitualmente conocido *per se*, si fuera necesario. Algunos ejemplos de los procedimientos de purificación utilizables incluyen un procedimiento en el que se realiza una confirmación con gel de agarosa y el polinucleótido monocatenario remanente es eliminado opcionalmente mediante, por ejemplo, su degradación con una enzima apropiada.

Además, en el caso de que se prepare un polinucleótido monocatenario con una repetición invertida como el polinucleótido monocatenario que tiene autocomplementariedad, el polinucleótido se prepara mediante un procedimiento de síntesis química o similares, y después se hibrida una secuencia complementaria de la misma forma a la descrita anteriormente.

(2) Transfección de una célula con un polinucleótido bicatenario e inhibición de la expresión del gen objetivo

El receptor para la transfección con el polinucleótido bicatenario así preparado puede ser cualquiera, siempre que el gen objetivo pueda ser transcrito en ARN o traducido en una proteína en la célula. Específicamente, el receptor para su uso en la presente invención significa una célula.

La célula para su uso en la presente invención puede ser cualquiera de la línea germinal o de células somáticas, células totipotentes o pluripotentes, células en división o en reposo, células de parénquima o de epitelio, células inmortalizadas o transformadas, o similares. Específicamente, la célula puede ser una célula no diferenciada tal como una célula madre, células derivadas de órganos u de tejidos o células diferenciadas de los mismos. Además, algunos ejemplos de las anteriores células diferenciadas incluyen adipocitos, fibroblastos, miocitos, cardiomiocitos, endotelio, neuronas, gliales, células sanguíneas, megacariocitos, linfocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, leucocitos, granulocitos, queratinocitos, condriocitos, osteoblastos, osteoclastos, hepatocitos y células de glándulas endocrinas o exocrinas. Como un ejemplo específico de dichas células se usan preferiblemente células CHO-K1 (Banco de Células RIKEN), células S2 de *Drosophila* (Schneider, I., y col., *J. Embryol. Exp. Morph.*, 27, 353 - 365 (1972)), células HeLa humanas (ATCC: CCL-2), células HEK293 humanas (ATCC: CRL-1573), o similares.

Adicionalmente, el organismo individual que se va a usar como receptor en la presente divulgación incluye específicamente aquellos que pertenecen a vegetales, animales, protozoos, bacterias, virus u hongos. El vegetal puede ser una monocotiledónea, una dicotiledónea o una gimnosperma; el animal puede ser un vertebrado o un invertebrado. Los microbios preferidos como receptores de la presente invención son aquellos usados en la agricultura o en la industria, y aquellos que son patógenos para vegetales o animales. Algunos hongos incluyen organismos con ambas morfologías de mohos y levaduras. Algunos ejemplos de animales vertebrados incluyen peces y mamíferos, tales como ganado, cebra, cerdo, oveja, hámster, ratón, rata, mono y seres humanos; algunos animales invertebrados incluyen nematodos y otros gusanos, *Drosophila* y otros insectos.

Como procedimiento para transfectar el polinucleótido bicatenario en un receptor se usa un procedimiento con fosfato cálcico, un procedimiento mediante electroporación, un procedimiento mediante lipofección, una infección vírica, una inmersión en una disolución con un polinucleótido bicatenario, un procedimiento de transformación, o similar, en el caso de que el receptor sea una célula o un tejido.

La cantidad de polinucleótido bicatenario para la transfección puede elegirse adecuadamente dependiendo del receptor y del gen objetivo, pero es preferible transfectar el polinucleótido en una cantidad suficiente para transfectar al menos una copia por célula. Específicamente, en el caso de que el receptor sea una célula humana cultivada y el polinucleótido bicatenario sea transfectado mediante un procedimiento con fosfato cálcico, por ejemplo, la cantidad es preferiblemente de 0,1 a 1.000 nM.

En este documento también pueden transfectarse simultáneamente dos o más tipos de polinucleótidos bicatenarios. En este caso, se espera la inhibición de la expresión de dos o más genes objetivo en la célula transfectada con los polinucleótidos (en lo sucesivo, esto se denomina "receptor transfectado"). En la presente invención, "inhibición de la expresión del gen objetivo" no sólo significa una inhibición completa de la expresión, sino también una inhibición del 20% o más como una cantidad expresada de ARNm o de una proteína. El grado de inhibición de la expresión del gen objetivo puede medirse comparando la acumulación de ARN del gen objetivo con las cantidades de la proteína codificada producidas por el gen objetivo en el receptor transfectado con el polinucleótido bicatenario y en el receptor no transfectado. La cantidad de ARNm puede medirse mediante un procedimiento empleado habitualmente conocido *per se*. Específicamente, se realiza mediante el análisis de hibridación Northern, una PCR cuantitativa de transcripción inversa, una hibridación *in situ* o similares. Además, la cantidad de proteína producida puede medirse mediante un análisis por inmunotransferencia Western o determinando la actividad enzimática de la proteína codificada por el gen objetivo.

(3) Procedimiento para analizar la función génica mediante la inhibición de la expresión del gen en el receptor transfectado

Mediante el análisis del cambio fenotípico que aparece en el receptor transfectado como resultado de la inhibición de la expresión de un gen en el receptor transfectado por el polinucleótido bicatenario según la presente invención, es posible identificar la función del gen objetivo del polinucleótido bicatenario transfectado.

En este documento, el gen objetivo puede ser un gen cuya función es conocida o un gen cuya función es desconocida en el receptor. El polinucleótido bicatenario correspondiente al gen objetivo se prepara según se describió en (1) anteriormente, y se transfecta en el receptor descrito en (2) de una manera similar. El fenotipo cuyo cambio se va a analizar en el receptor transfectado no está particularmente limitado, y algunos ejemplos de los mismos incluyen comportamientos de un organismo, tales como la morfología del receptor transfectado, una cantidad de una sustancia en el receptor transfectado, una cantidad de una sustancia secretada por el receptor transfectado, el comportamiento dinámico de una sustancia en el receptor transfectado, la adhesión entre receptores transfectados, la movilidad del receptor transfectado o la vida del receptor transfectado. En el caso de que la función del gen objetivo sea conocida en el otro receptor, es preferible analizar un fenotipo relacionado con la función. Como medio para analizar el cambio en el fenotipo, en el caso de analizar un cambio morfológico en el receptor transfectado, es posible usar un procedimiento de detección microscópica o visual. Además, en el caso del ARNm como sustancia en el receptor transfectado, algunos procedimientos de análisis de su cantidad incluyen hibridación Northern, PCR cuantitativa de transcripción inversa, hibridación *in situ*, o similares. En el caso de una proteína, algunos procedimientos para analizar la cantidad incluyen el análisis por inmunotransferencia Western con un anticuerpo que usa una proteína codificada por el gen objetivo como antígeno, un procedimiento para medir la actividad enzimática de la proteína codificada por el gen objetivo. Dado que el cambio fenotípico que aparece únicamente en el receptor transfectado así analizado se produce como resultado de la inhibición de la expresión del gen objetivo, éste puede ser identificado como una función del gen objetivo.

(4) Procedimiento para impartir una propiedad específica a la célula mediante la inhibición de la expresión del gen objetivo usando un polinucleótido bicatenario

Mediante la inhibición de la expresión del gen objetivo usando el polinucleótido bicatenario de la presente invención puede impartirse una propiedad específica a la célula. La propiedad específica significa una propiedad que aparece en el receptor transfectado como resultado de la inhibición de la expresión del gen objetivo. En este documento, el gen objetivo puede ser un gen en el que una propiedad impartida al receptor transfectado por la inhibición de su expresión ya está clarificada, o la función del mismo o la función en el receptor transfectado es desconocida. Con respecto al gen objetivo cuya función es desconocida, seleccionando un fenotipo deseado de entre los fenotipos mostrados por el receptor transfectado después de la transfección del mismo con el polinucleótido bicatenario, puede impartirse una propiedad deseada al receptor transfectado.

Algunos ejemplos específicos de la propiedad deseada que se va a impartir al receptor transfectado incluyen una función productiva intracelular, una función de inhibición de la secreción extracelular, una función de reparación de una lesión de una célula o de ADN, una función de resistencia a una enfermedad específica, y similares. Específicamente, en el caso de que el receptor transfectado sea un individuo vegetal, o similares, el gen objetivo incluye genes asociados con enzimas relacionadas con la maduración de los frutos, proteínas estructurales vegetales, patogenicidad, o similares.

El caso en el que la inhibición de la expresión del gen objetivo tiene una función de resistencia ante una enfermedad específica, es el caso en el que el aumento de la expresión de una proteína específica resulta ser la causa de una enfermedad específica, y el gen objetivo incluye un gen que codifica para la proteína anterior, un gen que codifica para una proteína con una función de control de la expresión de la proteína anterior, y similares. Como ejemplo específico, el gen objetivo es un gen necesario para la retención de un fenotipo carcinógeno/oncógeno, y el receptor es una célula cancerosa, un tejido tumoral, o similares.

Dado que el polinucleótido bicatenario dirigido a dicho gen objetivo inhibe la expresión de la proteína codificada por el gen objetivo, el polinucleótido puede usarse como un agente para tratar o prevenir enfermedades asociadas con el gen objetivo. En el caso de que el polinucleótido bicatenario se use como principio activo del anterior agente farmacéutico, el polinucleótido puede usarse individualmente, pero también puede usarse como una composición farmacéutica formulada con un portador farmacéuticamente aceptable. La proporción entre el principio activo con

respecto al portador puede variar en este momento entre el 1 y el 90% en peso. Además, dicho agente farmacéutico puede administrarse en varias formas, y estas formas de administración incluyen la administración oral con comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos, jarabes, o similares, o la administración parenteral con inyecciones, gotas, liposomas, supositorios, o similares. Además, su dosis puede elegirse adecuadamente dependiendo del síntoma, la edad, el peso corporal, y similares.

El receptor transfectado con el polinucleótido bicatenario dirigido a dicho gen se elige dependiendo del fenotipo predicho que está asociado con la inhibición de la expresión del gen. Además, en el polinucleótido bicatenario para la transfección, cuando una secuencia que codifica para un marcador genético específico, por ejemplo, una proteína fluorescente, está conectada, es posible la selección basándose en un grado de inhibición de la expresión de la proteína fluorescente transfectada junto con el polinucleótido bicatenario en el receptor. De éstos, en el caso de que se use como gen objetivo un gen que funciona en la supresión tumoral, los caracteres de la célula que se van a seleccionar incluyen los caracteres de un tumor maligno, tales como el aumento de la capacidad de crecimiento, la disminución de la capacidad de adhesión celular o el aumento de la capacidad de motilidad (metastásica), y similares. Además, en el caso de que se use como gen objetivo un gen que controla el ritmo biológico, los caracteres de la célula que se van a seleccionar incluyen la desaparición del ritmo circadiano y similares. Adicionalmente, en el caso de que se use como gen objetivo un gen implicado en la reparación de lesiones al ADN inducidas por un mutágeno medioambiental, los caracteres de la célula que se van a seleccionar incluyen la exhibición de sensibilidad frente al mutágeno, y similares.

El receptor transfectado elegido puede establecerse y obtenerse mediante una tecnología de clonación conocida *per se*, como una línea que sea adecuada para cada receptor. Específicamente, en el caso de que el receptor sea una célula, el receptor transfectado puede establecerse y obtenerse como una línea celular mediante un procedimiento de dilución limitante, un procedimiento con un marcador resistente a fármacos, o similares, que son procedimientos de establecimiento de líneas celulares en células cultivadas habitualmente. El receptor transfectado que es obtenible en la presente invención y al que se imparte una función específica, puede usarse como una línea celular con un aumento en la eficacia de producción o de secreción de una sustancia útil, una línea celular que muestra una elevada sensibilidad ante un factor medioambiental que produce una lesión en las células, en el ADN, o similares, o un modelo para tratar una enfermedad, que muestra un carácter asociado con una enfermedad.

De éstos, se describirá el procedimiento de obtención de una línea celular como modelo para tratar una enfermedad como ejemplo adicional aplicado específico de la presente divulgación. Como gen objetivo puede mencionarse un gen cuya disminución en la cantidad expresada o cuya deficiencia resulta ser la causa de una enfermedad. Específicamente, puede mencionarse el gen PS1 en la enfermedad de Alzheimer, los genes XPA/XPD/XPF/XFG y el gen de la polimerasa η de ADN en el síndrome de xerodermia pigmentaria, el gen APC en el cáncer de colon, los genes BRCA1/BRCA2 en el cáncer de mama, los genes INS/INSR en la diabetes, y similares.

Mediante la transfección de, por ejemplo, una célula cultivada derivada de un ser humano, con un polinucleótido bicatenario que comprende ADN y ARN con una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a al menos una secuencia parcial de nucleótidos de estos genes humanos, puede obtenerse una célula modelo de una enfermedad humana.

Adicionalmente, poniendo en contacto una sustancia de prueba con la célula a la que se imparte la propiedad específica, y analizando si aparece o no el síntoma de la enfermedad asociada con el gen o el cambio en el carácter, es posible cribar un agente para tratar y/o prevenir la enfermedad anterior.

En el caso de que la sustancia elegida mediante dicho cribado se use como principio activo en el anterior agente farmacéutico, la sustancia puede usarse individualmente, pero también puede usarse como una composición farmacéutica formulada con un portador farmacéuticamente aceptable. La proporción entre el principio activo con respecto al portador puede variar en este momento entre el 1 y el 90% en peso. Además, dicho agente farmacéutico puede administrarse en varias formas, y estas formas de administración incluyen la administración oral con comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos, jarabes, o similares, o la administración parenteral con inyecciones, gotas, liposomas, supositorios, o similares. Además, su dosis puede elegirse adecuadamente dependiendo del síntoma, la edad, el peso corporal, y similares.

(5) Procedimiento de uso de la selección primaria usando el grado de inhibición de la expresión del gen indicador como índice

Los procedimientos de la presente invención descritos en los anteriores (1) a (4) son procedimientos para transfectar un receptor con un polinucleótido bicatenario que comprende ADN y ARN con una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a al menos una secuencia parcial de nucleótidos de un gen objetivo. Sin embargo, en un procedimiento de la presente divulgación, transfectando adicionalmente (a) un vector de expresión que contiene ADN que codifica para una proteína indicadora, (b) un polinucleótido bicatenario que comprende ADN y ARN con una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a al menos una secuencia parcial de nucleótidos que codifica para la proteína indicadora, y cribando de forma primaria el receptor transfectado usando una cantidad de señal generada por la proteína indicadora como medida, sólo puede analizarse un receptor transfectado en el que está inhibida la expresión del gen del receptor transfectado, por lo que puede realizarse un análisis eficaz.

Como ejemplo específico adicional de la presente divulgación, se describirá el siguiente caso en el que se usa como receptor una célula cultivada derivada de un animal vertebrado, y se usa como proteína indicadora una proteína fluorescente. Se transfecta una célula cultivada derivada de un animal vertebrado con un vector de expresión que comprende ADN que codifica para una proteína fluorescente, y la célula se cultiva, seguido de la selección de la célula con una cantidad de señal generada por la proteína indicadora con una intensidad específica o más. La célula elegida en este documento es transfectada adicionalmente con el polinucleótido bicatenario que comprende ADN y ARN con una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a al menos una secuencia parcial de ADN que codifica para la proteína indicadora, y la célula se cultiva, seguido del análisis

del grado de inhibición de la expresión del gen indicador basado en el grado de atenuación de la fluorescencia generada por la proteína indicadora.

Dado que cada uno de dichos cribados primarios confirma la transfección del receptor con el bicatenario y la aparición de la inhibición de la expresión del gen objetivo en el receptor transfectado, la proteína indicadora debería ser una proteína que permita la correlación entre la cantidad de proteína y la cantidad de señal generada por la misma. Algunos ejemplos específicos de dicha proteína incluyen la proteína luciferasa.

Adicionalmente, en el caso de medir el grado de inhibición de la expresión del gen objetivo, también es posible calcular la cantidad de proteína codificada por el gen objetivo basándose en la cantidad de proteína indicadora expresada.

(6) Kit para su uso en la presente divulgación

El kit para llevar a cabo los procedimientos descritos en (1) a (5) anteriores contiene un polinucleótido bicatenario, un vector que comprende ADN que codifica para una proteína indicadora, un polinucleótido bicatenario que comprende ADN y ARN con una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a al menos una secuencia parcial de nucleótidos del gen indicador, reactivos tales como enzimas y tampones, reactivos para transfectar los polinucleótidos, y similares. No es necesario que el kit de la presente divulgación contenga todos estos reactivos, y el kit puede contener cualquier combinación de los reactivos siempre que sea un kit capaz de usarse en los anteriores procedimientos de la presente invención.

EJEMPLOS

Lo siguiente describirá la presente invención más específicamente con referencia a los Ejemplos, pero los siguientes Ejemplos deberían interpretarse como una ayuda para obtener un reconocimiento específico de la presente invención, y por lo tanto el ámbito de la presente invención no está en modo alguno limitado por los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1 Inhibición de la expresión del gen objetivo por un híbrido bicatenario de ADN-ARN transfectado en células CHO-K1

(1) Preparación del polinucleótido bicatenario de tipo híbrido de ADN-ARN

Se usó un gen de luciferasa de *Photinus pyralis* (gen *luc* de *P. pyralis*: número de acceso: U47296) como gen objetivo, y se usó el vector de control pGL3 (elaborado por Promega) como el vector de expresión que lo comprendía. El fragmento génico del gen *luc* de *P. pyralis* está entre un promotor de SV40 y una señal de poli A en el vector. Se usó un gen de luciferasa de *Renilla reniformis* como gen indicador, y se usó pRL-TK (elaborado por Promega) como el vector de expresión que lo comprendía.

La hebra sentido de 21 nucleótidos para su uso en la preparación del polinucleótido bicatenario usado en el presente Ejemplo está representada por la SEQ. ID. N°: 1 (ADN) o la SEQ. ID. N°: 2 (ARN). Además, la hebra antisentido está representada por la SEQ. ID. N°: 3 (ADN) o la SEQ. ID. N°: 4 (ARN). Con respecto a estas secuencias, se preparó un polinucleótido monocatenario de tipo quimera de ADN o ARN, según se muestra en la Fig. 1. La síntesis de estos polinucleótidos fue confiada a Genset K. K. a través de Hitachi Instruments Service Co., Ltd. La secuencia del polinucleótido con la hebra sentido se corresponde con los nucleótidos 38° a 58° del gen *luc* de *P. pyralis* (longitud total de 1.653 pares de bases), que es un gen objetivo en el vector de control pGL3.

El ARN bicatenario, el ADN bicatenario y el híbrido bicatenario de ADN-ARN usados para la inhibición de la expresión del gen *luc* de *P. pyralis* se prepararon hibridando la hebra sentido FLs1 (ARN) o DFLs1 (ADN) con la hebra antisentido Fla2 (ARN) o DFLa2 (ADN). La hibridación se realizó calentando el polinucleótido monocatenario sentido y el polinucleótido monocatenario antisentido en líquido de reacción con Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y NaCl 20 mM a 90°C durante 2 minutos, e incubando adicionalmente el conjunto a 37°C durante 1 hora, seguido de dejarlo reposar hasta que se enfrió hasta la temperatura ambiente. Así se hibridaron la hebra sentido y la hebra antisentido para formar un polinucleótido bicatenario. La formación del polinucleótido bicatenario se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TBE. En las condiciones anteriores, prácticamente todos los polinucleótidos monocatenarios hibridaron para formar un polinucleótido bicatenario.

(2) Transfección del gen objetivo, del gen indicador y del polinucleótido bicatenario en células cultivadas

Se usaron células CHO-K1 (Banco de Células RIKEN) como células cultivadas, y como medio se usó medio de Eagle modificado por Dulbecco (elaborado por Gibco BRL) complementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado (elaborado por Mitsubishi Kasei Corporation), y se usaron 10 unidades/ml de penicilina (elaborada por Meiji) y 50 µg/ml de estreptomycin (elaborada por Meiji) como antibióticos. Las células se cultivaron a 37°C en presencia de un 5% de CO₂.

Las células CHO-K1 se dispersaron en una placa de 24 pocillos a una concentración de $0,3 \times 10^6$ células/ml. Después de 1 día, se transfectaron 1,0 µg de ADN de Control pGL3, 0,5 µg de ADN de pRL-TK, y 0,01, 0,1, 1, 10 ó 100 nM de cada polinucleótido bicatenario mediante el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico (Saibo Kogaku Handbook, editado por Toshio Kuroki y col., Youdosha (1992)).

(3) Medición de la expresión génica en células cultivadas

Las células preparadas en el Ejemplo 1 (2) anterior se recogieron después de 20 horas y se midieron las cantidades expresadas (actividad de la luciferasa) de dos tipos de luciferasa (*luc* de *Photinus pyralis* y *luc* de *Renilla reniformis*) usando el Sistema de Ensayo de Doble Indicador de luciferasa (elaborado por Promega). La medición de la fluorescencia se llevó a cabo usando un luminómetro Lumat LB9507 (EG&G Berthold).

La expresión del gen transfectado en células CHO-K1 fue inhibida por los polinucleótidos bicatenarios de tipo híbrido de ADN-ARN (Fig. 2). Todos los valores muestran una actividad relativa de los productos del gen objetivo frente a las cantidades expresadas del gen indicador (actividad enzimática de la luciferasa). Estos muestran los valores medios de experimentos por triplicado, y las barras verticales de las figuras representan la desviación estándar. En comparación con los grupos de control, en los que no se transfectó polinucleótido bicatenario, se observó una inhibición del 96% de la expresión del gen objetivo en el caso de los grupos transfectados con ARN bicatenario cuando el polinucleótido bicatenario se añadió en una cantidad de 100 nM, y se observó una inhibición del 80% en el grupo en el que se transfectó el polinucleótido bicatenario con una hebra sentido de ADN y una hebra antisentido de ARN. Esto es, incluso cuando el lado sentido del polinucleótido bicatenario era ADN, se probó que la expresión génica puede ser inhibida en células en CHO-K1 cuando el lado antisentido era ARN, aunque el efecto era débil en comparación con el ARN bicatenario.

Ejemplo 2 Inhibición de la expresión del gen objetivo por un polinucleótido bicatenario de tipo quimera de ADN-ARN transfectado en células S2 de Drosophila

(1) Preparación del polinucleótido bicatenario de tipo quimera de ADN-ARN

Se usó un gen de luciferasa de *Photinus pyralis* (gen *luc* de *P. pyralis*: número de acceso: U47296) como gen objetivo. Además, se usó un gen de luciferasa de *Renilla reniformis* como gen indicador. Adicionalmente, también se usaron los vectores de expresión descritos en el Ejemplo 1 como vectores de expresión.

La hebra sentido de 21 nucleótidos para su uso en la preparación del polinucleótido bicatenario usado en el presente Ejemplo está representada por la SEQ. ID. N°: 1 (ADN) o la SEQ. ID. N°: 2 (ARN). Además, la hebra antisentido está representada por la SEQ. ID. N°: 3 (ADN) o la SEQ. ID. N°: 4 (ARN). Con respecto a estas secuencias, se prepararon polinucleótidos monocatenarios de tipo quimera de ADN o de ARN, según se muestra en la Fig. 1. La síntesis de estos polinucleótidos fue confiada a Genset K. K. a través de Hitachi Instruments Service Co., Ltd.

Los polinucleótidos bicatenarios de tipo quimera de ADN-ARN usados para la inhibición de la expresión del gen *luc* de *P. pyralis* se prepararon hibridando la hebra sentido FLs1 (ARN monocatenario) con hebras antisentido Fla2-1, Fla2-2, Fla2-3, Fla2-4, Fla2-5, Fla2-6, Fla2-7, Fla2-8, Fla2-9 y Fla2-10 (polinucleótidos monocatenarios de tipo quimera de ADN-ARN), respectivamente. La hibridación se realizó mediante reacción del ARN monocatenario sentido y el polinucleótido monocatenario antisentido de tipo quimera de ADN-ARN de una manera similar a la del Ejemplo 1. La producción del polinucleótido bicatenario se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TBE.

(2) Transfección del gen objetivo, del gen indicador y del polinucleótido bicatenario de tipo quimera de ADN-ARN en células cultivadas

Se usaron células S2 de *Drosophila* (Schneider, I., y col., J. Embryol. Exp. Morph., 27, 353 - 365 (1972)) como células cultivadas, y como medio se usó medio de Eagle modificado por Schneider (elaborado por Gibco BRL) complementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado (elaborado por Mitsubishi Kasei Corporation), y se usaron 10 unidades/ml de penicilina (elaborada por Meiji) y 50 µg/ml de estreptomycin (elaborada por Meiji) como antibióticos. Las células se cultivaron a 25°C en presencia de un 5% de CO₂.

Las células S2 se dispersaron en una placa de 24 pocillos a una concentración de $1,0 \times 10^6$ células/ml. Después de 1 día, se transfectaron 1,0 µg de ADN de Control pGL3, 0,05 µg de ADN de pRL-TK, y 100 nM de cada polinucleótido bicatenario mediante el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico (Saibo Kogaku Handbook, editado por Toshio Kuroki y col., Yodosha (1992)).

(3) Medición de la expresión génica en células cultivadas

Las células preparadas en el Ejemplo 2 (2) anterior se recogieron después de 20 horas y se midieron las cantidades expresadas de dos tipos de proteínas luciferasa usando el Sistema de Ensayo de Doble Indicador de luciferasa (elaborado por Promega). La medición de la fluorescencia se llevó a cabo usando un luminómetro Lumat LB9507 (EG&G Berthold).

La expresión del gen transfectado en células S2 fue inhibida por los polinucleótidos bicatenarios de tipo quimera de ADN-ARN de 21 nucleótidos, y se prepararon de forma que el lado sentido estuviera fijado al ARN y el lado antisentido fuera un polinucleótido de tipo quimera de ADN y ARN (Fig. 3). Todos los valores se determinaron como la actividad relativa de los productos del gen objetivo frente a las cantidades expresadas de los genes indicadores (actividad enzimática de la luciferasa) y los valores se mostraron como los valores medios de experimentos por triplicado, y las desviaciones estándar. En comparación con los grupos de control, en los que no se transfectó polinucleótido bicatenario, el polinucleótido bicatenario con el lado antisentido Fla2, Fla2-2, Fla2-3, Fla2-8 o Fla2-9 inhibió fuertemente la expresión génica hasta un grado aproximadamente igual al 96%, 92%, 94%, 91% o 96%, respectivamente. El polinucleótido con el lado antisentido de Fla2-5 mostró un efecto inhibidor relativamente fuerte del 73%. Los polinucleótidos con el lado antisentido de Fla2-1, Fla2-4, Fla2-6, Fla2-7 o Fla2-10 no mostraron efecto inhibidor o un efecto extremadamente débil, incluso cuando se observó inhibición. Una característica común de los polinucleótidos bicatenarios que muestran un fuerte efecto es que dos nucleótidos en las posiciones 13ª y 14ª a partir del extremo 5' de la secuencia de la hebra antisentido son ARN (UA). Por otro lado, en el polinucleótido bicatenario que muestra un efecto débil, ambos nucleótidos correspondientes de la secuencia de la hebra antisentido eran ADN (TA). Por lo tanto, en el presente Ejemplo que usa células S2, se sugiere que estos dos nucleótidos son un dominio necesario suficiente para mostrar un fuerte efecto de ARNi.

En el presente Ejemplo, el efecto de ARNi se observó incluso cuando se transfectó con un polinucleótido bicatenario en el que la parte que contiene este dominio de la secuencia antisentido estaba reservada como ARN y la otra parte fue sustituida por ADN. Se considera que los polinucleótidos bicatenarios de 21 nucleótidos y preparados mediante la identificación o la predicción de un dominio necesario y suficiente para la exhibición del efecto de ARNi según el

procedimiento usado en el presente Ejemplo y la otra técnica, reservando una parte que contiene este dominio como ARN, y sustituyendo la otra parte por ADN, son capaces de inhibir la expresión del gen objetivo mediante el efecto del ARNi.

Ejemplo 3 Inhibición de la expresión génica por un polinucleótido bicatenario de tipo quimera de ADN-ARN transfectado en células HeLa humanas y en células HEK293 humanas

(1) Preparación del polinucleótido bicatenario de tipo quimera de ADN-ARN

Se usó un gen *luc* de *P. pyralis* como gen objetivo, y se usó el vector de control pGL-3 (elaborado por Promega) como vector de expresión que lo contiene. Además, se usó un gen de *luc* de *Renilla reniformis* (elaborado por Promega) como gen indicador, y se usó pRL-TK (elaborado por Promega) como vector de expresión que lo contiene.

La hebra sentido de 21 nucleótidos para su uso en la preparación del polinucleótido bicatenario usado en el presente Ejemplo está representada por la SEQ. ID. N°: 1 (ADN) o la SEQ. ID. N°: 2 (ARN). Además, la hebra antisentido está representada por la SEQ. ID. N°: 3 (ADN) o la SEQ. ID. N°: 4 (ARN). Con respecto a estas secuencias, se prepararon polinucleótidos monocatenarios de tipo quimera de ADN o de ARN, según se muestra en la Fig. 1. La síntesis de estos polinucleótidos fue confiada a Genset K. K. a través de Hitachi Instruments Service Co., Ltd. La secuencia del polinucleótido con la hebra sentido se corresponde con los nucleótidos 38° a 58° del gen *luc* de *P. pyralis* (longitud total de 1.653 pares de bases), que es un gen objetivo en el vector de control pGL3.

Los polinucleótidos bicatenarios de tipo quimera de ADN-ARN usados para la inhibición de la expresión del gen *luc* de *P. pyralis* se prepararon hibridando la hebra sentido FLs1-1 o FLs1-2 (polinucleótido monocatenario de tipo quimera de ADN-ARN) con la hebra antisentido Fla2 (ARN monocatenario). La hibridación se realizó haciendo reaccionar el polinucleótido monocatenario de tipo quimera de ADN-ARN y el ARN antisentido monocatenario de una forma similar a la del Ejemplo 1. La producción del polinucleótido bicatenario se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TBE.

(2) Transfección del gen objetivo, del gen indicador y del polinucleótido bicatenario de tipo quimera de ADN-ARN en células cultivadas

Se usó el control pGL3 descrito en (1) anterior como vector de expresión recombinante para expresar el gen objetivo, y se usó el pRL-TK descrito en (1) anterior como un vector de expresión del gen indicador. Se usaron células HeLa humanas (ATCC: CCL-2) y células HEK293 humanas (ATCC: CRL-1573) como células cultivadas, y como medio se usó medio de Eagle modificado por Dulbecco (elaborado por Gibco BRL) complementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado (elaborado por Mitsubishi Kasei Corporation), y se usaron 10 unidades/ml de penicilina (elaborada por Meiji) y 50 µg/ml de estreptomycin (elaborada por Meiji) como antibióticos. Las células se cultivaron a 37°C en presencia de un 5% de CO₂.

Las células HeLa y las células HEK293 se dispersaron en una placa de 24 pocillos a una concentración de 0,5 x 10⁶ células/ml y de 0,25 x 10⁶ células/ml, respectivamente. Después de 1 día, se transfectaron 1,0 µg de ADN de Control pGL3, 1,0 µg de ADN de pRL-TK, y 100 nM de cada polinucleótido bicatenario de tipo quimera de ADN-ARN mediante el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico.

(3) Medición de la expresión génica en células cultivadas

Como en el Ejemplo 1, las células preparadas en el Ejemplo 3 (2) anterior se recogieron después de 20 horas y se midieron las cantidades expresadas de dos tipos de proteínas luciferasa usando el Sistema de Ensayo de Doble Indicador de luciferasa. La medición de la fluorescencia se llevó a cabo usando un luminómetro Lumat LB9507 (EG&G Berthold).

La expresión del gen transfectado en células HeLa y en células HEK293 fue inhibida por los polinucleótidos bicatenarios de 21 nucleótidos, y se prepararon de forma que el lado antisentido de la doble hebra estuviera fijado al ARN y el lado sentido se preparó como un polinucleótido quimera de ADN y ARN (Fig. 4). Todos los valores se determinaron como la actividad relativa de los productos del gen objetivo frente a las cantidades expresadas de los genes indicadores (actividad enzimática de la luciferasa) y los valores se mostraron como los valores medios de experimentos por triplicado, y las desviaciones estándar. En comparación con los grupos de control, en los que no se transfectó polinucleótido bicatenario, los grupos en los que se transfectaron los polinucleótidos con el lado sentido de FLs1-2 entre los polinucleótidos bicatenarios mostraron un fuerte efecto inhibidor del 90% (en células HeLa) o del 55% (en células HEK293), que era igual al del caso de los grupos en los que se transfectó el ARN bicatenario. En los FLs1-2, 12 nucleótidos de la región 5' de la secuencia son ARN, y los nucleótidos del otro dominio, son ADN. Por lo tanto, en el presente Ejemplo que usa células HeLa y células HEK293, se sugiere que la totalidad de los 12 nucleótidos de la hebra sentido o una parte de la misma es un dominio necesario suficiente para la exhibición de un fuerte efecto de ARNi cuando la hebra antisentido está fijada al ARN.

Ejemplo 4 Inhibición de la expresión génica por un polinucleótido bicatenario de tipo quimera de ADN-ARN transfectado en células CHO-K1

(1) Preparación del polinucleótido bicatenario de tipo quimera de ADN-ARN

Se usó un gen *luc* de *P. pyralis* como gen objetivo, y se usó el vector de control pGL-3 (elaborado por Promega) como vector de expresión que lo contiene. Además, se usó un gen de *luc* de *Renilla reniformis* como gen indicador, y se usó pRL-TK (elaborado por Promega) como vector de expresión que lo contiene.

La secuencia de la hebra sentido de 21 nucleótidos para su uso en la preparación del polinucleótido bicatenario usado en el presente Ejemplo se corresponde con los polinucleótidos del 8° al 28° (8 - 28), del 38° al 58° (38 - 58) y

del 1087° al 1107° (1087 - 1107) del gen *luc* de *P. pyralis* (longitud total de 1.653 pares de bases), que es un gen objetivo en el vector de control pGL3.

Con respecto a cada secuencia de bases, la hebra sentido de 8 - 28 está representada por la SEQ. ID. N°: 5 (ADN) o la 6 (ARN), y la hebra antisentido de la misma está representada por la SEQ. ID. N°: 7 (ADN) o la 8 (ARN). La hebra sentido de 38 - 58 es aquella representada por la SEQ. ID. N°: 1 (ADN) o la 2 (ARN), y la hebra antisentido de la misma está representada por la SEQ. ID. N°: 3 (ADN) o la 4 (ARN). Además, esta hebra sentido de 1087 - 1107 está representada por la SEQ. ID. N°: 9 (ADN) o la 10 (ARN) y la hebra antisentido de la misma está representada por la SEQ. ID. N°: 11 (ADN) o la 12 (ARN).

Con respecto a estas secuencias, se prepararon una en la que aproximadamente la mitad de la región secuencia arriba (de 10 a 13 nucleótidos) es ARN tanto en sentido como en antisentido (C), una en la que aproximadamente la mitad de la región secuencia arriba (de 10 a 13 nucleótidos) es ADN tanto en sentido como en antisentido (D), una en la que el antisentido es ARN y aproximadamente la mitad de la región secuencia arriba (de 10 a 13 nucleótidos) de la hebra sentido es ARN (E), y una en la que la hebra sentido es ARN y aproximadamente la mitad de la región secuencia arriba (de 10 a 13 nucleótidos) de la hebra antisentido es ADN (F). La síntesis de estos polinucleótidos fue confiada a Genset K. K. a través de Hitachi Instruments Service Co., Ltd y, después de la formación de los polinucleótidos de tipo quimera, se preparó uno bicatenario mediante la hibridación de cada uno de ellos. La hibridación se realizó haciendo reaccionar los polinucleótidos monocatenario de tipo quimera sentido y monocatenario antisentido de una forma similar a la del Ejemplo 1. La producción del polinucleótido bicatenario se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TBE.

(2) Transfección del gen objetivo, del gen indicador y del polinucleótido bicatenario de tipo quimera de ADN-ARN en células cultivadas

Se usó el control pGL3 descrito en (1) anterior como vector de expresión recombinante para expresar el gen objetivo, y se usó el pRL-TK descrito en (1) anterior como un vector de expresión del gen indicador. Se usaron células CHO-K1 (ATCC: CCL-61) como células cultivadas, y como medio se usó medio de Eagle modificado por Dulbecco (elaborado por Gibco BRL) complementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado (elaborado por Mitsubishi Kasei Corporation), y se usaron 10 unidades/ml de penicilina (elaborada por Meiji) y 50 µg/ml de estreptomicina (elaborada por Meiji) como antibióticos. Las células se cultivaron a 37°C en presencia de un 5% de CO₂.

Las células CHO-K1 se dispersaron en una placa de 24 pocillos a una concentración de 0,3 x 10⁶ células/ml. Después de 1 día se transfectaron 1,0 µg de ADN de pRL-TK y 10 nM o 100 nM de cada polinucleótido bicatenario de tipo quimera de ADN-ARN mediante el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico.

(3) Medición de la expresión génica en células cultivadas

Como en el Ejemplo 1, las células preparadas en el Ejemplo 4 (2) anterior se recogieron después de 20 horas y se midieron las cantidades expresadas de dos tipos de proteínas luciferasa usando el Sistema de Ensayo de Doble Indicador de luciferasa. La medición de la fluorescencia se llevó a cabo usando un luminómetro Lumat LB9507.

Las estructuras de los polinucleótidos bicatenarios y la proporción de la actividad de luciferasa en estas células transfectadas con los polinucleótidos con respecto a un control (una célula en la que no se transfectó polinucleótido bicatenario) se muestran en la Fig. 5. En la figura, un cuadrado blanco representa una cadena de ARN, y un cuadrado negro representa una cadena de ADN. Como puede apreciarse a partir de la figura, en los polinucleótidos con cualquier secuencia de bases, la expresión del gen transfectado en las células CHO-K1 fue inhibida por los polinucleótidos bicatenarios de 21 nucleótidos cada uno, en los que al menos aproximadamente la mitad de la región secuencia arriba del polinucleótido era ARN (Figs. 5 (A), (C) y (E)).

Se considera que los polinucleótidos bicatenarios de 21 nucleótidos, preparados cada uno mediante la identificación o la predicción de un dominio necesario y suficiente para el exhibición del efecto de ARNi según el procedimiento usado en el presente Ejemplo y la otra técnica, reservando una parte que contiene este dominio como ARN, y sustituyendo la otra parte por ADN, son capaces de inhibir la expresión del gen objetivo mediante el efecto de ARNi.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Según la presente invención, usando una célula cultivada se proporciona un medio para analizar directamente las funciones de los genes en seres humanos y en otros organismos. Además, según el procedimiento divulgado de uso de un indicador, pueden cribarse de forma primaria las células que muestran un efecto de ARNi especialmente alto, de forma que puede conseguirse un análisis eficaz incluso entre células que muestran un débil efecto de ARNi.

Como tecnología inventiva convencional para su uso con el mismo propósito puede mencionarse un procedimiento de ARNi mediante transfección con un ARN bicatenario, pero existen problemas ya que el ARN es extremadamente fácilmente degradado por una ribonucleasa, especialmente en estado monocatenario, y el coste de la producción es elevado. En la presente invención, el polinucleótido que se va a transfectar no está limitado porque sea completamente ARN. Por lo tanto, el uso de un polinucleótido que comprende ADN y ARN, específicamente un polinucleótido híbrido con una hebra de ADN y una hebra de ARN, o un polinucleótido quimera de ADN-ARN, permite mejorar la estabilidad del polinucleótido, como sustancia, para la transcripción, y también una reducción en el coste de la producción. Por lo tanto, según la presente invención, es posible desarrollar el propio polinucleótido como una preparación farmacéutica con el propósito de tratar enfermedades. Además, pueden realizarse fácilmente modificaciones tales como marcaje fluorescente, marcaje con biotina, aminación, fosforilación y tiolación, sobre una amplia variedad con respecto al ADN, en comparación con el caso del ARN. Por lo tanto, cuando se usa como agente o reactivo farmacéutico, puede impartirse una función adecuada para un propósito realizando dichas modificaciones.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION

<120> Inhibición genética mediante un polinucleótido bicatenario

<130>P-43361

5 <140> JP 2001-355896

<141> 2001-11-21

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

10 <210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 1

cattctatcc gctggaagat g 21

<210> 2

20 <211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

25 <400> 2

cauucuaucc gcuggaagau g 21

<210> 3

<211> 21

30 <212> ADN

<218> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 3

35 tcttcagcg gatagaatgg c 21

<210> 4

<211> 21

<212> ARN

<218> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 4
 5 ucuuccagcg gauagaaugg c 21

 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 5
 acgccaaaa cataaagaaa g 21
 15
 <210> 6
 <211> 21
 <212>ARN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 6
 acgccaaaa cauaaagaaa g 21

 25 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <212> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética
 <400> 7
 ttctttatgt ttttggcgtc t 21

 <210> 8
 35 <211> 21
 <212> ARN
 <218> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 8

uucuuuauugu uuuuggcguc u 21

<210> 9

5 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

10 <400> 9

ggtaaagttg tttatttt t 21

<210> 10

<211> 21

15 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 10

20 gguaaaguug uuuuuuuuu u 21

<210> 11

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 11

aaaatggaac aactttaccg a 21

30

<210> 12

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: sintética

<400> 12

aaaauggaac aacuuuaccg a

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para inhibir la expresión de un gen objetivo en una célula, que comprende introducir en la célula un polinucleótido bicatenario que comprende una quimera de ADN y ARN con una secuencia de polinucleótidos sustancialmente idéntica a al menos una secuencia parcial de nucleótidos del gen objetivo, en el que el polinucleótido bicatenario consiste en 19 - 25 nucleótidos y al menos la mitad de la región del polinucleótido bicatenario desde el extremo 3' de la hebra antisentido es ARN.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el polinucleótido bicatenario comprende una hebra simple autocomplementaria.
3. Un procedimiento *in vitro* para inhibir la expresión de dos o más genes objetivo en una célula, que comprende introducir dos o más polinucleótidos bicatenarios que comprenden una quimera de ADN y ARN con una secuencia de polinucleótidos sustancialmente idéntica a al menos una secuencia parcial de nucleótidos del gen objetivo en la célula, en el que los polinucleótidos bicatenarios consisten en de 19 a 25 nucleótidos y al menos la mitad de la región de los polinucleótidos bicatenarios desde el extremo 3' de la hebra antisentido es ARN.
4. Un procedimiento de análisis de la función de un gen, que comprende analizar un cambio fenotípico que aparece en la célula o en el tejido como resultado de la inhibición de la expresión de un gen objetivo mediante por el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Un procedimiento para impartir una propiedad específica a una célula, que comprende la inhibición de la expresión de un gen objetivo en la célula usando el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
6. Un procedimiento para preparar un polinucleótido bicatenario que inhibe la expresión de un gen objetivo en una célula, en el que el polinucleótido bicatenario que comprende una quimera de ADN y ARN con una secuencia de polinucleótidos sustancialmente idéntica a al menos una secuencia parcial de nucleótidos del gen objetivo, y el polinucleótido bicatenario consiste en de 19 a 25 nucleótidos y al menos la mitad de la región de los polinucleótidos bicatenarios desde el extremo 3' de la hebra antisentido es ARN.
7. Una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido bicatenario que comprende una quimera de ADN y ARN con una secuencia de polinucleótidos sustancialmente idéntica a al menos una secuencia parcial de nucleótidos del gen objetivo, en el que el polinucleótido bicatenario consiste en 19 - 25 nucleótidos y al menos la mitad de la región del polinucleótido bicatenario desde el extremo 3' de la hebra antisentido es ARN.
8. Una composición para su uso como un medicamento, que comprende un polinucleótido bicatenario que comprende una quimera de ADN y ARN con una secuencia de polinucleótidos sustancialmente idéntica a al menos una secuencia parcial de nucleótidos del gen objetivo, en el que el polinucleótido bicatenario consiste en 19 - 25 nucleótidos y al menos la mitad de la región de los polinucleótidos bicatenarios desde el extremo 3' de la hebra antisentido es ARN.

Fig. 1

Hebra sentido:

FLs1: CAUUCUAUCCGCGUGGAAGAUG

DFLs1: CATTCTATCCGCTGGAAGATG

FLs1-1: CATTCTATCCGCGUGGAAGAUG

FLs1-2: CAUUCUAUCCGCTGGAAGATG

Hebra antisentido:

FLa2: UCUUCCAGCGGAUAGAAUGGC

DFLa2: TCTTCCAGCGGATAGAATGGC

FLa2-1: UCUUCCAGCGGATAGAAUGGC

FLa2-2: TCTTCCAGCGGAUAGAATGGC

FLa2-3: TCTUCCAGCGGAUAGAAUGGC

FLa2-4: UCUTCCAGCGGATAGAATGGC

FLa2-5: TCTTCCAGCGGAUAGAAUGGC

FLa2-6: UCUUCCAGCGGATAGAATGGC

FLa2-7: TCTTCCAGCGGATAGAATGGC

FLa2-8: UCUUCCAGCGGAUAGAAUGGC

FLa2-9: TCTTCCAGCGGAUAGAAUGGC

FLa2-10: UCUUCCAGCGGATAGAATGGC

Fig. 2

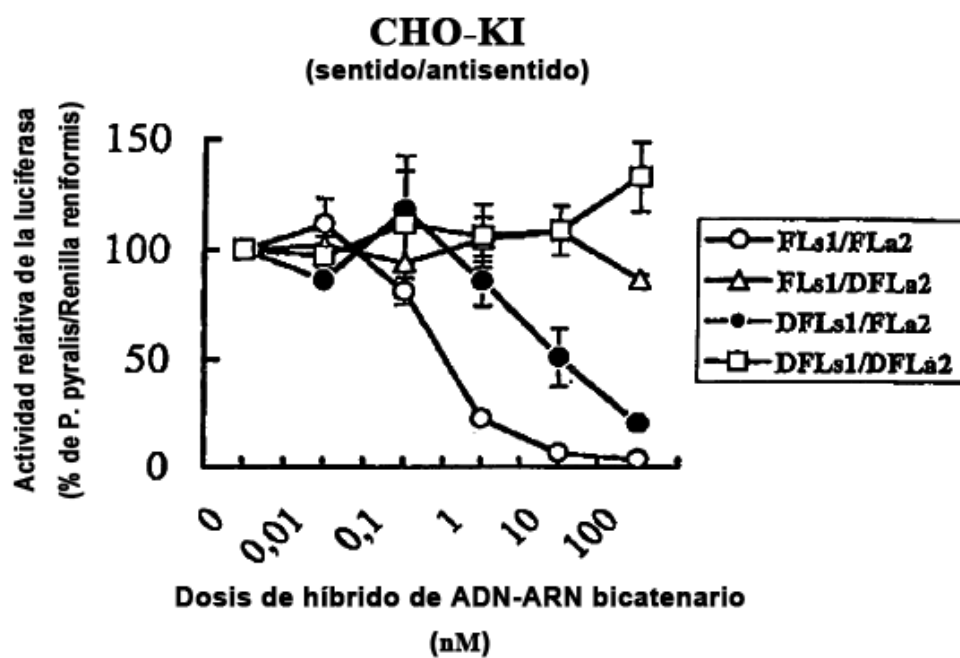


Fig. 3

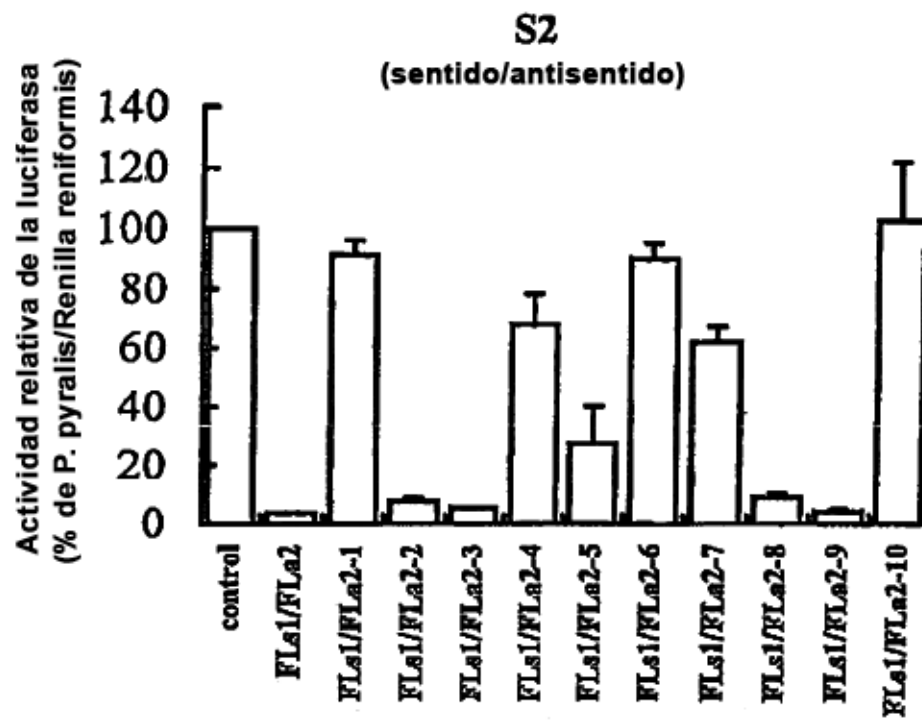


Fig. 4

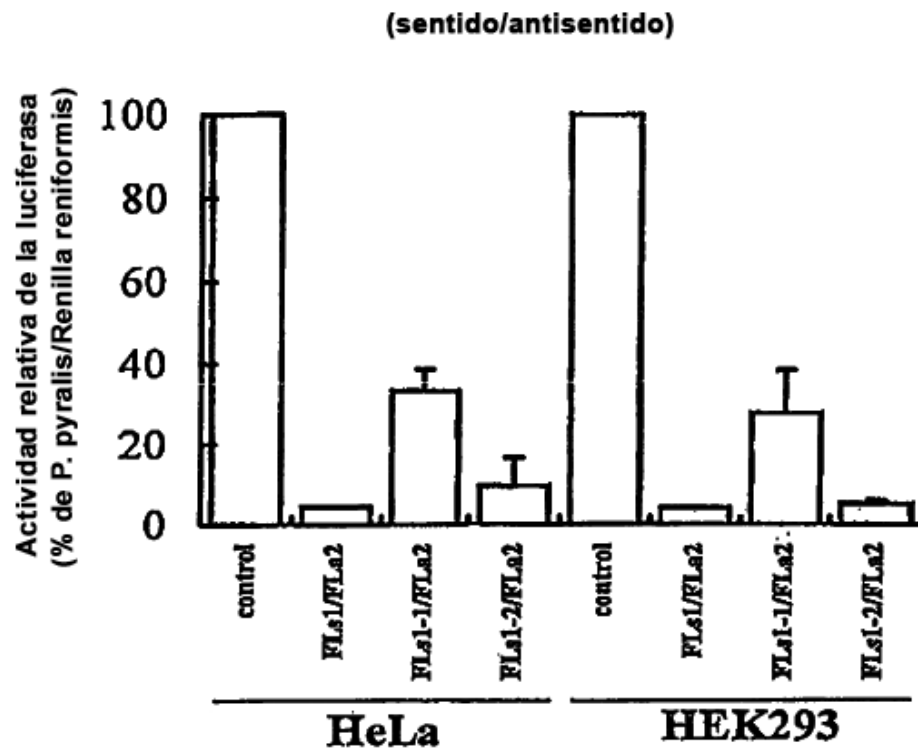


Fig. 5

