

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 040**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2008** **E 08764303 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014** **EP 2143792**

54 Título: **RNA circular monocatenario y método para producirlo**

30 Prioridad:

09.05.2007 JP 2007125045

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

06.03.2014

73 Titular/es:

RIKEN (33.3%)

2-1 Hirosawa

Wako-shi, Saitama 351-0198, JP;

OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (33.3%) y

HAYASHI KASEI CO., LTD. (33.3%)

72 Inventor/es:

ABE, HIROSHI;

ITO, YOSHIHIRO;

ABE, NAKO y

TOYOBUKU, HIDEKAZU

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 446 040 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

RNA circular monocatenario y método para producirlo

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un RNA circular monocatenario, a un método para producir el RNA, y a una composición farmacéutica que comprende el RNA.

Técnica anterior

10 Los métodos de interferencia de RNA convencionales se clasifican generalmente en dos grupos: un método que utiliza RNAs bicatenarios sintetizados químicamente y un método que utiliza vectores plasmídicos. El método de interferencia de RNA usando vectores plasmídicos se utiliza mucho en el campo de la biotecnología, principalmente en experimentos básicos de biología. Sin embargo, cuando el método de interferencia de RNA se aplica al desarrollo de preparados farmacéuticos, el método que utiliza vectores de plásmido tiene un problema de seguridad para un organismo humano. Por tanto, probablemente es más preferible utilizar los RNAs bicatenario sintetizados químicamente.

15 Sin embargo, está el problema de que los RNAs bicatenarios sintetizados químicamente son inestables *in vivo*, es decir, susceptibles de degradarse con enzimas (nucleasas) en las células. Para resolver este problema se han desarrollado cadenas de RNA con ácidos nucleicos no naturales con el fin de mejorar la estabilidad de los RNAs bicatenarios en las células; sin embargo, existe también el problema de que su actividad biológica se reduce mientras que mejora la estabilidad. Además, no se conoce la toxicidad causada por los ácidos nucleicos no naturales. Por tanto, sigue siendo difícil conseguir la aplicación a preparados farmacéuticos.

20 Las formas de un RNA bicatenario utilizable para el método de interferencia de RNA incluyen un RNA bicatenario que tiene extremos romos o extremos protuberantes, un RNA que tiene una estructura de horquilla con un bucle en cada extremo del RNA bicatenario (documento JP2003 - 502012A), un ácido nucleico circular que contiene aproximadamente 19 pares de bases, dos bucles, y opcionalmente polinucleótidos modificados químicamente (documento JP2006 - 271387A), y similares. Sin embargo, este ácido nucleico circular no se somete a pruebas para ver el efecto de interferencia de RNA.

25 Además, se describe un ácido nucleico halteriforme quimérico RNA - DNA (JP11 - 137260A (1999)). Este ácido nucleico no es para ser usado en la interferencia de RNA. La porción de RNA del ácido nucleico halteriforme se segmenta mediante una enzima en las células, y la porción de DNA antisentido resultante se une a un mRNA en las células para inhibirlo. El documento JP11 - 137260A (1999) describe que un ácido nucleico posee una elevada resistencia a las enzimas de degradación de ácido nucleico en las células y se mantiene estable en las células hasta que actúa la ribonucleasa H, debido a su estructura halteriforme. Se describe además que, a causa de que un oligonucleótido de cadena simple que contiene la porción de DNA antisentido puede ser liberado en el citoplasma de las células sólo después de la segmentación de la porción de RNA complementario con el efecto de la ribonucleasa H, se cree que puede mejorarse el efecto antisentido por dosis.

35 Además, en relación con el método de síntesis de un ácido nucleico circular que tiene una estructura halteriforme, por ejemplo, se describe que se sintetizan oligonucleótidos lineales, se forman una región de tallo y una región de bucle de horquilla para obtener un oligonucleótido halteriforme de muesca, en donde un sitio del oligonucleótido halteriforme circular diana (el extremo opuesto de la región de bucle de horquilla anterior) no está unido, y el extremo 5' está ligado con una ligasa para preparar un ácido nucleico circular halteriforme (JP11 - 137260 (1999)).

40 Es un objeto de la presente invención proporcionar un RNA circular monocatenario y un método de producción del mismo.

Descripción de la invención

45 Los autores de la presente invención han encontrado ahora que, sorprendentemente, se puede obtener un RNA circular monocatenario con un rendimiento elevado sintetizando por separado una cadena con sentido o codificante y una cadena antisentido, comprendiendo ambas una secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en cada extremo, y permitiendo que actúe la ligasa en los nucleótidos en ambos extremos simultáneamente, y que el RNA circular monocatenario obtenido ejerce un efecto de interferencia de RNA de liberación lenta. Basándose en estos hallazgos científicos, los autores de la presente invención han completado la presente invención.

Más específicamente, la presente invención incluye lo siguiente.

50 (1) Un RNA circular monocatenario que tiene un efecto de interferencia de RNA sostenido o de liberación lenta, caracterizado porque el RNA circular monocatenario comprende una secuencia de cadena con sentido, una secuencia de cadena antisentido complementaria a la secuencia de la cadena con sentido, dos secuencias de bucle idénticas o distintas entre la cadena con sentido y la cadena antisentido, que conectan cadenas, en donde la cadena con sentido y la cadena antisentido se emparejan para formar un tallo, y en donde cada una de las dos secuencias del bucle tiene de 6 a 9 nucleótidos de longitud.

- (2) El RNA circular monocatenario según el apartado anterior (1), en el que la expresión de un RNA diana es 0,4 o menos 24 horas después de la introducción del RNA circular monocatenario en células eucariotas, en comparación con las células de control cuyo nivel de expresión del RNA diana se establece en 1.
- 5 (3) El RNA circular monocatenario según los anteriores apartados (1) o (2), en el que el 70 % o más del mismo se conserva después de 8 horas en suero humano.
- (4) Un método para producir RNA circular monocatenario de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores apartados (1) a (3), que comprende sintetizar una cadena con sentido y una cadena antisentido, comprendiendo ambos una secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en el extremo 5' extremo y el extremo 3', y ligar simultáneamente el nucleótido en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no emparejados en la
10 cadena con sentido, con el nucleótido en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en la cadena antisentido, y viceversa, utilizando una ligasa,
- 15 en donde la secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en el extremo 5' de la cadena con sentido y la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no emparejados en el extremo 3' de la cadena antisentido están unidas entre sí para formar un bucle, la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no emparejados en el extremo 3' de la cadena con sentido y la secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en el extremo 5' de la cadena antisentido están unidos entre sí para formar un bucle, y la cadena con sentido y la cadena antisentido están emparejados para formar un tallo.
- (5) El método de acuerdo con el anterior apartado (4), que comprende además la fosforilación de cada extremo 5' de la secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en la cadena con sentido y la secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en la cadena antisentido.
20
- (6) El método de acuerdo con los anteriores apartados (4) o (5), en el que las secuencias de bucle son idénticas o distintas entre sí.
- (7) El método de acuerdo con una cualquiera de los anteriores apartados (4) a (6), en el que la longitud del tallo es de 19 a 31 nucleótidos.
- 25 (8) Un método de supresión de la expresión de un gen que codifica una proteína *in vitro*, que comprende introducir el RNA circular monocatenario de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores apartados (1) a (3) en células derivadas de seres humanos, y deteriorar un RNA diana mediante el RNA circular monocatenario para inhibir la traducción del RNA diana en la proteína de una manera sostenida.
- 30 (9) Un método de supresión de la expresión de un gen que codifica una proteína, que comprende introducir *in vitro* el RNA circular monocatenario de acuerdo con uno cualquiera de los anteriores apartados (1) a (3) en células de un animal no humano, o de una planta, y deteriorar un RNA diana por el RNA circular monocatenario para inhibir la traducción del RNA diana en la proteína de una manera sostenida.
- (10) Una composición farmacéutica que comprende el RNA circular monocatenario según uno cualquiera de los anteriores apartados (1) a (3) como ingrediente activo.
- 35 Como se usa en el presente texto, la expresión "RNA circular monocatenario" puede referirse a RNA halteriforme. Un RNA halteriforme se refiere a un RNA circular monocatenario, en el que una cadena con sentido y una cadena antisentido están emparejadas de forma complementaria para formar un tallo, se forman bucles en ambos lados del tallo mediante una secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados, y la forma total del RNA circular monocatenario es la de una pesa de gimnasia.
- 40 De acuerdo con la presente invención, se puede producir eficazmente el RNA sintético halteriforme, que es excelente en estabilidad, sostenibilidad y propiedades de liberación lenta.
- En particular, el RNA halteriforme para ser usado en el método de interferencia de RNA se puede producir por ciclación de dos cadenas de RNA. Debido a que ambos extremos están cerrados en forma de bucle, no tiene extremo de RNA y no es por tanto probable que sirva como sustrato para enzimas, exonucleasa (RNasa) y similares, excepto para enzimas específicas tales como enzimas Dicer en las células. Así pues, es menos susceptible a la degradación enzimática y
45 tiene una estabilidad en la célula que ha aumentado de manera significativa. Como consecuencia, no hay necesidad de usar ácidos nucleicos no naturales para mejorar la estabilidad.
- Además, el RNA halteriforme es reconocido específicamente por enzimas *in vivo* tales como Dicer en las células, y las regiones de bucle a ambos lados se segmentan para formar un RNA bicatenario de tipo natural (Figura 1). Como consecuencia, puede tener actividad equivalente a la de un RNA bicatenario, y ejerce un efecto más sostenible o de liberación lenta que el efecto de interferencia de RNA por RNAs bicatenarios convencionales.
- 50 El RNA halteriforme de la presente invención es también más estable que los RNAs bicatenarios convencionales en el suero humano.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una vista esquemática del RNA halteriforme de la presente invención.

La Figura 2 muestra la estructura de RNAs y una imagen de electroforesis de cada RNA.

La Figura 3 muestra la estructura de siRNA y RNAs halteriformes.

5 La Figura 4 muestra imágenes de electroforesis de RNAs halteriformes y RNAs bicatenarios liner segmentados por Dicer.

La Figura 5 muestra un efecto de interferencia de cada RNA halteriforme 24 horas después de la transfección.

La Figura 6 muestra un efecto de interferencia de RNA sostenible del RNA halteriforme.

La Figura 7 muestra la estabilidad del RNA halteriforme en suero humano.

10 Modo mejor de llevar a cabo la invención

El RNA circular monocatenario de la presente invención incluye una secuencia de cadena con sentido homóloga a la secuencia de nucleótidos de un RNA diana o parte del mismo, una secuencia de cadena antisentido que es complementaria a la secuencia de la cadena con sentido y es capaz de emparejamiento con ella, y secuencias de bucle que no pueden formar emparejamiento entre las cadenas.

15 La cadena con sentido y la cadena antisentido se emparejan para formar un tallo. La longitud del tallo, no limitada específicamente, se puede determinar dependiendo del tipo, la estructura o similares de un RNA diana. Por ejemplo, el tallo está compuesto de 19 a 31 pares de bases, preferiblemente de 21 a 25 pares de bases, más preferiblemente de 22 a 24 pares de bases, e incluso más preferiblemente de 23 pares de bases.

20 Las secuencias de nucleótidos con nucleótidos no emparejados están presentes en el extremo 5' y el extremo 3' tanto de la cadena con sentido y como de la cadena antisentido. El nucleótido en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en la cadena con sentido y el nucleótido en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en la cadena antisentido están ligados entre sí para formar un bucle. El nucleótido en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no emparejados en la cadena con sentido y el nucleótido en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no emparejados en la cadena antisentido están ligados entre sí para formar un bucle. La longitud del bucle es de 6 a 9 bases. Por tanto, el RNA circular monocatenario entero está compuesto preferiblemente por 42 a 80 bases.

30 Cuando la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no emparejados en el extremo 5' de la cadena con sentido se representa como A, la secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en el extremo 3' de la cadena antisentido se representa como B, la secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en el extremo 3' de la cadena con sentido se representa como C, y la secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en el extremo 5' de la cadena antisentido se representa como D, por ejemplo, si la longitud del bucle es 20 bases, entonces A es de 1 a 19 bases de longitud, B es de 19 a 1 bases de longitud, C es de 19 a 1 bases de longitud, y D es de 1 a 19 bases de longitud. Por tanto, el nucleótido en el extremo 5' de A y el nucleótido en el extremo 3' de B están ligados entre sí para formar un bucle de 20 bases, y el nucleótido en el extremo 3' de C y el nucleótido en el extremo 5' de D están ligados entre sí para formar un bucle de 20 bases. Aunque los bucles de 20 bases no son parte de la presente invención, el mismo principio es válido para bucles de 6 a 9 bases.

35 Es preferible que las secuencias, que no pueden formar emparejamiento entre sí, varíen en longitud entre A y B, y entre C y D, por ejemplo, en 1 base, 2 bases o 3 bases o, alternativamente, que las secuencias sean de la misma longitud. Por tanto, por ejemplo, cuando la longitud del bucle es de 8 bases, es preferible que A sea de 3 a 5 bases de longitud, B sea de 5 a 3 bases de longitud, C sea de 5 a 3 bases de longitud, y D sea de 3 a 5 bases de longitud. Cuando la longitud del bucle es 9 bases, es preferible que A sea de 3 a 6 bases de longitud, B sea de 6 a 3 bases de longitud, C sea 6 a 3 bases de longitud, y D sea de 3 a 6 bases de longitud.

Además, las secuencias de nucleótidos del bucle formado por A y B y el bucle formado por C y D pueden ser idénticas o diferentes.

45 El RNA circular monocatenario de la presente invención se puede utilizar para el método de interferencia de RNA.

La interferencia de RNA se conoce también como RNAi, y es un fenómeno en el que una pequeña molécula de RNA que tiene una secuencia complementaria a un RNA diana se une al RNA diana, degradando así el RNA diana o suprimiendo la traducción del RNA diana.

50 La cadena antisentido del RNA halteriforme tiene una secuencia complementaria a un RNA diana (por ejemplo, mRNA o el RNA precursor del mismo). Además, las secuencias de nucleótidos con nucleótidos no emparejados incluyen, pero sin limitarse a ellos, UUCAAGAGA y UGUGCUGUC (M. Miyagishi et al, Oligonucleotides 2003, Vol. 13: pp 1 a 7).

- Además, el bucle en el RNA halteriforme puede ser modificado químicamente. Por ejemplo, la estabilidad *in vivo* del RNA halteriforme puede mejorarse por modificación con polietilenglicol cuyo peso molecular es de aproximadamente 2000 a 5000. El bucle del RNA halteriforme es segmentado por una enzima como Dicer en células a eliminar. Por tanto, se cree que el polietilenglicol tiene poco efecto cuando el tallo ejerce su efecto de interferencia de RNA como siRNA o miRNA.
- Con el RNA halteriforme de la presente invención, la expresión de un RNA diana en las células en las que se ha introducido el RNA halteriforme, es preferiblemente 0,4, o menos, 24 horas después de la introducción del RNA halteriforme en las células, en comparación con las células de control (sin haberse introducido el RNA halteriforme) cuyo nivel de expresión del RNA diana se establece en 1.
- De acuerdo con la presente invención, las células son células eucariotas, preferiblemente células animales y células vegetales.
- La expresión de un RNA diana puede ser confirmada, por ejemplo, por la transformación de células con un gen informador (por ejemplo, luciferasa, β - galactosidasa, β - glucuronidasa, o gen de la proteína fluorescente verde (GFP)), y la medida de la coloración o fluorescencia de la proteína derivada del gen informador para examinar el nivel de inhibición de la expresión de un RNA diana por el RNA halteriforme, en donde el mRNA del gen indicador puede ser usado como RNA diana.
- Además, el RNA halteriforme de la presente invención se caracteriza porque el 70 % o más del mismo se mantiene sin ser degradado al cabo de 8 horas en suero humano. Por ejemplo, esto puede ser confirmado incubando el RNA halteriforme en suero humano y midiendo el peso molecular mediante el uso de electroforesis o similares para probar si se degrada a lo largo del tiempo.
- El método de producción del RNA circular monocatenario halteriforme de la presente invención incluye la síntesis de una cadena con sentido y una cadena antisentido, comprendiendo ambas una secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en el extremo 5' y el extremo 3', y ligando simultáneamente el nucleótido en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en la cadena con sentido, con el nucleótido en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en la cadena antisentido, y viceversa, utilizando una ligasa.
- La cadena con sentido y la cadena antisentido pueden ser diseñadas para suprimir la función de un gen diana, basándose en la secuencia de nucleótidos del gen diana. Los diseños se pueden confirmar produciendo múltiples cadenas con sentido y antisentido y probando cada eficiencia de supresión. Por ejemplo, se puede aplicar el diseño que utiliza un algoritmo para el diseño de siRNA o similar (referencias: J. A. Jaeger et al., *Methods in Enzymology* (1989) 183: 281 - 306 ; D. H. Mathews et al., *J. Mol. Biol.* (1999) 288: 911 - 940). Al realizar el diseño, es preferible que las cadenas no supriman la expresión de otros genes que no sean el gen diana, los genes que tienen secuencias similares al gen diana (que se conoce como el efecto "off target" o "fuera del objetivo"). Las longitudes de las cadenas con sentido y antisentido se diseñan preferiblemente en el intervalo, por ejemplo, de 19 a 31 bases, preferiblemente de 21 a 25 bases, más preferiblemente de 22 a 24 bases, e incluso más preferiblemente 23 bases.
- El gen diana incluye, pero sin limitarse a ellos, el gen *abl/bcr* para la leucemia, el gen VEGF para la degeneración macular relacionada con la edad, y el gen HCV para la hepatitis.
- Una secuencia que posteriormente forma un bucle, por ejemplo la secuencia anterior UUCAAGAGA, se divide en dos fragmentos en una posición arbitraria para formar una secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados (en donde la secuencia es de 9 bases y, cuando se divide en dos fragmentos, como se describió anteriormente, la diferencia de longitud está preferiblemente en el intervalo de 1 a 3 bases). Una secuencia se diseña de forma que un fragmento se liga al extremo 3' de la cadena antisentido, y el otro se liga al extremo 5' de la cadena con sentido. Por el mismo método, se diseña otra secuencia de forma que un fragmento se liga al extremo 3' de la cadena con sentido, y el otro se liga al extremo 5' de la cadena antisentido. Los ácidos nucleicos monocatenarios que tienen estas dos secuencias diseñadas se sintetizan por separado. Al hacer esto, es preferible llevar a cabo la fosforilación del extremo 5' usando un reactivo de fosforilación química. Además, el método de la presente invención requiere el diseño de una secuencia para formar un bucle, cuya longitud es de 6 a 9 bases.
- Hay varios métodos para la síntesis de ácidos nucleicos tales como el método de síntesis de transcripción *in vitro*, métodos que utilizan plásmidos o vectores virales, y métodos que utilizan casetes de PCR. Aunque el método de síntesis de ácidos nucleicos no está limitado específicamente, se prefiere un método de síntesis química en términos de pureza elevada, capacidad para producir en grandes cantidades, seguridad para el uso *in vivo*, capacidad de modificación química, y similares. Entre los ejemplos de métodos de síntesis química se incluyen, pero no se limitan a ellos, el método de H-fosfonato y el método de la fosforamidita. Con este fin, se pueden usar sintetizadores automáticos de ácidos nucleicos disponibles en el mercado.
- Los extremos de las secuencias de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en ambos extremos de la cadena con sentido y la cadena antisentido se ligan con una ligasa (por ejemplo, RNA ligasa T4 o DNA ligasa T4) para formar dos bucles simultáneamente. Las condiciones de reacción incluyen, por ejemplo, la incubación en un tampón que contiene polietilenglicol (PEG), BSA y similares durante 20 horas a baja temperatura. El RNA circular monocatenario

halteriforme sintetizado se puede recolectar y purificar por métodos ordinarios (por ejemplo, métodos de cromatografía líquida de alto rendimiento y PAGE).

Además, el RNA circular monocatenario se puede modificar químicamente con polietilenglicol (PEG) o similares, en los que la modificación química se realiza preferiblemente en la región del bucle. Para la unión, se modifican ambos extremos del PEG para introducir un grupo funcional reactivo con los grupos amino de las bases, tales como un grupo formilo o un grupo N-hidroxisuccinimida éster.

A continuación se describe el método de interferencia de RNA usando el RNA halteriforme producido por el método anterior.

De acuerdo con la presente invención, se puede introducir en células *in vivo* el RNA circular monocatenario de la presente invención y deteriorar el RNA diana para inhibir la traducción del RNA diana en una proteína de una manera sostenida, en donde se pueden usar como células las células humanas o animales no humanas o células vegetales.

Cuando el método de interferencia de RNA se realiza *in vitro*, el RNA halteriforme se introduce en las células, por ejemplo, por el método de electroporación, método de microinyección, método de lipofección, o transfección con fosfato cálcico.

El RNA halteriforme introducido en las células se segmenta mediante Dicer en las células para generar un RNA bicatenario (siRNA) que tiene un efecto de interferencia de RNA (Figura 1). Los extremos del siRNA pueden ser extremos romos o bien extremos protuberantes. El siRNA se convierte en una sola cadena para formar un complejo RNA - nucleasa (complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC: RNA induced silencing complex)), que reconoce un mRNA diana que tiene una secuencia complementaria al siRNA, y degrada el mRNA diana, suprimiendo de esta forma la expresión del gen diana correspondiente.

El RNA circular monocatenario de la presente invención puede usarse en cualquiera de las células vegetales y células animales (por ejemplo, seres humanos, mascotas, mamíferos, incluyendo animales domésticos). Son de esperar muchas aplicaciones en los campos de la medicina y la agricultura. Por ejemplo, el RNA circular monocatenario de la presente invención se puede utilizar para varios fines incluyendo la explicación de la función de un gen o una proteína específica en plantas o animales, o a nivel celular vegetal o animal, usando por ejemplo métodos de *knockout* (desactivación génica). Además, la presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende el RNA circular monocatenario como ingrediente activo.

La cantidad de RNA circular monocatenario formulado en la composición farmacéutica puede ajustarse de acuerdo con el tipo y la finalidad de la composición. Por ejemplo, la cantidad de RNA incluye, pero sin limitarse a ellas, 1 % en peso, 3 % en peso, 5 % en peso, 10 % en peso, 20 % en peso, 30 % en peso, 40 % en peso, 50 % en peso, 60 % en peso, 70 % en peso, 80 % en peso, 90 % en peso o 100 % en peso, en relación con la cantidad total de la composición.

Los ejemplos de composición farmacéutica de la presente invención incluyen preparados líquidos (tales como solución, suspensión, emulsión), preparados sólidos (tales como un preparado liofilizado que puede ser reconstituido antes de su uso), preparados encapsulados con liposomas (preferiblemente liposoma catiónico). Además, la vía de administración preferida es la administración parenteral, que incluye, por ejemplo, la administración local aplicando el preparado directamente al sitio afectado, la administración pulmonar, la administración transmucosal tal como la administración nasal, y la administración intravenosa.

La composición farmacéutica de la presente invención puede incluir excipientes (solución salina, agua esterilizada, solución de Ringer y similares), agentes tampón, agentes de tonicidad, agentes estabilizantes, y similares, dependiendo de las formulaciones o de las formas de dosificación.

Además, la dosificación de la composición farmacéutica de la presente invención puede variar dependiendo del sexo, el peso, la edad, la gravedad, los síntomas, o cuestiones similares, del paciente.

La composición farmacéutica de la presente invención es aplicable, por ejemplo, al tratamiento de enfermedades tales como cáncer (por ejemplo, supresión de las funciones de los genes o proteínas que se expresan específicamente en las células cancerosas).

La presente invención se describirá a continuación con más detalle mediante los siguientes ejemplos. Sin embargo, se debe entender que el alcance de la presente invención no está limitado a los ejemplos específicos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de un RNA halteriforme.

Los RNAs fosforilados 5' que sirven como materias primas para los RNAs halteriformes se sintetizaron todos ellos en un sintetizador de DNA (Geneworld H8-SE) de acuerdo con el método de la fosforamidita. Se utilizó TBDMS protegida (Proligo Corp.) para RNA amiditas, y se usó reactivo de fosforilación química (Glen Research Corp.) para la fosforilación 5'. La desprotección se realizó por el método ordinario, seguido por una purificación mediante PAGE. Las secuencias del RNA sintetizado se muestran en SEC ID NO: 1 (cadena sentido, 28mero), SEC ID NO: 2 (cadena antisentido,

28mero), SEC ID NO: 3 (56mero), y en la Figura 2. Además, en las secuencias de RNA que se muestran en la Figura 2, las secuencias subrayadas son secuencias que forman la región del bucle de un RNA halteriforme.

A continuación, se llevó a cabo la reacción enzimática en la mezcla de RNA bicatenario 2 μ M, 2,0 unidades/ μ l de RNA ligasa T4, 0,006 % de BSA, 25 % de PEG6000, Tris - HCl 50 mM (pH 7,5), $MgCl_2$ 10 mM, DTT 10 mM y ATP 1 mM en un volumen total de 25 μ l.

Más específicamente, en primer lugar se disolvió RNA bicatenario 5' - fosforilado a 12,5 μ l de un tampón (2 x tampón) que contiene Tris - HCl 100 mM (pH 7,5), $MgCl_2$ 20 mM, DTT 20 mM y ATP 2 mM, a una concentración de 4 μ M. La solución se calentó a 65 °C durante 5 minutos, y después se enfrió lentamente a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió solución de BSA, solución de PEG6000 y RNA ligasa T4 (Takara Bio Inc.) para formar la composición y el volumen de reacción anteriormente indicados. Después, la solución se incubó a 11 °C durante 20 horas. El RNA se recogió por precipitación en etanol y se analizó mediante PAGE.

Las muestras en cada calle de la PAGE de la Figura 2 son las siguientes.

Calle 1: mezcla de la cadena con sentido de 28 bases y la cadena antisentido de 28 bases (marcador).

Calle 2: RNA de 57 bases (marcador).

Calle 3: RNA halteriforme formado a partir de la cadena con sentido de 28 bases y la cadena antisentido de 28 bases.

Calle 4: RNA halteriforme formado a partir de 56 bases (monocatenario)

Calle 5: cadena con sentido de 28 bases tratada con RNA ligasa (referencia)

Calle 6: cadena antisentido de 28 bases tratada con RNA ligasa (referencia)

El RNA halteriforme en el Calle 4 fue producido sintetizando una única cadena que tiene 56 bases (SEC ID NO: 3), formando una región de tallo y una región de bucle en horquilla, y ligando el primer nucleótido y el último nucleótido con ligasa T4.

La banda rodeada por un círculo en el Calle 3 representa el RNA halteriforme producido por el método de la presente invención, y el rendimiento fue de aproximadamente 80 %. El RNA halteriforme en el Calle 4 tenía un rendimiento de aproximadamente el 5 % o menos.

Ejemplo 2: Examen de la longitud del tallo del RNA halteriforme

Mediante el sintetizador de DNA anterior se sintetizaron RNAs representados por las SEC ID NOS: 4 a 13. Las SEC ID NOS: 4 y 5 forman un RNA bicatenario que forma 18 pares de bases (siRNA-1), las SEC ID NOS: 6 y 7 forman un RNA halteriforme cuya longitud de tallo es de 19 bases (Db-19), las SEC ID NOS: 8 y 9 forman un RNA halteriforme cuya longitud del tallo es de 23 bases (Db-23), las SEC ID NOS: 10 y 11 forman un RNA halteriforme cuya longitud del tallo es de 27 bases (Db-27), y las SEC ID NOS: 12 y 13 forman un RNA halteriforme cuya longitud del tallo es de 31 bases (Db- 31) (Figura 3).

Se llevó a cabo una reacción enzimática en la composición de RNA bicatenario 2 μ M, 1,0 unidades/ μ l de RNA ligasa T4, 0,006 % de BSA, 25 % de PEG6000, Tris - HCl 50 mM (pH 7,5), $MgCl_2$ 10 mM, DTT 10 mM y ATP 1 mM en un volumen de reacción en el intervalo entre 1,5 y 2,5 ml.

Más específicamente, se disolvió RNA bicatenario 5' fosforilado en un tampón (2 x tampón, mitad de la cantidad de solución de reacción final) que contiene Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), $MgCl_2$ 20 mM, DTT 20 mM y ATP 2 mM, a una concentración de 4 μ M. La solución se calentó a 65 °C durante 5 minutos y después se enfrió lentamente a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron la solución de BSA, la solución de PEG6000 y RNA ligasa T4 (Takara Bio Inc.) para formar la composición y el volumen de reacción anteriores. La solución se incubó después a 11 °C durante 20 horas.

Se recogió el RNA por precipitación con alcohol de la solución de reacción, y los productos ciclizados se aislaron usando PAGE. Las bandas que contienen las dianas se visualizaron por el método de oscurecimiento de UV, se recortaron, se machacaron en trozos pequeños, y se extrajeron 3 veces con 4 ml de un tampón de elución (NaCl 0,2 M, EDTA 1 mM (pH 8,0)). El extracto fue desalado con un cartucho Sep - Pak (eluido con 6 ml de 50 % de acetonitrilo en agua), se condensaron con un evaporador centrífugo, y se sometieron a nueva precipitación con alcohol en presencia de acetato de amonio. Las dianas fueron cuantificadas midiendo los espectros UV.

Se añadieron dos unidades de ColdShock - DICER (Takara Bio Inc.) a 2 μ g de cada uno de los RNAs halteriformes anteriores en un tampón que contiene Tris - HCl 20 mM (pH 8,5), NaCl 150 mM y $MgCl_2$ 2,5 mM (volumen de reacción: 20 μ l), y la solución resultante se incubó después a 37 °C. Al cabo de 1, 6 y 18 horas, se recogieron como muestra 3 μ l de la solución de reacción. Cada muestra se mezcló con 2 μ l de solución de EDTA 120 mM para terminar la reacción enzimática. Estas fueron entonces analizadas mediante PAGE nativa (10% PAGE, 1 x TBE) (después de haber sido

teñidas con 1 x SYBR Green I, se obtuvo imagen de las muestras y se cuantificaron en un BioRad Molecular Imager FX).

La Figura 4 muestra la PAGE de cada RNA halteriforme. Como control o testigo, se examinó por el mismo método una reacción de segmentación usando el RNA bicatenario antes de la reacción de conformación halteriforme como sustrato. Como resultado, la reacción de segmentación de Db-19 tuvo lugar aproximadamente un 5 % después de 1 hora, y se confirmó la producción de RNAs bicatenarios de 20 bases de longitud. Los fragmentos de la fragmentación de Db-19 en el intervalo de 20 bases mantuvieron casi el mismo nivel de concentración después de 6 y 18 horas. En cambio, casi el 100 % del control que incluye 19 pares de bases de cadena lineal (Liner) se segmentó al cabo de 1 hora, y se observaron RNAs bicatenarios de 20 bases de longitud. Posteriormente, los RNAs bicatenarios del producto fueron degradados y desaparecieron al cabo del tiempo. Con Db-23, aproximadamente el 8 % se segmentó al cabo de 1 hora, y se produjeron RNAs bicatenarios de 20 bases de longitud. Se confirmó que, a medida que aumenta la longitud del tallo, la velocidad de fragmentación después de 1 hora aumenta a 10 % y 20 % en Db-27 y Db-31, respectivamente. Al cabo de 18 horas, aproximadamente el 75 % de Db-19 se mantiene intacto mientras que Db-31 desapareció completamente. A partir de estos resultados, se reveló que los RNAs halteriformes con longitud del tallo más corta son más estables frente a una enzima.

Ejemplo 3: Efecto de interferencia de RNA del RNA halteriforme.

El efecto de interferencia de RNA de los RNAs halteriformes anteriores (Db- 19, Db -23, Db - 27 y Db - 31) se evaluó mediante un experimento de inhibición de la expresión del gen informador de la luciferasa de luciérnaga pGL3.

Se cultivaron células NIH 3T3 (Riken Cell Bank) en medio DMEM (GIBCO) que contiene 10% de FCS a 37 °C en 5% de CO₂, y se inoculó una parte alícuota del cultivo en cada pocillo de una placa de 96 pocillos a una concentración de 1,6 x 10⁴ células por pocillo. La muestra se siguió cultivando a 37 °C en 5% de CO₂ durante 39 horas para dar aproximadamente un 70% de confluencia. Las células fueron después cotransfectadas con dos tipos de vectores plasmídicos (p-GL3-Control y pRL-TK (para patrón interno), de Promega Corp.) y cada tipo de RNAs, usando el reactivo de transfección GenSilencer (Genlantis Inc.) de acuerdo con el protocolo que acompaña al reactivo de transfección. Las condiciones de concentración en el momento de la transfección son las siguientes.

0,2 µg de pGL3-Control/0,02 µg pRL-TK/RNA 25 nM (volumen final 100 µl)

GeneSilencer	1 µl
Medio DMEM	25 µl
Solución diluida de siRNA	2,5 µl
Medio DMEM	15 µl
RNA (5 pmol/µl)	0,5 µl
pGL3-Control (1 µg/µl)	0,2 µl
pRL-TK (0,1 µg/µl)	0,2 µl

44,4 µl

Después de la transfección, el cultivo se incubó a 37°C en 5% de CO₂ durante 4 horas. Después se añadieron a cada pocillo 100 µl de medio DMEM que contiene 20% de suero. Después de otra incubación a 37 °C durante 20 horas, las células fueron solubilizadas para cuantificar el nivel de expresión de luciferasa usando el ensayo Dual-luciferase Reporter Assay System (Promega Corp.) de acuerdo con el protocolo anexo (condiciones: la cantidad de reactivo 30 µl, tiempo de retardo 2 segundos, tiempo de lectura 10 segundos. Equipo: Wallac ARVO SX Multilabel Counter).

Para comparación, se evaluó un control (solamente el tampón) por el mismo método. La intensidad de fluorescencia de la luciferasa de luciérnaga fue corregida para la intensidad de fluorescencia de la luciferasa de renilla como patrón interno. Los resultados se muestran en la Figura 5. Al cabo de 24 horas, entre los RNAs halteriformes Db-23 mostró la actividad más alta y exhibió un efecto de inhibición tan bajo como 0,24. A partir de estos resultados, la longitud bicatenaria más preferida se estableció en 23 bases.

Ejemplo 4: Sostenibilidad del efecto de interferencia de RNA.

Se comparó la sostenibilidad del efecto de interferencia de RNA de Db-23 y siRNA-1.

Se cultivaron células NIH 3T3 en medio de Eagles modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco) suplementado con 10 % de suero de ternera fetal (FCS, Invitro/Gibco) en una cámara de 5 % de CO₂ humidificado. 40 horas antes de la transfección a aproximadamente el 70 % de confluencia, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una

densidad de $1,6 \times 10^4$ células por pocillo (100 μ l). La co-transfección de plásmidos informadores y RNA se llevó a cabo con GeneSilencer (Gene Therapy Systems, Inc.) como se describe por el fabricante para líneas de células adherentes. Por pocillo se aplicaron 16 ng/ μ l ó 1,6 ng/ μ l de pGL3 - Control (Promega Corp.), 1,6 ng/ μ l de pRL-TK (Promega Corp.) y RNA 25 nM formulado con el reactivo de transfección (100 μ l). Después de 4 h de incubación, se añadieron 100 μ l de FCS al 20 % en DMEM. Para una incubación prolongada de más de 3 días, el medio fue reemplazado según las necesidades. La expresión de luciferasa se controló después de 24 horas, 72 horas, y 120 horas con Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega Corp.) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas en el aparato Wallac ARVO SX 1420 Multilabel Counter (Perkin - Elmer, Inc.) (Fig. 6). Se utilizó como control una muestra sin RNA.

Db-23 y siRNA-1 mostraron ambos casi igual nivel de actividad de luciferasa después de 24 horas. Sin embargo, después de 120 horas, Db-23 mostró un efecto de supresión de la expresión génica más elevado. A partir de estos resultados, se mostró tanto el efecto de liberación lenta como el efecto de activación a largo plazo del RNA halteriforme.

Ejemplo 5: Estabilidad del RNA halteriforme en suero humano.

Se compararon la estabilidad de Db-23 y la de siRNA en suero humano.

4 μ l de dsRNA pre-alineado (siRNA-1, 20 μ M) o RNA halteriforme (Db-23, 20 μ M) en tampón de alineación (acetato potásico 100 mM, HEPES-KOH 30 mM (pH 7,4), acetato de magnesio 2 mM) se mezclaron con 32 μ l de PBS, 4 μ l de suero humano normal (Chemicon International, Inc.), se incubaron a 37 °C. Se tomó una parte alícuota (5 μ l) después de 0,5, 1, 1,5, 3, 8 y 20 horas. La reacción se analizó mediante PAGE nativa al 15 %, se tiñó con SYBR Green I y se visualizó con Molecular Imager FX (BioRad Laboratories, Inc.).

Como resultado, hasta un 50 % de siRNA se degradó después de 3 horas, mientras que el 80 % o más de Db-3 se mantuvo todavía después de 3 horas, y 70 % o más incluso después de 8 horas. Por tanto, es de esperar una alta estabilidad de Db-23 *in vivo*.

Aplicabilidad industrial

La presente invención puede ser utilizada como una molécula de ácido nucleico aplicable a los organismos vivos y puede producir la molécula con un rendimiento elevado.

REIVINDICACIONES

1. Un RNA circular monocatenario que tiene un efecto de interferencia de RNA sostenido o de liberación lenta, caracterizado porque el RNA circular monocatenario comprende una secuencia de cadena con sentido, una secuencia de cadena antisentido complementaria a la secuencia de cadena con sentido, dos secuencias de bucle idénticas o diferentes entre la cadena con sentido y la cadena antisentido, que conectan ambas cadenas, en donde la cadena con sentido y la cadena antisentido se emparejan para formar un tallo, y en donde cada una de las dos secuencias de bucle tiene de 6 a 9 nucleótidos de longitud.
2. El RNA circular monocatenario según la reivindicación 1ª, en el que la expresión de un RNA diana es 0,4, o menos, 24 horas después de la introducción del RNA circular monocatenario en células eucariotas, en comparación con las células de control cuyo nivel de expresión del RNA diana se establece en 1.
3. El RNA circular monocatenario según la reivindicación 1ª o 2ª, en el que el 70 % o más del mismo se mantiene después de 8 horas en suero humano.
4. Un método para producir el RNA circular monocatenario según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª, que comprende sintetizar una cadena con sentido y una cadena antisentido, comprendiendo ambas una secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en el extremo 5' y en el extremo 3', y simultáneamente ligar el nucleótido en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no emparejados en la cadena con sentido, con el nucleótido en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en la cadena antisentido, y viceversa, usando una ligasa, en donde la secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en el extremo 5' de la cadena con sentido y la secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en el extremo 3' de la cadena antisentido están unidos entre sí para formar un bucle, la secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en el extremo 3' de la cadena con sentido y la secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en el extremo 5' de la cadena antisentido están unidos entre sí para formar un bucle, y la cadena con sentido y la cadena antisentido están emparejadas para formar un tallo.
5. El método según la reivindicación 4ª, que comprende además fosforilar cada extremo 5' de la secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en la cadena con sentido y la secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no emparejados en la cadena antisentido.
6. El método según la reivindicación 4ª o 5ª, en el que las secuencias de bucle son idénticas o diferentes entre sí.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4ª a 6ª, en el que la longitud del bucle es de 19 a 31 nucleótidos.
8. Un método para suprimir la expresión de un gen que codifica una proteína *in vitro*, que comprende introducir el RNA circular monocatenario según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª en células derivadas de seres humanos, y deteriorar un RNA diana por el RNA circular monocatenario para inhibir la traducción del RNA diana en la proteína de una manera sostenida.
9. Un método para suprimir la expresión de un gen que codifica una proteína, que comprende introducir *in vitro* el RNA circular monocatenario según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª en células de un animal no humano o de una planta, y deteriorar un RNA diana por el RNA circular monocatenario para inhibir la traducción del RNA diana en la proteína de una manera sostenida.
10. Una composición farmacéutica que comprende el RNA circular monocatenario según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª como ingrediente activo.

Fig. 1

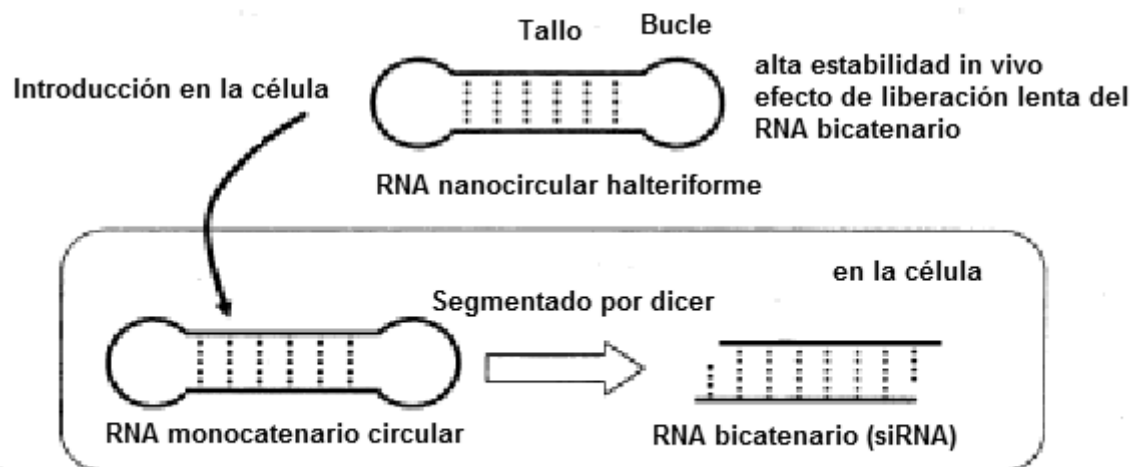


Fig. 2

Calle 1 2 3 4 5 6



56 bases

5' -p-GAG A CUU ACG CUG AGU ACU UCG A U C A
 U GAA UGC GAC UCA UGA AGC U A G A G
 3' - AACU

28 bases (Superior: cadena con sentido; inferior: cadena antisentido)

5' -p-GAG A CUU ACG CUG AGU ACU UCG A U UCAA -3'
 U GAA UGC GAC UCA UGA AGC U A GAG -p- 5'

5' - GUG CGC UGC UGG UGC CAA CUU
UU CAC GCG ACG ACC ACG GUU G - 5'

$\begin{array}{cccccccccccccccc} & G & A & G & & & & & & & & U & C & A & \\ A & & & A & GUG & CGC & UGC & UGG & UGC & CAA & C & U & & & A \\ & A & & U & CAC & GCG & ACG & ACC & ACG & GUU & G & A & & & A \\ & & C & U & & & & & & & & G & A & G \end{array}$

G A G U C A A
A A A U U C A A
A C U G A G

A A GUG CGC UGC UGG UGC CAA CCC U U
U U CAC GCG ACG ACC ACG GUU GGG A A

G A G U C A
A AAA GUG CGC UGC UGG UGC CAA CCC UAU U A
A U UUU CAC GCG ACG ACC ACG GUU GGG AUA A G A G
C U

G A G U C A
A UC AAA GUG CGC UGC UGG UGC CAA CCC UAU UC U A
A U AG UUU CAC GCG ACG ACC ACG GUU GGG AUA AG A G A G
C U

Fig. 4

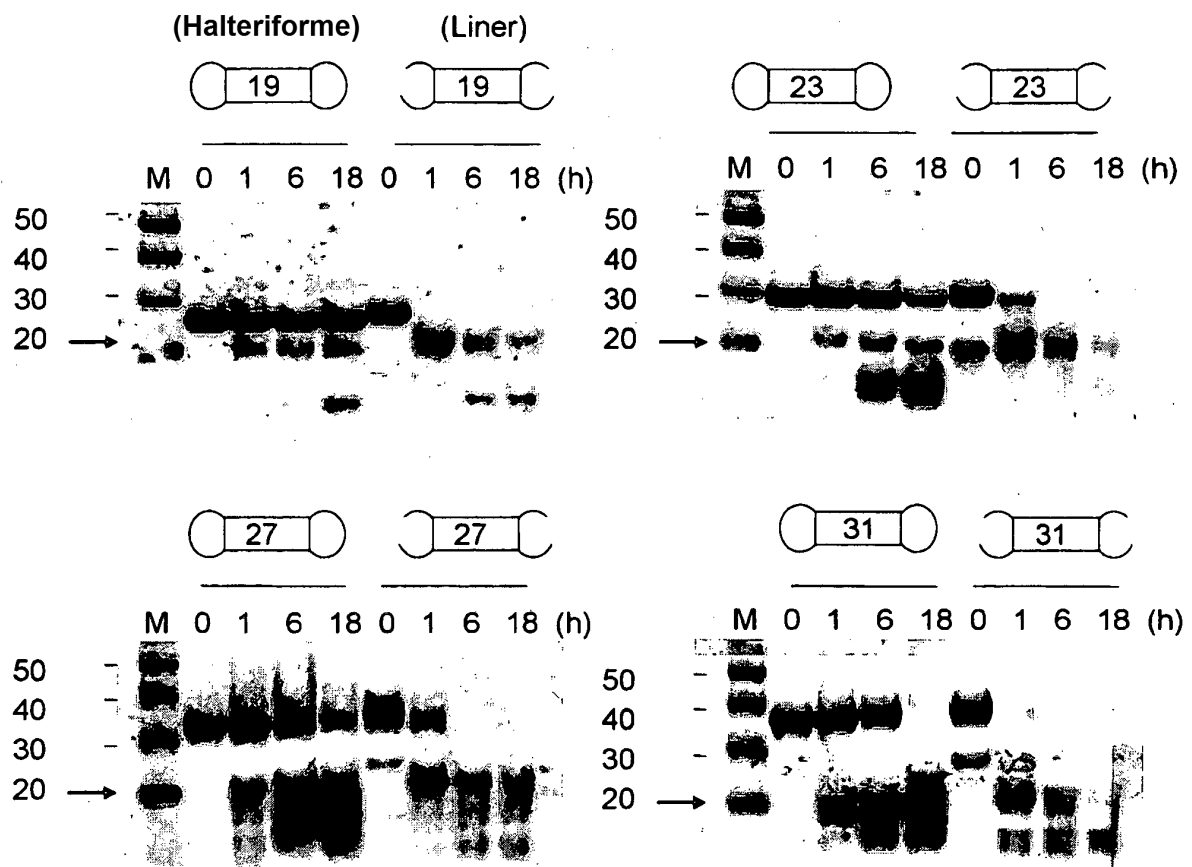


Fig. 5

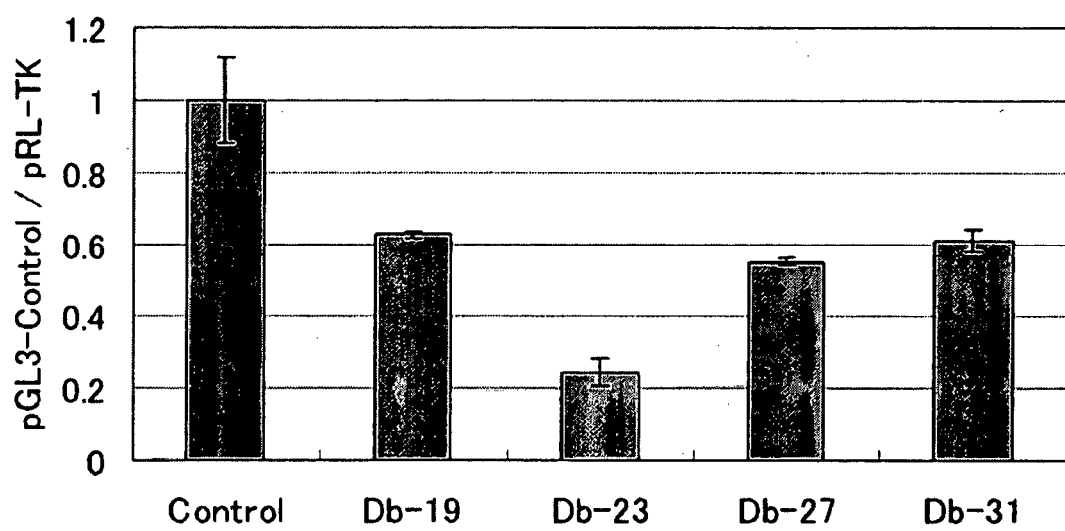


Fig. 6

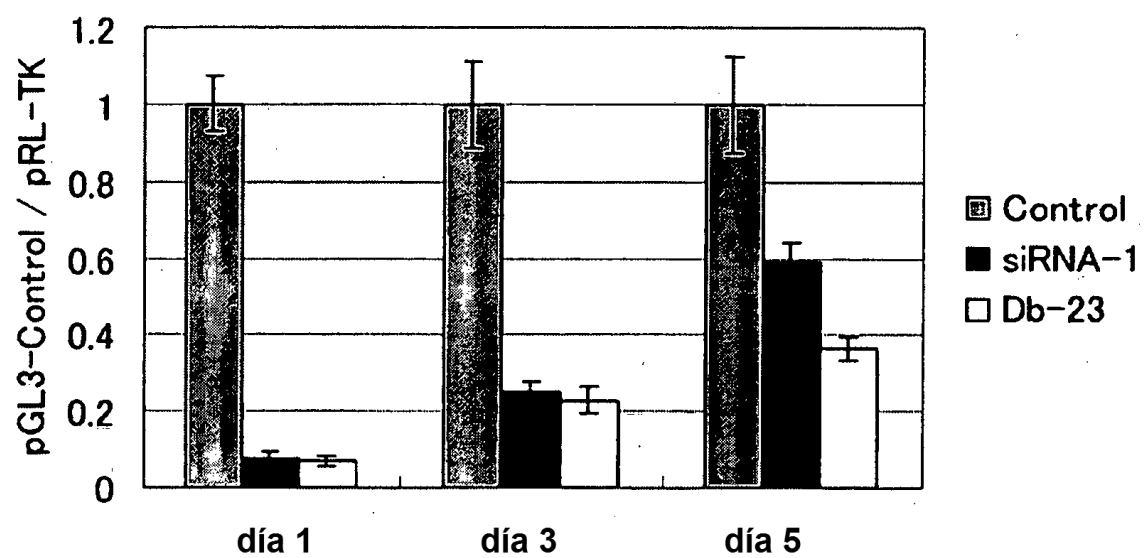


Fig. 7

