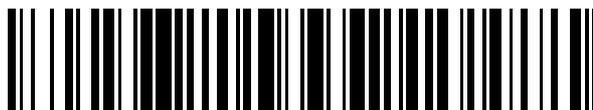


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 953**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2000 E 10011217 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2363479**

54 Título: **Oligorribonucleótido para inhibir la expresión de un gen predeterminado**

30 Prioridad:

30.01.1999 DE 19903713

24.11.1999 DE 19956568

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

24.01.2017

73 Titular/es:

ALNYLAM EUROPE AG (100.0%)

Fritz-Hornschuch-Strasse 9

95326 Kulmbach, DE

72 Inventor/es:

KREUTZER, ROLAND y

LIMMER, STEPHAN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 597 953 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

Oligorribonucleótido para inhibir la expresión de un gen predeterminado

La presente descripción hace referencia a procedimientos para inhibir la expresión de un gen diana predeterminado en una célula. También hace referencia a un medicamento y a una utilización de oligorribonucleótidos de hebra doble.

Un procedimiento de esa clase se conoce por la solicitud WO 99/32619, publicada posteriormente. El procedimiento conocido tiene por objetivo la inhibición de la expresión de genes en células de invertebrados. A tal efecto es necesario que el oligorribonucleótido de hebra doble presente una secuencia idéntica al gen diana con una longitud de al menos 50 bases. Para lograr una inhibición eficiente es necesaria una longitud de la secuencia idéntica de 300 a 1.000 pares de bases. La inversión para producir un oligorribonucleótido de esa clase es elevada.

En la solicitud DE 196 31 919 C2 se describe un ARN antisentido con estructuras secundarias especiales, presentándose el antisentido en forma de un vector que codifica las mismas. En el caso del ARN antisentido se trata de una molécula de ARN que es complementaria a regiones de mRNA. Mediante enlace en estas regiones se provoca una inhibición de la expresión génica. Esta inhibición se puede emplear en especial para el diagnóstico y/o terapia de enfermedades, por ejemplo enfermedades tumorales, o infecciones virales. De modo desventajoso, se debe introducir el ARN antisentido en la célula en una cantidad que presenta al menos la misma magnitud que la cantidad de mRNA. La eficacia de los procedimientos antisentido conocidos no es especialmente elevada.

Se conoce por la solicitud US 5,712,257 un medicamento que contiene ARN (dsARN) de hebra doble de pares defectuosos, y fragmentos biológicamente activos de pares defectuosos de dsARN en forma de un complejo ternario con un agente tensioactivo. El dsARN empleado en este caso está constituido por hebras simples de ácido nucleico obtenidas sintéticamente sin secuencia de bases definida. Las hebras simples efectúan entre sí apareamientos de bases irregulares, los denominados "Nict-Watson-Crick", de modo que se forman hebras dobles de pares defectuosos. El dsARN conocido sirve para la inhibición de la propagación de retrovirus, como VIH. Se puede inhibir la propagación del virus si dsARN de secuencia no específica se introduce en las células. En este caso se llega a una inducción de interferona, mediante lo cual se debe inhibir la propagación de virus. El efecto inhibitor, así como la eficacia de este procedimiento, es reducido.

Se conoce por Fire, A. y otros, NATURE, Vol. 391, página 806, que el dsARN, del cual una de sus hebras es complementaria por segmentos con respecto a un gen a inhibir de un nematodo, inhibe la expresión de este gen con una eficacia elevada. En dicho documento se sostiene la idea de que la eficacia especial del dsARN empleado en células del nematodo no se basa en el principio antisentido, sino posiblemente en propiedades catalíticas del dsARN, o bien se puede atribuir a enzimas inducidas por el mismo. En este artículo no se trata la eficacia de dsARN específico con relación a la inhibición de la expresión génica, en especial en células de mamíferos y células humanas.

El objeto de la presente invención consiste en eliminar los inconvenientes según el estado de la técnica. En especial debe proporcionarse un procedimiento, medicamento, o bien un uso lo más eficiente posible para la obtención de un medicamento, con el cual se pueda provocar una inhibición especialmente eficaz de la expresión de un gen diana predeterminado.

Este objeto se alcanzará a través de las características de la reivindicaciones 1 a 3. En las reivindicaciones 4 a 14 se indican variantes ventajosas.

La presente invención hace referencia a un oligorribonucleótido con estructura de hebra doble (dsARN) para inhibir la expresión de un gen diana predeterminado en células de mamíferos, donde el (dsARN) presenta entre 15 y 49 pares de bases, y una hebra del dsARN presenta una región I complementaria al gen diana al menos por segmentos, la cual presenta como máximo 49 pares de nucleótidos sucesivos, y una región II complementaria dentro de la estructura de hebra doble está formada por dos hebras individuales separadas de ARN, donde los nucleótidos del dsARN están modificados, donde al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos del dsARN está reemplazado por un grupo químico en la región complementaria II.

Para la inhibición de la expresión de un gen diana predeterminado en una célula está previsto introducir un oligorribonucleótido que presenta de 15 a 49 pares de bases con estructura de hebra doble (dsARN) en la célula, presentando una hebra de dsARN una región I complementaria al gen diana, al menos en algunos segmentos, que presenta a lo sumo 49 pares de nucleótidos sucesivos, y formándose una región II complementaria dentro de la estructura de hebra doble por dos hebras sencillas de ARN separadas. El oligorribonucleótido presenta al menos por segmentos una secuencia de nucleótidos definida. El segmento definido puede estar limitado a la región I complementaria. No obstante, también puede ser que el oligorribonucleótido de hebra doble presente en total una secuencia de nucleótidos definida. El dsARN puede ser más largo que la región I complementaria al gen diana. La

región I complementaria puede presentar disposición terminal, o estar insertada en el dsARN. Un dsARN de esa clase se puede obtener por vía sintética, o bien enzimática con procedimientos de uso común.

5 Sorprendentemente, se ha comprobado que ya con una longitud de la región complementaria I de como máximo 49 pares de bases se puede conseguir una inhibición eficaz de la expresión del gen diana. Se pueden poner a disposición oligorribonucleótidos correspondientes con un gasto de obtención más reducido.

10 En especial el dsARN con una longitud de más de 50 pares de nucleótidos induce determinados mecanismos celulares en células de mamíferos y células humanas, por ejemplo la proteína quinasa dependiente de dsARN, o el sistema 2-5A. Esto conduce a la desaparición del efecto de interferencia ocasionado por el dsARN que presenta una secuencia definida. De este modo se bloquea la biosíntesis de proteínas en la célula. Mediante la presente invención se elimina en particular ese inconveniente.

Además se facilita claramente la absorción de dsARN con longitud de cadena reducida en la célula, o bien en el núcleo celular, en comparación con el dsARN de cadena más larga.

15 Se ha comprobado como ventajoso que el dsARN se presente en estructuras micelares, preferentemente en liposomas. El dsARN puede estar incluido igualmente en cápsidas virales naturales, o en cápsidas sintéticas obtenidas por vía química o enzimática, o estructuras derivadas de las mismas. Las características citadas anteriormente posibilitan una inclusión del dsARN en células diana predeterminadas.

20 Convenientemente, el gen a inhibir se expresa en células eucariotas. El gen diana puede ser seleccionado a partir del siguiente grupo: oncogén, gen de citoquina, gen de proteína Id, gen de desarrollo, gen prión. También se puede expresar en organismos patógenos, preferentemente en plasmidios. Puede ser componente de un virus o viroide, preferentemente patógeno humano. El procedimiento propuesto posibilita la obtención de agentes para la terapia de enfermedades controladas genéticamente, por ejemplo cáncer, enfermedades virales o enfermedad de Alzheimer.

El virus o viroide puede ser también un virus o viroide patógeno animal o vegetal. En este caso, el procedimiento según la invención permite también la puesta a disposición de agentes para el tratamiento de enfermedades animales o vegetales.

25 El dsARN puede estar conformado en segmentos con hebra doble. Los extremos del dsARN pueden estar modificados para contrarrestar una degradación en la célula o una disociación en las hebras simples. Se presenta una disociación en especial en el caso del uso de bajas concentraciones o longitudes de cadena reducidas. Para la inhibición especialmente eficaz de la disociación se puede aumentar la cohesión de la estructura de hebra doble provocada por los pares de nucleótidos a través de al menos uno, preferentemente otros dos enlaces químicos. - Un
30 dsARN cuya disociación está reducida, presenta una estabilidad más elevada contra la degradación enzimática y química en la célula, así como en el organismo.

35 Convenientemente, el enlace químico se forma mediante un enlace covalente o iónico, un enlace por puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas, preferentemente interacciones de van-der-Waals o de apilamiento, o mediante coordinación de iones metálicos. Según una característica de una variante especialmente ventajosa, se puede obtener el mismo al menos en uno, preferentemente en ambos extremos de la región II complementaria.

40 Además, ha resultado ventajoso formar el enlace químico por medio de uno o varios grupos de enlace, siendo los grupos de enlace preferentemente cadenas de poli-(oxifosfinocooxi-1,3-propanodiol) y/o polietilenglicol. Se puede formar el enlace químico también mediante análogos de purina utilizados en lugar de purinas en las regiones II complementarias. Además, se considera ventajoso que el enlace químico se forme a través de unidades azabenceno introducidas en las regiones II complementarias. Dicho enlace se puede formar también mediante análogos de nucleótidos modificados utilizados en lugar de nucleótidos en las regiones II complementarias.

45 Se ha mostrado conveniente utilizar para la obtención del enlace químico al menos uno de los siguientes grupos: azul de metileno; grupos bifuncionales, preferentemente bis-(2-cloroetil)-amina; N-acetil-N'-(p-glioxil-benzoil)-cistamina; 4-tiouracilo; psoraleno. Además se puede formar el enlace químico mediante los grupos tiosforilo introducidos en los extremos de la región de hebra doble. Preferentemente, se obtiene el enlace químico en los extremos de la región de hebra doble mediante enlaces de triple hélice.

De manera conveniente, el enlace químico puede ser inducido mediante luz ultravioleta.

50 Los nucleótidos de dsARN pueden estar modificados. Esto provoca una activación de una proteína quinasa dependiente de ARN de hebra doble, PKR, en la célula. De acuerdo con la invención, al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos del dsARN en la estructura de hebra doble está reemplazado por un grupo químico, preferentemente un grupo 2'-amino o un grupo 2'-metilo. Al menos un nucleótido en al menos una hebra de la estructura de hebra doble puede ser también un denominado "locked nucleotide" con un anillo sacárico modificado

químicamente, de modo preferente a través de un puente 2'-0, 4'-C-metileno. Ventajosamente, varios nucleótidos son nucleótidos bloqueados (del inglés "locked nucleotide").

5 El dsARN puede estar enlazado, asociado, o rodeado por al menos una proteína envolvente viral procedente de un virus, derivada del mismo, u obtenida sintéticamente. La proteína envolvente puede ser derivada del virus de polio. La proteína envolvente puede contener la proteína viral 1(VP1) y/o la proteína viral 2(VP2) del virus de polio. Se conoce el empleo de tales proteínas envolventes, por ejemplo, por la solicitud DE 196 18 797 A1. - Las características citadas anteriormente facilitan de manera esencial la introducción de dsARN en la célula.

10 Preferentemente, en el caso de formación de una cápsida o de una estructura de tipo cápsida a partir de la proteína envolvente, uno de los lados está orientado al interior de la cápsida o de la estructura de tipo cápsida. La estructura formada es especialmente estable.

El dsARN puede ser complementario al elemento de transcripción de ARN primario o procesado del gen obtenido. - La célula puede ser una célula de vertebrado o una célula humana.

15 Se pueden introducir al menos dos dsARN diferentes entre sí en la célula, siendo una hebra de cada dsARN complementaria, al menos por segmentos, respectivamente a uno de al menos dos genes diana diferentes. De este modo es posible inhibir simultáneamente la expresión de al menos dos genes diana diferentes. Para suprimir la expresión de una proteína quinasa dependiente de ARN de hebra doble PKR, en la célula, uno de los genes diana es, de manera ventajosa, el gen PKR. De este modo se puede suprimir eficazmente la actividad de PKR en la célula.

20 De acuerdo con la invención se proporciona además un medicamento con al menos un oligorribonucleótido que presenta entre 15 y 49 pares de bases, con estructura de hebra doble (dsARN) para inhibir la expresión de un gen diana predeterminado en células de mamíferos, donde una hebra del dsARN presenta una región I complementaria al gen diana al menos por segmentos, la cual presenta como máximo 49 pares de nucleótidos sucesivos, y una región II complementaria dentro de la estructura de hebra doble está formada por dos hebras individuales separadas de ARN, donde los nucleótidos del dsARN están modificados, donde al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos del dsARN está reemplazado por un grupo químico en la región complementaria II. Sorprendente se ha comprobado que un ARN de esa clase es apropiado como medicamento para la inhibición de la expresión de un gen predeterminado en células de mamíferos. La inhibición, en comparación con el empleo de oligorribonucleótidos de hebra simple, se ocasiona ya a concentraciones que son más reducidas al menos en un orden de magnitud. El medicamento según la invención es altamente eficaz. Pueden esperarse efectos secundarios más reducidos. Sorprendentemente, se ha comprobado que ya con una longitud de la región I complementaria de un máximo de 49 pares de bases se puede conseguir una inhibición eficiente de la expresión del gen diana. Se pueden poner a disposición oligorribonucleótidos correspondientes con un gasto de obtención más reducido.

35 De acuerdo con la invención se prevé además la utilización de un oligorribonucleótido que presenta entre 15 y 49 pares de bases, con estructura de hebra doble (dsARN) para producir un medicamento para inhibir la expresión de un gen diana predeterminado en células de mamíferos, donde una hebra del dsARN presenta una región I complementaria al gen diana al menos por segmentos, la cual presenta como máximo 49 pares de nucleótidos sucesivos, y una región II complementaria dentro de la estructura de hebra doble está formada por dos hebras individuales separadas de ARN, donde los nucleótidos del dsARN están modificados, donde al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos del dsARN está reemplazado por un grupo químico en la región complementaria II. - Sorprendentemente, un dsARN de esa clase es apropiado para la obtención de un medicamento para la inhibición de la expresión de un gen predeterminado. En el caso de un empleo de dsARN, la inhibición se ocasiona ya a concentraciones más reducidas en un orden de magnitud, en comparación con el empleo de oligorribonucleótidos de hebra simple. Por lo tanto, la utilización de acuerdo con la invención posibilita la obtención de medicamentos especialmente eficaces.

45 Con respecto a las variantes ventajosas del medicamento y a la utilización se remite a la descripción de las características precedentes.

A continuación, por medio de las figuras se explican más detalladamente ejemplos de ejecución de la invención. Las figuras muestran:

Figura 1: la representación esquemática de un plásmido para la transcripción in vitro con polimerasa T7 y SP6,

Figura 2: ARN según electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% y coloración de bromuro de etidio,

50 Figura 3: una representación de elementos de transcripción de ARN radioactivos según la electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% con urea 7 M por medio de un "Instant Imagers", y

Figura 4 a-e: fluorescencia de Texas-Rot y YPF en fibroblastos murinos.

Ejemplo de ejecución 1:

Se identificó la inhibición de la transcripción mediante dsARN de secuencias homólogas en un sistema de transcripción in vitro con un extracto nuclear a partir de células HeLa humanas. La matriz de ADN para este ensayo era el plásmido linealizado por medio de BamHI pCMV1200.

5 Obtención de los plásmidos matriz:

Para el empleo en la síntesis enzimática de dsARN se construyó el plásmido representado en la figura 1. A tal efecto se realizó en primer lugar una reacción en cadena de polimerasa (PCR) con el kit de transcripción "positive control DNA" de HeLaScribe® Nuclear Extract in vitro de la firma Promega, Madison, USA como matriz de ADN. Uno de los cebadores empleados contenía la secuencia de un punto de corte EcoRI y del promotor de polimerasa T7-ARN según el protocolo de secuencia número 1. El otro cebador contenía la secuencia de un punto de corte BamHI y del promotor de polimerasa SP6-ARN según el protocolo de secuencia número 2. Además, ambos cebadores presentan en sus extremos 3' regiones idénticas, o bien complementarias, respecto a la matriz ADN. El PCR se realizó por medio del "Taq PCR Core Kit" de la firma Qiagen, Hilden, Alemania, según datos del fabricante. En un volumen de 100 µl se emplearon como matriz MgCl₂ 1,5 mM respectivamente dNTP 200 µM, respectivamente cebador 0,5 µM, 2,5 U de Taq-ADN-polimerasa, y aproximadamente 100 ng de "positive control DNA" como matriz en tampón de PCR. Tras el desnaturalizado inicial del ADN matriz mediante calentamiento a 94°C durante 5 minutos, se efectuó la amplificación en 30 ciclos de 60 segundos respectivamente de desnaturalizado a 94°C, condensación de 60 segundos a 5°C por debajo de la temperatura de fusión calculada del cebador, y 1,5-2 minutos de polimerización a 72°C. Tras una polimerización final de 5 minutos a 72°C se analizaron 5 ml de la carga de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa. La longitud del fragmento de ADN amplificado de este modo ascendía a 400 pares de bases, correspondiendo 340 pares de bases al "positive control DNA". Se purificó el producto de PCR, se hidrolizó con EcoRI y BamHI, y tras nueva purificación se empleó para la unión con un vector pUC18, igualmente hidrolizado por medio de EcoRI y BamHI. Se efectuó la transformación de azul de E. Coli XL1. El plásmido obtenido (pCMV5) porta un fragmento de ADN, que es flanqueado en el extremo 5' por el promotor T7, y en el extremo 3' por el promotor SP6. Mediante linealizado del plásmido con BamHI, se puede emplear in vitro con la T7-ARN-polimerasa para la transcripción run-off de un ARN de 340 nucleótidos de longitud, representado en el protocolo de secuencia número 3, de hebras simple. Si se linealiza el plásmido con EcoRI, se puede emplear para la transcripción run-off con la SP6-ARN-polimerasa, produciéndose la hebra complementaria. De forma correspondiente al procedimiento representado anteriormente se sintetizó también un ARN más largo en 23 nucleótidos. A tal efecto se unió un ADN representado en el protocolo de secuencia nº 4, a través de los puntos de corte EcoRI y BamHI, con el vector pUC18.

Como matrices de ADN para la transcripción in vitro con extracto nuclear HeLa se construyó el plásmido pCMV1200. A tal efecto se amplificó un fragmento EcoRI/BamHI de 1191 bp de tamaño con el ADN de control positivo obtenido en el kit de transcripción HeLaScribe® Nuclear Extract in vitro, por medio de PCR. El fragmento amplificado comprendía el promotor CMV de 828 bp de tamaño "inmediatamente anterior", y un fragmento de ADN transcribible de 363 bp de tamaño. Se ligó el producto de PCR a través de un ligamiento "parte sobresaliente T" con el vector pGEM-T. En el extremo 5' del fragmento se encuentra un punto de corte BamHI. Se linealizó el plásmido mediante hidrólisis con BamHI, y se empleó como matriz para la transcripción run-off.

Transcripción in vitro de las hebras dobles complementarias:

Se linealizó ADN de plásmido pCMV5 con EcoRI, o bien BamHI. Se empleó el mismo como matriz de ADN para una transcripción in vitro de las hebras simples de ARN complementarias con SP6, o bien T7-ARN-polimerasa. Para ello se empleó el sistema "Riboprobe in vitro Transcription" de la firma Promega, Madison, USA. Según los datos del fabricante se incubaron 2 µg de ADN de plásmido linealizado en 100 µl de tampón de transcripción y 40 U T7- o SP6-ARN- polimerasa 5 a 6 horas a 37°C. A continuación se degradó la matriz de ADN mediante adición de 2,5 µl de DNasa RQ1 exento de RNasa, e incubación durante 30 minutos a 37°C. Se completó la carga de transcripción con H₂O a 300 µl, y se purificó mediante extracción con fenol. Se precipitó el ARN mediante adición de 150 µl de acetato amónico 7 M, y 1125 µl de etanol, y se conservó a -65°C para la hibridación.

Obtención de las hebras dobles de ARN:

Para la hibridación se centrifugaron 500 µl del ARN de hebras simple conservado en etanol y precipitado. Se secó el comprimido resultante, y se absorbió en 30 µl de tampón PIPES, pH 6,4, en presencia de un 80 % de formamida, 400 mM NaCl y 1 mM EDTA. Se reunieron respectivamente 15 µl de hebras simples complementarias, y se calentaron durante 10 minutos a 85°C. A continuación se incubaron las cargas a 50°C durante la noche, y se enfriaron a temperatura ambiente.

En la hibridación se emplearon sólo cantidades aproximadamente equimolares de ambas hebras simples. De este modo, las preparaciones de dsARN contenían ARN (ssARN) de hebra simple como contaminación. Para eliminar

estas contaminaciones de ssARN, se trataron las cargas tras la hibridación con las ribonucleasas específicas de hebra simple RNasaA de páncreas de vaca, y RNasaT1 de *Aspergillus oryzae*. RNasaA es una endorribonucleasa específica para pirimidinas. RNasaT1 es una endorribonucleasa, que corta preferentemente en el lado 3' de guanosinas. dsARN no es un sustrato para estas ribonucleasas. Para el tratamiento de RNasa se añadió a las cargas en 300 µl Tris, pH 7,4, NaCl 300 mM y EDTA 5 mM, 1,2 µl RNasaA en una concentración de 10 mg/ml y 2 µl de RNasaT1 en una concentración de 290 µg/ml. Se incubaron las cargas 1,5 horas a 30°C. Después se desnaturalizaron las RNasas mediante adición de 5 µl de proteínaasa K en una concentración de 20 mg/ml, así como 10 µl de SDS al 20 %, e incubación durante 30 minutos a 37°C. Se purificó el dsARN mediante extracción con fenol, y se precipitó con etanol. Para poder verificar la integridad de la digestión de RNasa, se trataron dos cargas de control con ssARN análogamente a las cargas de hibridación.

Se absorbió el comprimido desecado en 15 µl de tampón TE, pH 6,5, y se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida nativa en un gel al 8 %. A continuación se tiñó el gel de acrilamida en una disolución de bromuro de etidio, y se lavó en un baño de agua. La figura 2 muestra el ARN visibilizado en un transiluminador UV. Los ARN sentido aplicados en la vía 1, y antisentido aplicados en la vía 2, mostraban bajo las condiciones seleccionadas un comportamiento de dilución diferente que los dsARN de la carga de hibridación aplicados en la vía 3. El ARN sentido, o bien antisentido aplicado en las vías 4, o bien 5, tratado con RNasa, no generaba ninguna banda visible. Esto muestra que los ARNs de hebra simple se degradaron completamente. El dsARN aplicado en la vía 6, tratado con RNasa de la carga de hibridación, es resistente frente al tratamiento con RNasa. La banda de migración más rápida en el gel nativo en comparación con el dsARN aplicado en la vía 3, resulta de dsARN, que está exento de ssARN. Además de las bandas principales dominantes, tras el tratamiento con RNasa se presentan bandas más débiles, de migración más rápida.

Test de transcripción in vitro con extracto nuclear celular humano:

Utilizando el kit de transcripción HeLaScribe® Nuclear Extract in vitro de la firma Promega, Madison, USA se determinó la eficiencia de transcripción del fragmento de ADN indicado anteriormente, obtenido en el plásmido pCMV1200, homólogo al "positive control DNA", en presencia del dsARN (dsARN-CMV5) de secuencias homólogas. Además se analizó la influencia de dsARN (dsARN-YFP) de secuencias no homólogas, correspondiente al gen (YFP) "proteína fluorescente amarilla". Este dsARN se había obtenido análogamente al dsARN de secuencias homólogas. La secuencia de una hebra de este dsARN se puede extraer del protocolo de secuencia número 5. Como matriz para la transcripción run-off se utilizó el plásmido pCMV1200. Éste porta el promotor "inmediatamente anterior" del virus de citomegalia, que es identificado por las polimerasas de ARN eucariotas II, y un fragmento de ADN transcribible. La transcripción tuvo lugar mediante el extracto nuclear HeLa, el cual contiene todas las proteínas necesarias para una transcripción. A través de la adición de (α -³²P) rGTP a la carga de transcripción se obtuvo elemento de transcripción marcado de forma radiactiva. El [α -³²P]rGTP utilizado presentó una actividad específica de 400 Ci/mmol, 10 mCi/ml. Por carga se utilizaron 3 mM de MgCl₂, respectivamente 400 µM de rATP, rCTP, rUTP, 16 µM de rGTP, 0,4 µM [α -³²P]rGTP y, dependiendo del ensayo 1 fmol de ADN de plásmido linealizado y diferentes cantidades de dsRNA en el tampón de transcripción. Cada carga se completó con H₂O hasta alcanzar un volumen de 8,5 µl. Las cargas se mezclaron con cuidado. Para iniciar la transcripción, 4 U de extracto nuclear HeLa se agregaron en un volumen de 4 µl y se incubaron por 60 minutos a 30°C. La reacción finalizó a través de la adición de 87,5 µl de mezcla de interrupción calentada a 30°C. Para extraer las proteínas, las cargas se mezclaron con 100 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (2.5:24:1, v/v/v), saturado con tampón E, pH 5,0, y se mezcló de forma enérgica por 1 minuto. Para la separación de las fases se centrifugó aproximadamente 1 minuto a 12000 rpm y la fase superior se traspasó a un nuevo recipiente de reacción. A cada carga se agregaron 250µl de etanol. Las cargas se mezclaron bien y se incubaron durante al menos 15 minutos en hielo seco/metanol. Para la precipitación del ARN, las cargas fueron centrifugadas 20 minutos a 12000 rpm y a 4°C. El líquido sobrenadante se desechó. El comprimido se secó 15 minutos en vacío y se suspendió nuevamente en 10 µl de H₂O. A cada carga se agregaron 10 µl de tampón de prueba desnaturalizado. La separación del GTP libre del elemento de transcripción producido tuvo lugar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante, en un gel al 8 % con urea 7M. Los elementos de transcripción de ARN formados durante la transcripción con extracto nuclear HeLa en tampón de prueba desnaturalizante fueron calentados durante 10 minutos a 90°C y 10 µl de los mismos se colocaron de inmediato en los recipientes de prueba lavados en el momento. La electroforesis tuvo lugar a 40 mA. La cantidad de ssARN radiactiva formada durante la transcripción fue analizada después de la electroforesis con la ayuda de un Instant Imager.

La figura 3 muestra el ARN radiactivo sintetizado por medio del Instant Imagers a partir de un test representativo. Se aplicaron muestras obtenidas a partir de las siguientes cargas de transcripción:

- vía 1: sin ADN matriz, sin dsARN;
- vía 2: 50 ng de ADN matriz, sin dsARN;
- vía 3: 50 ng de ADN matriz, 0,5 µg de dsARN-YPF;

- vía 4: 50 ng de ADN matriz, 1,5 µg de dsARN-YFP;
- vía 5: 50 ng de ADN matriz, 3 µg de dsARN-YFP;
- vía 6: 50 ng de ADN matriz, 5 µg de dsARN-YFP;
- vía 7: sin ADN matriz, 1,5 de dsARN-YFP;
- 5 vía 8: 50 ng de ADN matriz, sin dsARN;
- vía 9: 50 ng de ADN matriz, 0,5 µg de dsARN-CMV5;
- vía 10: 50 ng de ADN matriz, 1,5 µg de dsARN-CMV5;
- vía 11: 50 ng de ADN matriz, 3 µg de dsARN-CMV5;
- vía 12: 50 ng de ADN matriz, 5 µg de dsARN-CMV5;

10 Se mostró una clara reducción de la cantidad de elemento de transcripción en presencia de dsARN de secuencias homólogas en comparación con la carga de control sin dsARN, así como también respecto a las cargas con dsARN-YFP de secuencias no homólogas. El control positivo en la vía 2 muestra que, en la transcripción in vitro con extracto nuclear HeLa, se formó elemento de transcripción radiactivo. La carga sirve como comparación con las cargas de transcripción, que se habían incubado en presencia de dsARN. Las vías 3 a 6 muestran que la adición de dsARN-YFP de secuencias no específicas no ejerce ninguna influencia sobre la cantidad del elemento de transcripción formado. Las vías 9 a 12 muestran que la adición de una cantidad, situada entre 1,5 y 3 µg, de dsARN-CMV5 de secuencias específicas, conduce a un descenso de la cantidad de elemento de transcripción formado. Para excluir que los efectos observados no se basen en el dsARN, sino en una contaminación arrastrada posiblemente de manera involuntaria en la obtención de dsARN, se llevó a cabo un control adicional. Se transcribió como se ha descrito anteriormente el ARN de hebra simple, y a continuación se sometió al tratamiento con RNasa. Por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida nativa se pudo mostrar que el ssARN se había degradado completamente. Esta carga se sometió, como las cargas de hibridación, a una extracción con fenol y una precipitación con etanol, y a continuación se absorbió en tampón TE. De este modo se obtuvo una muestra que no contenía ARN, pero que se había tratado con los mismos tampones y enzimas que el dsARN. La vía 8 muestra que la adición de esta muestra no tiene influencias sobre la transcripción. El descenso del elemento de transcripción en el caso de adición de dsARN de secuencias específicas, por lo tanto, se puede asignar claramente al propio dsARN. La reducción de la cantidad de elemento de transcripción de un gen en presencia de dsARN en el caso de un sistema de transcripción humano muestra una inhibición de la expresión del gen correspondiente. Este efecto se puede atribuir a un nuevo mecanismo, provocado por el dsARN.

30 **Ejemplo de ejecución 2:**

Como sistema de ensayo para estos experimentos in vivo se utilizó la línea celular de fibroblastos murinos NIH3T3, ATCC, CRL-1658. Con ayuda de la microinyección se introdujo el gen del YFP en el núcleo celular. Se analizó la expresión de YFP bajo la influencia de dsARN de secuencias homólogas, transferidos de modo concomitante simultáneamente. Este dsARN-YFP es, a través de una longitud de 315 bp, homólogo a la región 5' del gen de YFP. 35 La secuencia de nucleótidos de una hebra de dsARN-YFP se representa en el protocolo de secuencia número 5. La valoración bajo el microscopio de fluorescencia se efectuó 3 horas después de inyección por medio de fluorescencia amarilla-verde de YFP formado.

Construcción del plásmido matriz y obtención del dsARN:

40 Como matriz para la obtención de YFP-dsARN por medio de transcripción T7 y SP6-in vitro se construyó un plásmido según el mismo principio que se describe en el ejemplo de ejecución 1. El fragmento génico deseado se amplificó bajo empleo del cebador Eco_T7_YFP según el protocolo de secuencia número 6, y Bam_SP6_YFP según el protocolo de secuencia número 7, por medio de PCR, y se empleó análogamente a la anterior descripción respecto a la obtención de dsARN. El dsARN-YFP obtenido es idéntico al dsARN empleado en el ejemplo de ejecución 1 como control de secuencias no específicas.

45 Se obtuvo un dsARN (L-dsARN) enlazado químicamente con el extremo 5' del ARN complementario en el extremo 3' del ARN según el protocolo de secuencia número 8 a través de un grupo cebador C18. A tal efecto se emplearon sintones modificados con puentes disulfuro. El sintón 3' terminal está unido al soporte sólido a través del carbono 3' con un grupo cebador alifático a través de un puente disulfuro. En el sintón 5' terminal del oligorribonucleótido complementario, complementario al sintón 3'-terminal de uno de los oligorribonucleótidos, el grupo protector 5'-trilito 50 está enlazado a través de un cebador alifático adicional y un puente disulfuro. Tras la síntesis de ambas hebras

simples, eliminación de grupos protectores e hibridación de los oligorribonucleótidos complementarios, los grupos tiol producidos llegan a la proximidad espacial entre sí. Mediante oxidación se enlazan entre sí las hebras simples a través de su cebador alifático y un puente disulfuro. A continuación se efectúa la purificación con ayuda de HPLC.

Preparación de cultivos celulares:

- 5 Se incubaron las células en DMEM con 4,5 g/l de glucosa, 10 % de suero vacuno fetal bajo un 7,5 % de atmósfera de CO₂ a 37°C en cubetas de cultivo, y se pasaron antes de alcanzar la confluencia. El desprendimiento de las células se efectuó con tripsina/EDTA. Para la preparación de la microinyección se trasladaron las células a cubetas de petri, y se incubaron adicionalmente hasta la formación de microcolonias.

Microinyección:

- 10 Para la microinyección, las cubetas de cultivo se extrajeron del incubador durante aproximadamente 10 minutos. Se inyectó de manera aislada en aproximadamente 50 núcleos celulares por carga dentro de una región marcada bajo empleo del sistema de microinyección AIS de la firma Carl Zeiss, Göttingen, Alemania. A continuación se incubaron las células otras 3 horas. Para la microinyección se prepararon capilares de vidrio de silicato bórico de la firma Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Alemania, con un diámetro de punta por debajo de 0,5 µm. Se llevó a cabo la
15 microinyección con un micromanipulador de la firma Narishige Scientific Instrument Lab., Tokio, Japón. El tiempo de inyección ascendió a 0,8 segundos, la presión aproximadamente a 100 hPa. Para la transfección se empleó el plásmido pCADN-YFP, que contenía un fragmento BamHI/EcoRI de aproximadamente 800 bp de tamaño con el gen de YFP en el vector pcADN3. Las muestras inyectadas en los núcleos celulares contenían 0,01 µg/µl de pCADN-YFP, así como Texas-Rot copulado en dextrano-70.000 en NaCl 14 mM, KCl 3 mM, KPO₄ 10 mM, pH 7,5.
20 Adicionalmente se añadieron unos 100 pl de ARN con una concentración de 1 µM, o bien 375 µM en el caso de L-dsARN.

- 25 Se analizaron las células por medio de un microscopio de fluorescencia en el caso de excitación con luz de longitudes de onda de excitación de Texas-Rot, 568 nm, o bien de YFP, 488 nm. Se documentaron células aisladas por medio de una cámara digital. Las figuras 4a-e muestran el resultado para células NIH3T3. En el caso de las células mostradas en la figura 4a se ha inyectado YFP-ssARN sentido, en la figura 4b YFP-ssARN antisentido, en la figura 4c dsARN-YFP, en la figura 4d no se ha inyectado ARN y en la figura 4e se ha inyectado LdsARN.

- 30 El campo izquierdo respectivamente muestra la fluorescencia de células que se excitaron con 568 nm. A la derecha se puede ver la fluorescencia de las mismas células en el caso de excitación con 488 nm. La fluorescencia de Texas-Rot de todas las células representadas muestra que la disolución de inyección se aplicó con éxito en los núcleos celulares, y las células afectadas estaban aún vivas después de 3 horas. Las células muertas ya no mostraban fluorescencia de Texas-Rot.

- 35 [0047] Los campos derechos respectivamente de las figuras 4a y 4b muestran que la expresión de YFP no se inhibió de manera visible en el caso de inyección de ARN de hebra simple en los núcleos celulares. El campo derecho de la figura 4c muestra células cuya fluorescencia de YFP ya no era identificable tras la inyección de dsARN-YFP. La figura 4d muestra como control células en las que no se había inyectado ARN. La célula representada en la figura 4e muestra, a través de la inyección de L-dsARN, que presenta regiones de secuencias homólogas al gen de YFP, una fluorescencia de YFP ya no identificable. Este resultado justifica que también los dsARN más cortos se pueden emplear para la inhibición específica de la expresión génica en mamíferos, si se estabilizan las hebras dobles mediante enlace químico de las hebras simples.

- 40 Se describen además los siguientes puntos:

1. Oligorribonucleótido con estructura de hebra doble (dsARN) para inhibir la expresión de un gen diana predeterminado en células de mamíferos, donde el dsARN presenta entre 15 y 49 pares de bases, presentando una hebra de dsARN una región I complementaria al gen diana al menos por segmentos, que presenta a lo sumo 49 pares de nucleótidos sucesivos, y estando formada una región II complementaria dentro de la estructura de hebra
45 doble por dos hebras simples de ARN separadas 10.

2. DsARN según el punto 1, donde el dsARN presenta entre 15 y 21 pares de bases.

3. DsARN según uno de los puntos 1 ó 2, donde el dsARN presenta entre 21 y 49 pares de bases.

4. DsARN según uno de los puntos precedentes, donde el dsARN presenta 21 pares de bases.

5. DsARN según uno de los puntos precedentes, siendo seleccionado el gen diana a partir del siguiente grupo:

- 50 oncogén, gen de citoquina, gen de proteína Id, gen de desarrollo, gen PKR, gen prión.

6. DsARN según uno de los puntos precedentes, donde la región I es totalmente complementaria con respecto al gen diana.
7. DsARN según uno de los puntos precedentes, presentándose el dsARN empaquetado en estructuras micelares, preferentemente en liposomas.
- 5 8. DsARN según uno de los puntos precedentes, estando incluido el dsARN en cápsidas virales naturales, o en cápsidas artificiales obtenidas por vía química o enzimática, o estructuras derivadas de las mismas.
9. DsARN según uno de los puntos precedentes, siendo el gen diana componente de un virus o de un viroide.
10. DsARN según el punto 9, siendo el virus, un virus o viroide patógeno humano.
11. DsARN según el punto 9, siendo el virus o viroide un virus o viroide patógeno animal.
- 10 12. DsARN según uno de los puntos precedentes, presentando el dsARN configuración de hebra doble al menos por segmentos.
13. DsARN según uno de los puntos precedentes, estando modificados los extremos de dsARN para contrarrestar una degradación en las células de mamíferos o una disociación en las hebras simples.
- 15 14. DsARN según uno de los puntos precedentes, siendo elevada la cohesión de la región complementaria II, ocasionada por los pares de nucleótidos, a través de al menos uno, preferentemente dos enlaces químicos adicionales.
15. DsARN según uno de los puntos precedentes, donde el enlace químico está formado por una unión covalente o iónica, un enlace por puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas, preferentemente interacciones de van-der-Waals o de apilamiento, o mediante coordinación de iones metálicos.
- 20 16. DsARN según uno de los puntos precedentes, siendo obtenido el enlace químico en al menos uno, preferentemente en ambos extremos de la región complementaria II.
17. DsARN según uno de los puntos precedentes, estando formado el enlace químico por medio de uno o varios grupos de enlace, siendo los grupos de enlace preferentemente cadenas de poli-(oxifosfinicooxi-1,3-propanodiol) y/o polietilenglicol.
- 25 18. DsARN según uno de los puntos precedentes, siendo formado el enlace químico a través de análogos de purina utilizados en las regiones II complementarias en lugar de purinas.
19. DsARN según uno de los puntos precedentes, estando formado el enlace químico a través de unidades azabenceno introducidas en las regiones II complementarias.
- 30 20. DsARN según uno de los puntos precedentes, estando formado el enlace químico a través de análogos de nucleótidos ramificados utilizados en lugar de nucleótidos en las regiones II complementarias.
21. DsARN según uno de los puntos precedentes, utilizándose para la obtención del enlace químico al menos uno de los siguientes grupos: azul de metileno; grupos bifuncionales, preferentemente bis-(2-cloroetil)-amina; N-acetil-N'-(p-glioxil-benzoi)-cistamina; 4-tiouracilo; psoraleno.
- 35 22. DsARN según uno de los puntos precedentes, formándose el enlace químico mediante grupos tiofosforilo previstos en los extremos de la región de hebra doble.
23. DsARN según uno de los puntos precedentes, siendo el enlace químico enlaces de triple hélice previstos en los extremos de la región de hebra doble.
24. DsARN según uno de los puntos precedentes, estando modificados los nucleótidos de dsARN.
- 40 25. DsARN según uno de los puntos precedentes, estando sustituido al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos del dsARN en la región complementaria II por un grupo químico, preferentemente un grupo 2'-amino, o 2'-metilo.

26. DsARN según uno de los puntos precedentes, siendo al menos un nucleótido en al menos una hebra de la región II complementaria un "locked nucleotide" con un anillo sacárico modificado químicamente, preferentemente por medio de un puente 2'-O, 4'-C-metileno.
- 5 27. DsARN según uno de los puntos precedentes, enlazándose el dsARN a al menos una proteína envolvente viral procedente de un virus, derivado del mismo, u obtenida sintéticamente, asociándose con la misma, o envolviéndose por la misma.
28. DsARN según uno de los puntos precedentes, siendo la proteína envolvente derivada del virus de polio.
29. DsARN según uno de los puntos precedentes, conteniendo la proteína envolvente la proteína viral 1 (VP1) y/o la proteína viral 2 (VP2) del virus de polio.
- 10 30. DsARN según uno de los puntos precedentes, estando orientado un lado al interior de la cápsida o estructura de tipo cápsida, en el caso de formación de una cápsida o estructura de tipo cápsida a partir de la proteína envolvente.
31. DsARN según uno de los puntos precedentes, siendo el dsARN complementario al elemento de transcripción de ARN primario o procesado del gen diana.
32. DsARN según uno de los puntos precedentes, siendo las células de mamífero células humanas.
- 15 33. Oligorribonucleótido con estructura de hebra doble (dsARN) para inhibir la expresión de un gen diana predeterminado en células de mamíferos, donde el dsARN presenta entre 15 y 49 pares de bases, presentando una hebra de dsARN una región I complementaria al gen diana, que presenta a lo sumo 49 pares de nucleótidos sucesivos, y estando formada una región II complementaria dentro de la estructura de hebra doble por dos hebras simples de ARN separadas, donde el oligorribonucleótido presenta en total una secuencia de nucleótidos definida por la región I, donde la región I presenta la misma longitud que el dsARN.
- 20

Protocolo de secuencia

<110> Alnylam Europe AG

<120> Oligorribonucleótido para la inhibición de la expresión de un gen predeterminado

<130> 453722EH

25 <140>

<141>

<150> 199 03 713.2

<151> 1999-01-30

<150> 199 56 568.6

30 <151> 1999-11-24

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1.

<210> 1

<211> 45

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 597 953 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial:

punto de corte EcoRI, promotor de polimerasa T7-ARN

<400> 1

ggaattctaa tacgactcac tatagggcga tcagatctct agaag 45

5 <210> 2

<211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial:

punto de corte BamHI, promotor de polimerasa SP6-RNA

<400> 2

gggatccatt taggtgacac tatagaatac ccatgatcgc gtatcgata 50

<210> 3

15 <211> 340

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: ARN, que corresponde a una secuencia de "positive control DNA" del kit de transcripción HeLa-Scribe Nuclear Extract in vitro de la firma Promega

<400> 3

```
ucagaucucu agaagcuua augcggua guuauacagu uaaaauugcua acgcagucag 60
gcaccgugua ugaaaucua caaugcgcuc aucgucaucc ucggcaccgu caccuggau 120
gcuguaggca uaggcuuggu uaugccggu cugccgggcc ucuugcggga uaucguccau 180
uccgacagca ucgccaguca cuauggcgug cugcuagcgc uauaugcguu gaugcaauuu 240
cuaugcgcac ccguucucgg agcacugucc gaccgcuuug gccgccgcc aguccugcuc 300
gcuucgcua uuggagccac uaucgacuac gcgaucaugg 340
```

<210> 4

<211> 363

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN, que corresponde a una secuencia de "positive control DNA" del kit de transcripción HeLaScribe Nuclear Extract in vitro de la firma Promega

ES 2 597 953 T3

<400> 4

```
tcagatctct agaagcttta atgcggtagt ttatcacagt taaattgcta acgcagtcag 60
gcaccgtgta tgaaatctaa caatgcgctc atcgtcatcc tcggcaccgt caccctggat 120

gctgtaggca taggcttggg tatgccggtg ctgccgggcc tcttgccgga tctcgtccat 180
tccgacagca tcgccagtca ctatggcggtg ctgctagcgc tatatgcgtt gatgcaattt 240
ctatgcgcac cegttctcgg agcaactgtcc gaccgctttg gccgccgcc agtctctctc 300
gcttcgctac ttggagccac tctcgactac gcgatcatgg cgaccacacc cgtcctgtgg 360
atc 363
```

<210> 5

<211> 315

5 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del gen YFP

<400> 5

```
auggugagca agggcgagga gcuguucacc gggguggugc ccauccuggu cgagcuggac 60
ggcgacguaa acggccacaa guucagcgug uccggcgagg gcgagggcga ugccaccuac 120
ggcaagcuga ccugagaagu caucugcacc accggcaagc ugcccugucc cuggcccacc 180
cucgugacca ccugaccua cggcgugcag ugcuucagcc gcuacccga ccacaugaag 240
cagcacgacu ucuucaaguc cgccaugccc gaaggcuacg uccaggagcg caccaucuuc 300
uucaaggacg acggc 315
```

10

<210> 6

<211> 52

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:

punto de corte EcoRI, promotor de polimerasa T7-ARN,

región complementaria al gen YPF

<400> 6

20 ggaattctaa tacgactcac tatagggcga atggtgagca agggcgagga gc 52

<210> 7

<211> 53

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial:

punto de corte BamHI, promotor de polimerasa SP6-RNA,

5 región complementaria al gen YPF

<400> 7

gggatccatt taggtgacac tatagaatac gccgctgtcc tgaagaaga tgg 53

<210> 8

<211> 21

10 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ARN, que corresponde a una secuencia del gen YPF

<400> 8

15 ucgagcugga cggcgacgua a 21

Bibliografía:

Asanuma, H., Ito, T., Yoshida, T., Liang, X. & Komiyama, M. (1999). Photoregulation der Bildung und Dissoziation eines DNA-Duplexes durch cis-trans-Isomerisierung einer Azobenzoleinheit. *Angew. Chem.* 111, 2547-2549.

20 Azhayeva, E., Azhayev, A., Auriola, S., Tengvall, U., Urtili, A. & Lönnberg, H. (1997). Inhibitory properties of double helix forming circular oligonucleotides. *Nucl. Acids Res.* 25, 4954-4961.

Castelli, J., Wood, K.A. & Youle, R.J. (1998). The 2-5A system in viral infection and apoptosis. *Biomed. Pharmacother.* 52, 386-390.

25 Dolinnaya, N.G., Blumenfeld, M., Merenkova, I., Oretskaya, T.S., Krynetskaya, N.F., Ivanovskaya, M.G., Vasseur, M. & Shabarova, Z.A. (1993). Oligonucleotide circularization by template-directed chemical ligation. *Nucl. Acids Res.* 21, 5403-5407.

Expert-Bezancon, A., Milet, M. & Carbon, P. (1983). Precise localization of several covalent RNA-RNA cross-link in *Escherichia coli* 16S RNA. *Eur. J. Biochem.* 136, 267-274.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

30 Gao, H., Yang, M., Patel, R. & Cook, A.F. (1995). Circularization of oligonucleotides by disulfide bridge formation. *Nucl. Acids Res.* 23, 2025-2029.

Gryaznov, S.M. & Letsinger, R.L. (1993). Template controlled coupling and recombination of oligonucleotide blocks containing thiophosphoryl groups. *Nucl. Acids Res.* 21, 1403-1408.

35 Kaufman, R.J. (1999). Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates virus-induced apoptosis: A new role for an old actor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11693-11695.

Lipson, S.E. & Hearst, J.E. (1988). Psoralen cross-linking of ribosomal RNA. In *Methods in Enzymology* Anonymous pp. 330-341.

- Liu, Z.R., Sargueil, B. & Smith, C.W. (1998). Detection of a novel ATP-dependent cross-linked protein at the 5' splice site-U1 small nuclear RNA duplex by methylene blue-mediated photo-cross-linking. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6910-6920.
- Micura, R. (1999). Cyclic oligoribonucleotides (RNA) by solid-phase synthesis. *Chem. Eur. J.* 5, 2077-2082.
- 5 Skripkin, E., Isel, C., Marquet, R., Ehresmann, B. & Ehresmann, C. (1996). Psoralen crosslinking between human immunodeficiency virus type 1 RNA and primer tRNA³Lys. *Nucl. Acids Res.* 24, 509-514.
- Wang, S. & Kool, E.T. (1994). Circular RNA oligonucleotides. Synthesis, nucleic acid binding properties, and a comparison with circular DNAs. *Nucl. Acids Res.* 22, 2326-2333.
- Wang, Z. & Rana, T.M. (1996). RNA conformation in the Tat-TAR complex determined by site-specific photo-crosslinking. *Biochem.* 35, 6491-6499.
- 10 Watkins, K.P. & Agabian, N. (1991). In vivo UV cross-linking of U snRNAs that participate in trypanosome transsplicing. *Genes & Development* 5, 1859-1869.
- Wengel, J. (1999). Synthesis of 3'-C- and 4'-C-branched oligo-deoxynucleotides and the development of locked nucleic acid (LNA). *Acc. Chem. Res.* 32, 301-310.
- 15 Zwieb, C., Ross, A., Rinke, J., Meinke, M. & Brimacombe, R. (1978). Evidence for RNA-RNA cross-link formation in *Escherichia coli* ribosomes. *Nucl. Acids Res.* 5, 2705-2720.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Oligorribonucleótido con estructura de hebra doble (dsARN) para inhibir la expresión de un gen diana predeterminado en células de mamíferos, donde el dsARN presenta entre 15 y 49 pares de bases, y una hebra del dsARN presenta una región I complementaria al gen diana al menos por segmentos, la cual presenta como máximo 49 pares de nucleótidos sucesivos, y una región II complementaria dentro de la estructura de hebra doble está formada por dos hebras individuales separadas de ARN, donde los nucleótidos del dsARN están modificados, donde al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos del dsARN está reemplazado por un grupo químico en la región complementaria II.
- 10 2. Medicamento con al menos un oligorribonucleótido que presenta entre 15 y 49 pares de bases, con estructura de hebra doble (dsARN) para inhibir la expresión de un gen diana predeterminado en células de mamíferos, donde una hebra del dsARN presenta una región I complementaria al gen diana al menos por segmentos, la cual presenta como máximo 49 pares de nucleótidos sucesivos, y una región II complementaria dentro de la estructura de hebra doble está formada por dos hebras individuales separadas de ARN, donde los nucleótidos del dsARN están modificados, donde al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos del dsARN está reemplazado por un grupo químico en la región complementaria II.
- 15 3. Utilización de un oligorribonucleótido que presenta entre 15 y 49 pares de bases, con estructura de hebra doble (dsARN) para producir un medicamento para inhibir la expresión de un gen diana predeterminado en células de mamíferos, donde una hebra del dsARN presenta una región I complementaria al gen diana al menos por segmentos, la cual presenta como máximo 49 pares de nucleótidos sucesivos, y una región II complementaria dentro de la estructura de hebra doble está formada por dos hebras individuales separadas de ARN, donde los nucleótidos del dsARN están modificados, donde al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos del dsARN está reemplazado por un grupo químico en la región complementaria II.
- 20 4. DsARN según la reivindicación 1, medicamento según la reivindicación 2 o utilización según la reivindicación 3, donde el dsARN se presenta en estructuras micelares, preferentemente en liposomas.
- 25 5. DsARN, medicamento o utilización según una de las reivindicaciones precedentes, estando incluido el dsARN en cápsidas virales naturales, o en cápsidas artificiales obtenidas por vía química o enzimática, o estructuras derivadas de las mismas.
- 30 6. DsARN, medicamento o utilización según una de las reivindicaciones precedentes, siendo el gen diana componente de un virus.
- 35 7. DsARN, medicamento o utilización según la reivindicación 6, en donde el virus es un virus patógeno humano o patógeno animal.
- 40 8. DsARN, medicamento o utilización según una de las reivindicaciones precedentes, en donde los extremos de dsARN están modificados para contrarrestar una degradación en las células de mamíferos o una disociación en las hebras simples.
- 45 9. DsARN, medicamento o utilización según una de las reivindicaciones precedentes, en donde la cohesión de la región complementaria II, ocasionada por los pares de nucleótidos, es aumentada a través de al menos uno, preferentemente dos enlaces químicos adicionales.
10. DsARN, medicamento o utilización según la reivindicación 9, donde el enlace químico está formado por una unión covalente o iónica, un enlace por puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas, preferentemente interacciones de van-der-Waals o de apilamiento, o mediante coordinación de iones metálicos.
11. DsARN, medicamento o utilización según la reivindicación 9 ó 10, en donde el enlace químico se obtiene en al menos uno, preferentemente en ambos extremos de la región complementaria II.
12. DsARN, medicamento o utilización según una de las reivindicaciones precedentes, en donde el dsARN se enlaza a al menos una proteína envolvente viral procedente de un virus, derivado del mismo, u obtenida sintéticamente, asociándose con la misma, o envolviéndose por la misma.
13. DsARN, medicamento o utilización según la reivindicación 12, en donde, en el caso de formación de una cápsida o estructura de tipo cápsida a partir de la proteína envolvente, un lado está orientado al interior de la cápsida o estructura de tipo cápsida..
14. DsARN, medicamento o utilización según una de las reivindicaciones precedentes, en donde las células de mamífero son células humanas.

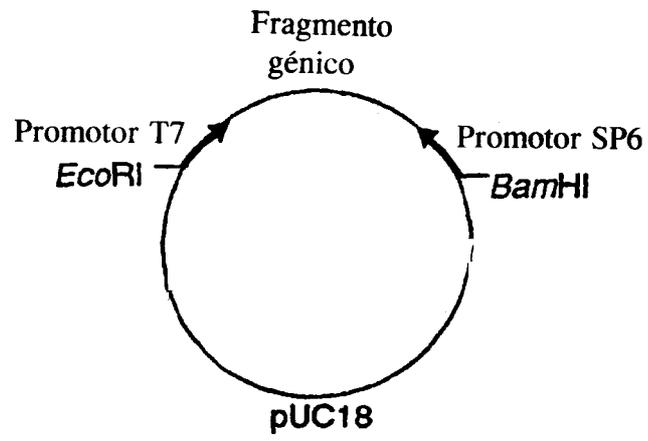


Fig. 1

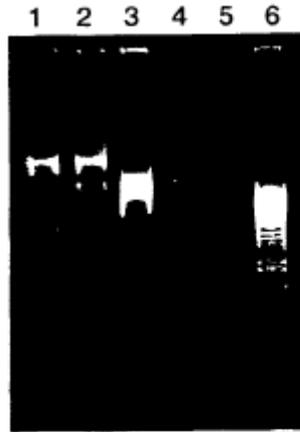


Fig. 2

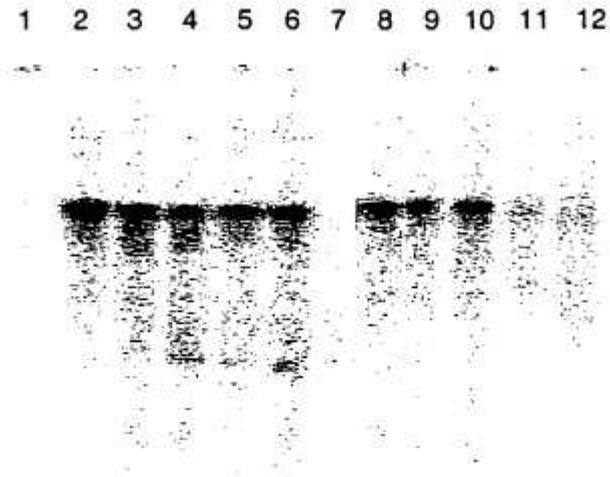


Fig. 3

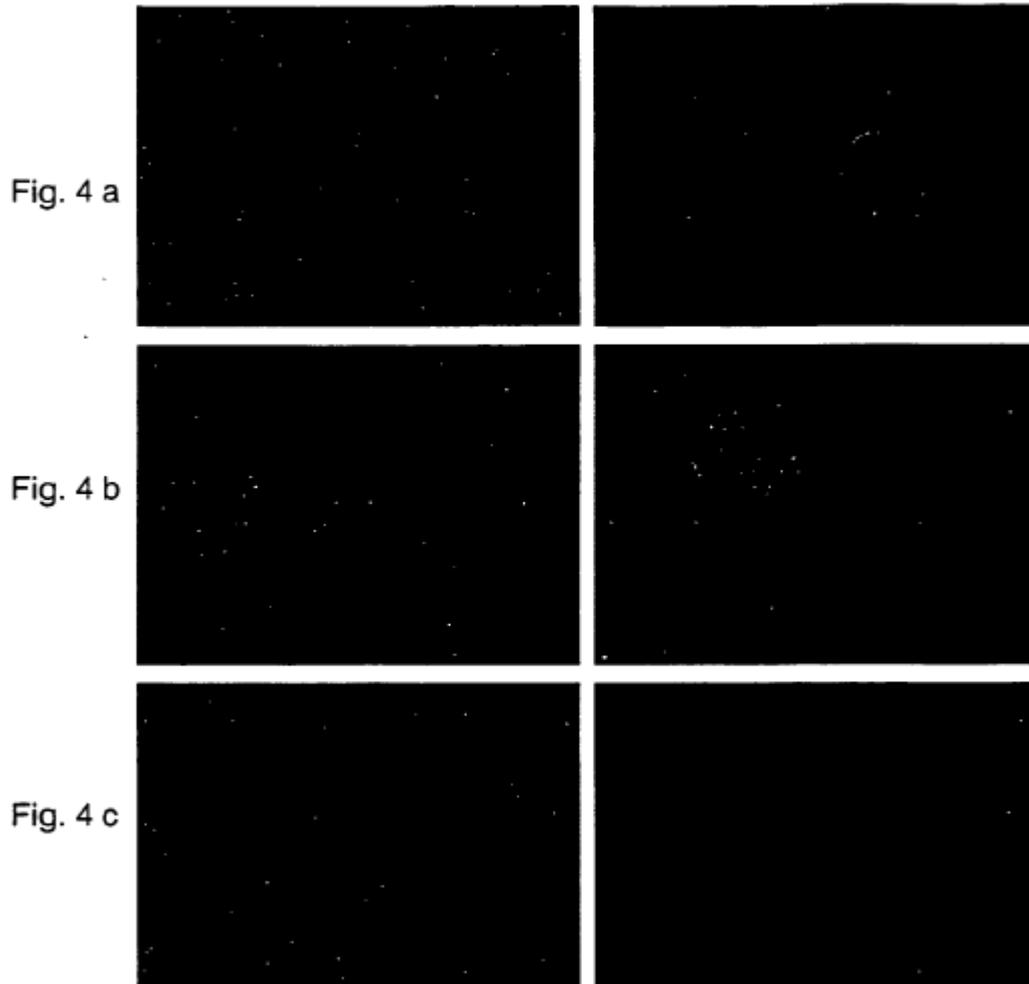


Fig. 4

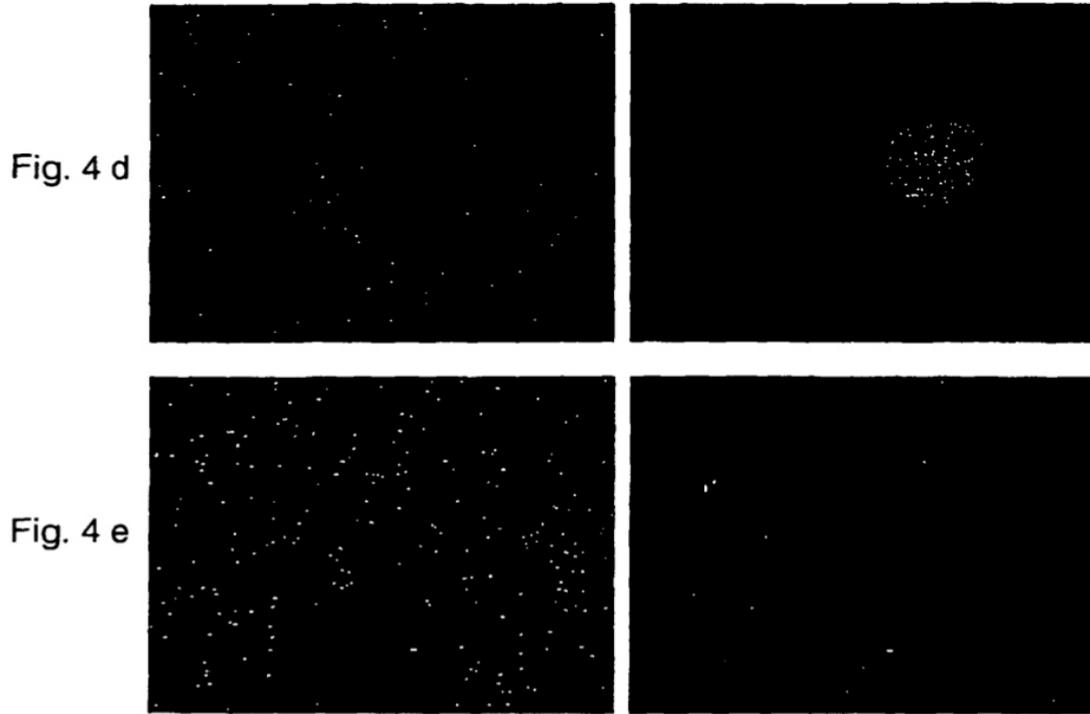


FIGURA 4 (continuación)