

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 535**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2000 E 06025389 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 1798285**

54 Título: **Procedimiento y medicamento para la inhibición de 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:

03.08.2017

73 Titular/es:

**ALNYLAM EUROPE AG (100.0%)
FRITZ-HORNSCHUCH-STRASSE 9
95326 KULMBACH, DE**

72 Inventor/es:

**KREUTZER, ROLAND y
LIMMER, STEFAN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 628 535 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y medicamento para la inhibición de la expresión de un gen predeterminado

La manifestación se refiere a procedimientos para la inhibición de la expresión de un gen objetivo predeterminado en una célula. Ésta se refiere además a un medicamento y a un empleo de oligorribonucleótidos de hebra doble.

5 Tal procedimiento es conocido por el documento WO 99/32619 publicado 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 objetivo con una longitud de al menos 50 bases. Para la consecución de una inhibición eficiente es necesaria una longitud de secuencia idéntica de 300 a 1000 pares de bases. El gasto de producción de tal oligorribonucleótido es elevado.

10 El documento DE 196 31 919 C2 describe un ARN anti-sentido con estructuras secundarias especiales, presentándose el ARN anti-sentido en forma de un vector que codifica al mismo. En el caso del ARN anti-sentido se trata de una molécula de ARN que es complementaria a zonas de mRNA. Mediante enlace a estas zonas se ocasiona una inhibición de la expresión génica. Esta inhibición se puede emplear en especial para el diagnóstico y/o la terapia de enfermedades, por ejemplo enfermedades tumorales o infecciones virales. De modo desventajoso, el
15 ARN anti-sentido se debe introducir en la célula en una cantidad que es al menos tan grande como la cantidad de mRNA. La eficacia del procedimiento anti-sentido no es especialmente elevada.

Por el documento US 5 712 257 es conocido un medicamento que contiene ARN de apareamiento erróneo de hebra doble (dsARN) y fragmentos de dsARN biológicamente activos de apareamiento erróneo en forma de un complejo ternario con un agente tensioactivo. El dsARN empleado en este caso está constituido por hebras aisladas de ácido
20 nucleico producidas por vía sintética sin secuencia de bases definida. Las hebras dobles entran en un apareamiento de bases no regular, el denominado "Nicht-Watson-Crick", de modo que se forman hebras dobles de apareamiento erróneo. El dsARN conocido sirve para la inhibición de la propagación de retrovirus, como HIV. La propagación del virus se puede inhibir si se introducen en las células dsARN de secuencia no específica. En este caso se llega a una inducción de interferona, mediante lo cual se debe inhibir la propagación de virus. La acción inhibidora, o bien la
25 eficacia de este procedimiento, es reducida.

Por Fire, A. et.al, NATURE, Vol. 391, página 806 es conocido que el dsARN, una de cuyas hebras es complementaria por secciones a un gen a inhibir de nemátodo, inhibe la expresión de este gen con una eficacia elevada. Se defiende la opinión de que la eficacia especial del dsARN empleado en células de nemátodo no se basa en el principio anti-sentido, sino que se puede atribuir posiblemente en propiedades catalíticas de dsARN, o bien
30 enzimas que inducen las mismas. En este artículo no se informa sobre la eficacia de dsARN específico sobre la inhibición de la expresión génica, en especial en células de mamífero y células humanas.

Es tarea de la presente invención eliminar los inconvenientes según el estado de la técnica. En especial se debe indicar un procedimiento lo más eficiente posible, un medicamento, o bien un empleo lo más eficiente posible para la
35 producción de un medicamento, con el que sea realizable una inhibición especialmente eficaz de la expresión de un gen objetivo predeterminado.

La tarea se soluciona mediante las características de la reivindicación 1. Resultan acondicionamientos ventajosos de las reivindicaciones 2 a 26.

Para la inhibición de la expresión de un gen objetivo predeterminado en una célula está previsto introducir en la célula un oligorribonucleótido que presenta 15 a 49 pares de bases con estructura de hebra doble (dsARN),
40 presentando una hebra de dsARN una zona I que incluye a lo sumo 49 pares de bases sucesivos complementarios al gen objetivo al menos por secciones, y formándose una zona II complementaria dentro de la estructura de hebra doble a partir de dos hebras dobles de ARN separadas. El oligorribonucleótido presenta, al menos por secciones, una secuencia de nucleótidos definida. La sección definida puede estar limitada en la zona complementaria I. No obstante, también se puede dar que el oligorribonucleótido de hebra doble presente en suma una secuencia de
45 nucleótidos definida. El dsARN puede ser más largo que la zona I complementaria al gen objetivo. La zona complementaria I puede presentar disposición terminal o estar insertada en el dsARN. Tal dsARN se puede producir por vía sintética, o bien enzimática, con procedimientos de uso común.

Sorprendentemente se ha mostrado que, ya en el caso de una longitud de zona complementaria I de un máximo de 49 pares de bases, se obtiene una inhibición eficaz de la expresión del gen objetivo. Los oligorribonucleótidos correspondientes se pueden poner a disposición con menor gasto de obtención.
50

En especial dsARN con una longitud de más de 50 pares de nucleótidos induce determinados mecanismos celulares en células de mamífero 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 mediante un dsARN que presenta una

secuencia definida. De este modo se bloquea la biosíntesis proteica en la célula. En especial se elimina este inconveniente mediante la presente invención.

Además se facilita claramente el alojamiento de dsARN con longitud de cadena más corta en la célula, o bien en el núcleo celular, frente a dsARNs de cadena más larga.

5 Según la invención, el dsARN se presenta empaquetado en estructuras micelares, preferentemente en liposomas. El dsARN puede estar encerrado igualmente en cápsidos virales naturales, o en capsidos artificiales producidos por vía química o enzimática, o estructuras derivadas de los mismos. Las características citadas anteriormente posibilitan una inclusión de dsARN en células objetivo predeterminadas.

10 El gen a inhibir se expresa convenientemente en células eucariotas. El gen objetivo se puede seleccionar a partir del siguiente grupo: oncogen, gen de citoquina, gen de proteína Id, gen de desarrollo, gen de prión. Se puede expresar también en organismos patógenos, preferentemente en plasmidios. Puede ser componente de un virus o viroide, preferentemente patógeno humano. El procedimiento propuesto posibilita la producción de agentes para la terapia de enfermedades de control genético, por ejemplo cáncer, enfermedades virales o enfermedad de Alzheimer.

15 El virus o viroide puede ser también un virus 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.

El dsARN puede presentar configuración de hebra doble al menos por secciones.

20 Los extremos de dsARN pueden estar modificados para contrarrestar una degradación en la célula o una disociación en la hebra doble. Se produce una disociación en especial en el caso de empleo de concentraciones reducidas o longitudes de cadena cortas. Para la inhibición especialmente eficaz de la disociación, la cohesión de la zona complementaria II ocasionada por los pares de nucleótidos se puede incrementar mediante al menos un enlace, preferentemente dos enlaces químicos adicionales. Un dsARN cuya disociación es reducida, presenta una estabilidad más elevada frente a degradación enzimática y química en la célula, o bien en el organismo.

25 El enlace químico se forma convenientemente mediante 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. Éste se puede obtener según una característica de acondicionamiento especialmente ventajosa en al menos un, preferentemente en ambos extremos de la zona complementaria II.

30 Además se ha mostrado ventajoso que el enlace químico se forme 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. El enlace químico se puede formar también mediante análogos de purina empleados en lugar de purina en las zonas complementarias II. Además es ventajoso que el enlace químico se forme mediante unidades azabenceno introducidas en las zonas complementarias II. Éste se puede formar además mediante análogos de nucleótidos ramificados empleados en lugar de nucleótidos en las zonas complementarias II.

35 Se ha mostrado conveniente utilizar para la producción 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, el enlace químico se puede formar mediante grupos tiofosforilo aplicados en los extremos de la zona de hebra doble. El enlace químico se produce preferentemente en los extremos de la zona de hebra doble mediante enlaces de triple hélice.

El enlace químico se puede inducir convenientemente mediante luz ultravioleta.

40 Los nucleótidos del dsARN pueden ser modificados. Esto contrarresta una activación de una proteína quinasa dependiente de ARN de hebra doble, PKR, en la célula. Ventajosamente, al menos un grupo 2'-hidroxilo del nucleótido de dsARN está substituido en la zona complementaria II por un grupo químico, preferentemente un grupo 2'-amino o 2'-metilo. Al menos un nucleótido en al menos una hebra de la zona complementaria II puede ser un denominado "nucleótido cerrado" con un anillo sacárico, de modo preferente modificado químicamente mediante un puente 2'-O, 4'-C-metileno. Ventajosamente, varios nucleótidos son "nucleótidos cerrados".

45 Según otro acondicionamiento especialmente ventajoso está previsto que el dsARN esté unido a al menos una proteína envolvente viral procedente de un virus, derivada del mismo, o producida sintéticamente, asociado a la misma o envuelto en la misma. La proteína envolvente se puede derivar del poliomavirus. La proteína envolvente puede contener la proteína viral 1 (VP1) y/o la proteína viral 2 (VP2) del virus polio. El empleo de tales proteínas envolventes es conocido, por ejemplo, por el documento DE 196 18 797 A1, cuyo contenido divulgativo se incluye expresamente en este caso. Las características citadas anteriormente facilitan de manera esencial la introducción de dsARN en la célula.

En el caso de formación de un cápsido o una estructura de tipo cápsido a partir de la proteína envolvente, un lado está orientado al interior del cápsido o de la estructura de tipo cápsido. El constructo formado es especialmente estable.

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

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

15 Además se describe un medicamento con al menos un oligorribonucleótido que presenta 15 a 49 pares de bases con estructura de hebra doble (dsARN) para la inhibición de la expresión de un gen objetivo predeterminado en células de mamífero, presentando una hebra de dsARN una zona I complementaria al gen objetivo al menos por secciones, que presenta a lo sumo 49 pares de nucleótidos sucesivos, y formándose una zona II complementaria a la estructura de hebra doble a partir de dos hebras aisladas de ARN separadas. Sorprendentemente se ha mostrado que tal dsARN es apropiado como medicamento para la inhibición de la expresión de un gen predeterminado en células de mamífero. En comparación con el empleo de oligorribonucleótidos de hebra simple, la inhibición de 20 ocasiona ya a concentraciones que son menores al menos en un orden de magnitud. El medicamento según la invención es altamente eficaz. Son de esperar efectos secundarios menores. Sorprendentemente se ha mostrado que, ya a una longitud de la zona complementaria I de un máximo de 49 pares de bases se puede obtener una inhibición eficiente de la expresión del gen objetivo. Los correspondientes oligorribonucleótidos se pueden poner a disposición con menor gasto de obtención.

25 Además se describe un empleo de un oligorribonucleótido que presenta 15 a 49 pares de bases con estructura de hebra doble (dsARN) para la producción de un medicamento para la inhibición de la expresión de un gen objetivo predeterminado en células de mamífero, presentando una hebra de dsARN una zona I complementaria al gen objetivo al menos por secciones, que presenta a lo sumo 49 pares de nucleótidos sucesivos, y formándose una zona II complementaria dentro de la estructura de hebra doble a partir de dos hebras simples de ARN separadas. Sorprendentemente, tal dsARN es apropiado para la producción de un medicamento para la inhibición de la 30 expresión de un gen predeterminado. En el caso de un empleo de dsARN, en comparación con el empleo de oligorribonucleótidos de hebra simple, ya inhibición se ocasiona ya a concentraciones menores en un orden de magnitud. Por lo tanto, el empleo según la invención posibilita la producción de medicamentos especialmente eficaces.

35 A continuación se explican más detalladamente ejemplos de realización de la invención por medio de figuras. Muestran:

la fig. 1 la representación esquemática de un plásmido para la transcripción *in vitro* con T7- y SP6-polimerasa,

la fig. 2 ARN tras electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8 % y coloración de bromuro de etidio,

la fig. 3 una representación de elementos de transcripción de ARN radioactivos en un gel de poliacrilamida al 8 % con urea 7 M por medio de un "Instant Imagers" y

40 la fig. 4 a-e fluorescencia de rojo Texas e YFP en fibroblastos murinos.

Ejemplo de realización 1:

La inhibición de la transcripción se identificó mediante dsARN homólogo en secuencia en un sistema de transcripción *in vitro* con un extracto de núcleo de células HeLa humanas. La matriz de ADN para este ensayo era el plásmido pCMV1200 linealizado por medio de *Bam*HI.

45 Producción de los plásmidos de matriz:

Para el empleo en la síntesis enzimática de dsARN se construyó el plásmido representado en la fig. 1. A tal efecto se llevó a cabo en primer lugar una reacción en cadena de polimerasa (PCR) con el "ADN de control positivo" del kit de transcripción 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 T7-ARN-polimerasa según el protocolo de secuencia nº 1. El otro cebador contenía la secuencia de un punto de corte *Bam*HI y del

promotor de SP6-ARN-polimerasa según el protocolo de secuencia nº 2. Además, ambos cebadores presentan en sus extremos 3' zonas idénticas, o bien complementarias a la matriz de ADN. La PCR se llevó a cabo por medio del "Taq PCR Core Kits" de la firma Qiagen, Hilden, Alemania según datos del fabricante. En un volumen de 100 μ l se emplearon 1,5 mM MgCl₂, respectivamente 200 μ M dNTP, respectivamente 0,5 μ M cebador, 2,5 U Taq-ADN-polimerasa y aproximadamente 100 ng de "ADN de control positivo" como matriz en tampón PCR. Tras la desnaturalización inicial de ADN matriz mediante calentamiento a 94°C durante 5 minutos se efectuó la amplificación en 30 ciclos de desnaturalización a 94°C de 60 segundos respectivamente, 60 segundos de ciclación a 5°C por debajo de la temperatura de fusión calculada del cebador, y polimerización de 1,5-2 minutos a 72°C. Tras una polimerización final de 5 minutos a 72°C se analizaron 5 μ l de 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 "ADN de control positivo". El producto de PCR se purificó, se hidrolizó con EcoRI y BamHI y se empleó tras nueva purificación para la unión con un vector pUC18, hidrolizado igualmente por medio de EcoRI y BamHI. Se efectuó una transformación de *E. coli* XL1-azul. El plásmido obtenido (pCMV5) porta un fragmento de ADN, que está flanqueado en el extremo 5' por el promotor T7, y en el extremo 3' por el promotor SP6. Mediante linealización 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, representada en el protocolo de secuencia nº 3, de hebra simple. Si el plásmido se linealiza con EcoRI, se puede emplear para la transcripción *run-off* con la SP6-ARN-polimerasa, produciéndose la hebra complementaria. De modo correspondiente al procedimiento representado anteriormente se sintetizó también un ARN más largo en 23 nucleótidos. A tal efecto se ligó 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 matriz de ADN para la transcripción *in vitro* con extracto de núcleo de HeLa se construyó el plásmido pCMV1200. A tal efecto se amplificó un fragmento EcoRI/BamHI de 1191 bp de tamaño del ADN de control positivo contenido en el kit de transcripción HeLaScribe[®] Nuclear Extract *in vitro* por medio de PCR. El fragmento amplificado comprende el promotor de CMV de 828 de tamaño "inmediatamente anterior" y un fragmento de ADN transcribible de 363 bp de tamaño. El producto de PCR se ligó a través de unión por "saliente en T" con el vector pGEM-T. En el extremo 5' del fragmento se encuentra un punto de corte BamHI. El plásmido se linealizó por medio de hidrólisis con BamHI y se empleó como matriz para la transcripción *run-off*.

Transcripción *in vitro* de hebras simples complementarias:

Se linealizó ADN plásmido pCMV5 con EcoRI, o bien BamHI. Se empleó el mismo como matriz de ADN para una transcripción *in vitro* de la hebra simple de ARN complementaria con SP6-, o bien T7-RNA-polimerasa. A tal efecto se empleó el sistema "Riboprobe *in vitro* Transcription" de la firma Promega, Madison, USA. Según datos del fabricante se incubaron 2 μ g de ADN plásmido linealizado en 100 μ l de tampón de transcripción y 40 U T7- o SP6-RNA-polimerasa 5 - 6 horas a 37°C. A continuación se degradó la matriz de ADN mediante adición de 2,5 μ l Dnasa RQ1 exenta de RNasa e incubación durante 30 minutos a 37°C. La carga de transcripción se completó con H₂O a 300 μ l y se purificó mediante extracción con fenol. El ARN se precipitó mediante adición de 150 μ l de 7 M acetato amónico y 1125 μ l de etanol, y se almacenó hasta la hibridación a -65°C.

Producción de hebras dobles de ARN:

Para la hibridación se centrifugaron 500 μ l de ARN de hebra doble almacenado en etanol y precipitado. El comprimido resultante se secó y se absorbió en 30 μ l de tampón PIPES, pH 6,4 en presencia de un 80 % de formamida, 400 mM NaCl y 1 mM EDTA. Respectivamente 15 μ l de la hebra simple complementaria se reunieron 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 solo cantidades aproximadamente equimolares de ambas hebras simples. De este modo, las preparaciones de dsARN contenían ARN de hebra simple (ssARN) como contaminación. Para eliminar estas contaminaciones de ssARN, las cargas se trataron tras la hibridación con las ribonucleasas específicas de hebra simple RNasa A de páncreas bovino y RNasa T1 de *Aspergillus oryzae*. RNasa A es una endorribonucleasa específica para pirimidina. RNasa T1 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 μ l de Tris, pH 7,4, 300 mM NaCl y 5 mM EDTA 1,2 μ l de RNaseA en una concentración de 10 mg/ml y 2 μ l de RNaseT1 en una concentración de 290 μ g/ml. Las cargas se incubaron 1,5 horas a 30°C. Después se desnaturalizaron las RNasas mediante adición de 5 μ l de proteinasa K en una concentración de 20 mg/ml, así como 10 μ l de SDS al 20% e incubación durante 30 minutos a 37°C. El dsARN se purificó 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.

El comprimido desecado se absorbió en 15 μ l de tampón TE, pH 6,5, y se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida en 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 fig. 2 muestra el ARN visibilizado en un transiluminador UV. El ARN sentido aplicado el

carril 1 y el ARN antisentido aplicado en el carril 2 mostraban bajo las condiciones seleccionadas un comportamiento de marcha diferente al dsARN de la carga de hibridación aplicado en el carril 3. El ARN sentido, o bien antisentido, aplicado en los carriles 4, o bien 5, no generaba bandas visibles. Esto muestra que los ARNs de hebra simple se degradaron completamente. El dsARN de la carga de hibridación tratado con RNasa, aplicado sobre el carril 6, es resistente frente al tratamiento de RNasa. La banda que migra más rápidamente en el gel nativo en comparación con el dsARN aplicado sobre el carril 3 resulta de dsARN, que está exento de ssARN. Además de las bandas principales dominantes, tras el tratamiento con RNasa se producen bandas más débiles, que migran más rápidamente.

Ensayo de transcripción *in vitro* con extracto de núcleo celular humano

Bajo empleo del kit de transcripción HeLaScribe[®] Nuclear Extract *in vitro* de la firma Promega, Madison, USA, se indicó la eficiencia de transcripción del fragmento de ADN indicado anteriormente, contenido en el plásmido pCMV1200, análogo al "ADN homólogo" en presencia de dsARN homólogo en secuencia (dsRNA-CMV5). Además se investigó la influencia de dsARN (dsARN-YFP) de secuencia no homóloga, correspondiente al gen de "proteína de fluorescencia amarilla" (YFP). Este dsARN se había producido análogamente al dsARN de secuencia homóloga. La secuencia de una hebra de este dsARN se puede extraer del protocolo de secuencia nº 5. Como matriz para la transcripción *run-off* sirvió el plásmido pCMV1200. Éste porta el promotor "inmediatamente anterior" del citomegalovirus, que es identificado por la ARN polimerasa eucariota II, y un fragmento de ADN transcribible. La transcripción se efectuó por medio del extracto de núcleo de HeLa, que contiene todas las proteínas necesarias para una transcripción. Mediante adición de [α -³²P]rGTP a la carga de transcripción se obtuvo elemento de transcripción marcado radioactivamente. El [α -³²P]rGTP empleado tenía una actividad específica de 400 Ci/mmol, 10 mCi/ml. Por carga se emplearon 3 mM MgCl₂, respectivamente 400 μ M rATP, rCTP, rUTP, 16 μ M rGTP, 0,4 μ M [α -³²P]rGTP, y según ensayo 1 fmol de ADN plásmido linealizado y diversas cantidades de dsARN en el tampón de transcripción. Cada carga se completó con H₂O a un volumen de 8,5 μ l. Las cargas se mezclaron cuidadosamente. Para el inicio de la transcripción se añadieron 4 U de extracto de núcleo de HeLa en un volumen de 4 μ l y se incubaron durante 60 minutos a 30°C. La reacción se concluyó mediante adición de 87,5 μ l de Stopp-Mix calentado a 30°C. Para la eliminación de las proteínas se mezclaron las cargas con 100 μ l de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v), saturado con tampón TE, pH 5,0, y se mezcló 1 minuto intensivamente. Para la separación de fases se centrifugó aproximadamente 1 minuto a 12000 rpm y se trasladó la fase superior a un nuevo recipiente de reacción. A cada carga se añadieron 250 μ l de etanol. Las cargas se mezclaron convenientemente y se incubaron durante al menos 15 minutos sobre hielo seco/metanol. Para la precipitación de ARN se centrifugaron las cargas 20 minutos a 12000 rpm y 4°C. Se desechó el exceso. El comprimido se secó en vacío 15 minutos y se resuspendió en 10 μ l de H₂O. A cada carga se añadieron 10 μ l de tampón de muestra desnaturizante. La separación de GTP libre del elemento de transcripción producido se efectuó por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante en un gel al 8 % con urea 7 M. Los elementos de transcripción de ARN formados en la transcripción con extracto de núcleo de HeLa en tampón de muestra desnaturizante se calentaron durante 10 minutos a 90°C, e inmediatamente a continuación se aplicaron 10 μ l de los mismos en las bolsas de muestra recién lavadas. La electroforesis se efectuó a 40 mA. La cantidad de ssARN radioactivo formado en la transcripción se analizó tras la electroforesis con ayuda de un *Instant Imager*.

La fig. 3 muestra el ARN radioactivo de un ensayo representativo, mostrado por medio del *Instant Imagers*. Se aplicaron muestras obtenidas a partir de las siguientes cargas de transcripción:

Carril 1: sin matriz de ADN, sin dsRNA;

Carril 2: 50 ng de ADN matriz, sin dsRNA;

Carril 3: 50 ng de ADN matriz, 0,5 μ g de dsRNA-YFP;

Carril 4: 50 ng de ADN matriz, 1,5 μ g de dsRNA-YFP;

Carril 5: 50 ng de ADN matriz, 3 μ g de dsRNA-YFP;

Carril 6: 50 ng de ADN matriz, 5 μ g de dsRNA-YFP;

Carril 7: sin matriz de ADN, 1,5 de dsRNA-YFP;

Carril 8: 50 ng de ADN matriz, sin dsRNA;

Carril 9: 50 ng de ADN matriz, 0,5 μ g de dsRNA-CMV5;

Carril 10: 50 ng de ADN matriz, 1,5 μg de dsRNA-CMV5;

Carril 11: 50 ng de ADN matriz, 3 μg de dsRNA-CMV5;

Carril 12: 50 ng de ADN matriz, 5 μg de dsRNA-CMV5.

5 Se mostró una clara reducción de la cantidad de elemento de transcripción en presencia de dsARN de secuencia homóloga en comparación con la carga de control sin dsARN, así como también con las cargas con dsARN-YFP de secuencia no homóloga. El control positivo en el carril 2 muestra que, en el caso de transcripción *in vitro* con extracto de núcleo de HeLa, se formó elemento de transcripción radioactivo. La carga sirve como comparación con las cargas de transcripción, que se habían incubado en presencia de dsARN. Los carriles 3 a 6 muestran que la adición de dsARN-YFP de secuencia no específica no tiene influencia sobre la cantidad de elemento de transcripción formado.

10 Los carriles 9 a 12 muestran que la adición de una cantidad, situada entre 1,5 y 3 μg , de dsRNA-CMV5 de secuencia específica conduce a una reducción de la cantidad de elemento de transcripción formada. Para excluir que los efectos observados no se basen en el dsARN, sino en una combinación acarreada de modo involuntario posiblemente en la producción de dsARN, se llevó a cabo un control adicional. Se transcribió ARN de hebra simple como se describe anteriormente, y a continuación se sometió al tratamiento de RNasa. Por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida nativo se pudo mostrar que el ssARN se había degradado completamente. Esta carga se sometió a una extracción con fenol y a una precipitación con etanol como las cargas de hibridación, 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 enzimas y tampones que el dsARN. El carril 8 muestra que la adición de esta muestra no tenía influencia sobre la transcripción. Por lo tanto, el descenso de elemento de transcripción en el caso de adición de dsARN de secuencia específica se puede asignar claramente al 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 correspondiente gen. Este efecto se puede atribuir a un mecanismo novedoso, ocasionado por el dsARN.

Ejemplo de realización 2:

25 Como sistema de ensayo para estos experimentos *in vivo* sirvió la línea celular de fibroblastos murinos NIH3T3, ATCC CRL-1658. Con ayuda de microinyección se introdujo el gen YFP en el núcleo celular. La expresión de YFP se investigó bajo la influencia de dsARN de secuencia homóloga, transferido concomitantemente de manera simultánea. Este ds-ARN-YFP es homólogo a la zona 5' del gen YFP a lo largo de una longitud de 315 bp. La secuencia de nucleótidos de una hebra de dsARN-YFP se representa en el protocolo de secuencia nº 5. La valoración bajo el microscopio de fluorescencia se efectuó 3 horas tras inyección por medio de la fluorescencia verde-amarilla de YFP formado.

30

Construcción del plásmido de matriz y obtención de dsARN:

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

40 Se produjo un dsARN (L-dsARN) enlazado químicamente en el extremo 3' de ARN según protocolo de secuencia nº 8 a través de un grupo enlazante C18 con el extremo 5' del ARN complementario. 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 enlazante alifático a través de un puente disulfuro. En el caso del sintón 5'-terminal del oligorribonucleótido complementario al sintón 3'-terminal del primer oligorribonucleótido, el grupo protector 5'-trilito está unido a través de otro elemento enlazante alifático y un puente disulfuro. Tras síntesis de ambas hebras simples, eliminación de los grupos protectores e hibridación de los oligorribonucleótidos complementarios, los grupos tiol producidos llegan a la proximidad espacial entre sí. Mediante oxidación, las hebras simples se enlazaron entre sí a través de su elemento enlazante alifático y un puente disulfuro. A continuación se efectuó la purificación con ayuda de HPLC.

45

Preparación de cultivos celulares:

50 Las células se incubaron en DMEM con 4,5 g/l de glucosa, 10 % de suero bovino fetal, bajo un 7,5 % de atmósfera de CO₂ a 37°C en placas de cultivo, y se hicieron pasar antes de alcanzar la confluencia. La disolución de células se efectuó con tripsina/EDTA. Para la preparación de la microinyección se trasladaron las células a placas de Petri y se incubaron ulteriormente hasta la formación de microcolonias.

Microinyección:

Las placas de cultivo se extrajeron del incubador durante aproximadamente 10 minutos para la microinyección. Se inyectó de manera aislada en aproximadamente 50 núcleos de célula por carga dentro de una zona marcada bajo empleo del sistema de microinyección AIS de la firma Carl Zeiss, Göttingen, Alemania. A continuación se incubaron las células tres horas más. Para la microinyección se prepararon capilares de vidrio de borosilicato de la firma Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Alemania, con un diámetro de punta inferior a 0,5 μm . La microinyección se llevó a cabo con un micromanipulador de la firma Narishige Scientific Instrument Lab., Tokyo, Japón. El tiempo de inyección ascendía a 0,8 segundos, la presión aproximadamente a 100 hPa. Para la transfección se empleó el plásmido pCADN-YFP, que contenía un fragmento *Bam*HI/*Eco*RI de aproximadamente 800 bp de tamaño con el gen de YFP en el vector pcADN3. Las muestras inyectadas en el núcleo celular contenían 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pCADN-YFP, así como rojo Texas acoplado a dextrano-70000 en 14 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM KPO_4 , pH 7,5. De modo adicional se añadieron aproximadamente 100 pl de ARN con una concentración de 1 μM , o bien 375 μM en el caso de L-dsRNA.

Las células se investigaron en el caso de excitación con luz de longitud de onda de activación de rojo Texas, 568 nm, o bien de YFP, 488 nm, por medio de un microscopio de fluorescencia. Se documentaron células aisladas por medio de una cámara digital. Las figuras 4a-e muestran el resultado para células NIH3T3-Zellen. En el caso de las células mostradas en la fig. 4a se ha inyectado YFP-ssRNA sentido, en la fig.4b YFP-ssRNA antisentido, en la fig. 4c dsRNA-YFP, en la fig. 4d no se inyectó ARN, y en la fig. 4e se inyectó L-dsRNA.

El campo amarillo en cada caso 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 rojo Texas de todas las células representadas muestra que la disolución de inyección se aplicó con éxito en el núcleo celular, y las células afectadas estaban aún vivas después de tres horas. Las células muertas ya no mostraban fluorescencia de rojo Texas.

Los campos derechos de las figuras 4 a y 4 b en cada caso muestran que la expresión de YFP no se inhibió de modo visible en el caso de inyección de ARN de hebra simple en el núcleo de la célula. El campo derecho de la fig. 4c muestra células cuya fluorescencia de YFP tras inyección de dsRNA-YFP ya no era identificable. La fig. 4 muestra como control células en las que no se había inyectado ARN. La célula representada en la fig. 4e muestra, mediante la inyección de L-dsRNA, que presenta zonas de secuencia homóloga al gen YFP, una fluorescencia de YFP ya no indetectable. Este resultado demuestra que también se pueden emplear dsARNs más cortos para la inhibición específica de la expresión génica en mamíferos, si las hebras dobles se estabilizan mediante enlace químico de las hebras simples.

Ejemplos de realización preferentes:

1. Oligorribonucleótido con estructura de hebra doble (dsARN) para la inhibición de la expresión de un gen objetivo predeterminado en células de mamífero, presentando el dsARN 15 a 49 pares de bases, y presentando una hebra de dsARN una zona I complementaria al gen objetivo al menos por secciones, que presenta a lo sumo 49 pares de nucleótidos sucesivos, y formándose una zona II complementaria dentro de la estructura de hebra doble, constituida por dos hebras aisladas de ARN separadas.

2. DsARN según el ejemplo de realización 1, presentando el dsARN 15 a 21 pares de bases.

3. DsARN según uno de los ejemplos de realización 1 o 2, presentando el dsARN 21 a 49 pares de bases.

4. DsARN según uno de los ejemplos de realización precedentes, presentando el dsARN 21 pares de bases.

5. DsARN según uno de los ejemplos de realización precedentes, seleccionándose el gen objetivo a partir del siguiente grupo: oncogen, gen de citoquina, gen de proteína Id, gen de desarrollo, gen de prion.

6. DsARN según uno de los ejemplos de realización precedentes, siendo la zona I completamente complementaria al gen objetivo.

7. DsARN según uno de los ejemplos de realización preferentes, presentándose el dsARN empaquetado en estructuras micelares, preferentemente en liposomas.

8. DsARN según uno de los ejemplos de realización preferentes, estando el dsARN encerrado en cápsidos virales naturales o en cápsidos artificiales producidos por vía química o enzimática, o estructuras derivadas de los mismos.

9. DsARN según uno de los ejemplos de realización preferentes, siendo el gen objetivo componente de un virus o viroide.
10. DsARN según el ejemplo de realización 9, siendo el virus un virus o viroide patógeno humano.
11. DsARN según el ejemplo de realización 9, siendo el virus o viroide un virus o viroide patógeno animal.
- 5 12. DsARN según uno de los ejemplos de realización preferentes, presentando el dsARN configuración de hebra doble por secciones.
13. DsARN según uno o varios de los ejemplos de realización preferentes, estando modificados los extremos de dsARN para contrarrestar una degradación en las células de mamífero o una disociación en las hebras simples.
- 10 14. DsARN según uno de los ejemplos de realización precedentes, elevándose la cohesión de la zona complementaria II, ocasionada a través de los pares de nucleótidos, mediante al menos un, preferentemente dos enlace/s químicos adicionales.
15. DsARN según uno de los ejemplos de realización precedentes, formándose la unión química a través de 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.
- 15 16. DsARN según uno de los ejemplos de realización precedentes, produciéndose la unión química en al menos un, preferentemente en ambos extremos de la zona II complementaria.
17. DsARN según uno de los ejemplos de realización precedentes, formándose la unión química por medio de uno o varios grupos de compuestos, siendo los grupos de compuestos preferentemente cadenas de poli-(oxifosfinicooxi-1,3-propanodiol) y/o polietilenglicol.
- 20 18. DsARN según uno de los ejemplos de realización precedentes, formándose el enlace químico a través de los análogos de purina utilizados en lugar de purinas en las zonas complementarias II.
19. DsARN según uno de los ejemplos de realización precedentes, formándose el enlace químico mediante unidades azabenceno insertadas en las zonas II complementarias.
- 25 20. DsARN según uno de los ejemplos de realización precedentes, formándose el enlace químico mediante los análogos de nucleótidos ramificados utilizado en lugar de nucleótidos en las zonas complementarias II.
21. DsARN según uno de los ejemplos de realización 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-benzoil)-cistamina; 4-tiouracilo; psoraleno.
- 30 22. DsARN según uno de los ejemplos de realización precedentes, formándose el enlace químico mediante grupos tiofosforilo previstos en los extremos de la zona de hebra doble.
23. DsARN según uno de los ejemplos de realización precedentes, siendo la unión química enlaces de triple hélice previstos en los extremos de la zona de hebra doble.
24. DsARN según uno de los ejemplos de realización precedentes, estando modificados los nucleótidos de dsARN.
- 35 25. DsARN según uno de los ejemplos de realización precedentes, estando substituido al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos de dsARN en la zona complementaria II mediante un grupo químico, preferentemente un grupo 2'-amino o 2'-metilo.
26. DsARN según uno de los ejemplos de realización precedentes, siendo al menos un nucleótido en al menos una hebra de la zona complementaria II un "nucleótido cerrado" con un anillo sacárico, de modo preferente modificado químicamente mediante un puente 2'-O, 4'-C-metileno.
- 40 27. DsARN según uno de los ejemplos de realización precedentes, estando el dsARN unido a al menos una proteína envolvente viral procedente de un virus, derivada del mismo o producida por vía sintética, asociado a la misma o envuelto en la misma.

28. DsARN según uno de los ejemplos de realización precedentes, siendo derivada la proteína envolvente del poliomavirus.

29. DsARN según uno de los ejemplos de realización precedentes, conteniendo la proteína envolvente la proteína viral 1 (VP1) y/o la proteína viral 2 (VP2) del poliomavirus.

5 30. DsARN según uno de los ejemplos de realización preferentes, estando orientado un lado al interior del cápsido o de la estructura de tipo cápsido en el caso de formación de un cápsido o una estructura de tipo cápsido.

31. DsARN según uno de los ejemplos de realización preferentes, siendo el dsARN complementario al elemento de transcripción de ARN primario o procesado del gen objetivo.

32. DsARN según uno de los ejemplos de realización precedentes, siendo las células de mamífero células humanas.

PROTOCOLO DE SECUENCIA

<110> Alnylam Europe AG

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

<130> 453722EH

5 <140>
< 141>

<150> 199 03 713.2
< 151> 1999-01-30

10 <150> 199 56 568.6
< 151> 1999-11-24

<160> 8

<170> Patent In Ver. 2.1

15 <210> 1
< 211> 45
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Descripción de la secuencia artificial:

Punto de corte EcoRI, promotor de T7-RNA-polimerasa

20 <400> 1
ggaattctaa tacgactcac tatagggcga tcagatctct agaag 45

<210> 2
< 211> 50
< 212> ADN
25 < 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Descripción de la secuencia artificial:

Punto de corte BamHI, promotor de SP6-ARN-polimerasa

30 <400> 2
gggatccatt taggtgacac tatagaatac ccatgatcgc gtagtgcata 50

<210> 3
< 211> 340
< 212> ARN
< 213> Secuencia artificial

35 <220>
< 223> Descripción de la secuencia artificial: ARN, que corresponde a una secuencia del "ADN de control positivo" del kit de transcripción HeLaScribe Nuclear Extract in vitro de la firma Promega

<400> 3

ES 2 628 535 T3

```

ucagaucucu agaagcuua augcgguagu uuaucacagu uaaaauugcua acgcagucag 60
gcaccgugua ugaaaucuaa caaugcguc aucgucaucc ucggcaccgu caccucggau 120
gcuguaggca uaggcuuggu uaugccgguu cugccgggcc ucuugcggga uaucguccau 180
uccgacagca ucgccaguca cuauggcgug cugcuagcgc uauaugcguu gaugcauuu 240
cuaugcgcac cguucucgg agcacugucc gaccgcuuug gccgcccgcc aguccugcuc 300
gcuucgcuac uuggagccac uaucgacuac gcgaucaugg 340
    
```

<210> 4
 < 211> 363
 < 212> ADN
 5 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Descripción de la secuencia artificial: ADN, que corresponde a una secuencia del "ADN de control positivo" del kit de transcripción HeLaScribe Nuclear Extract in vitro de la firma Promega

```

<400> 4
tcagatctct agaagcttta atgcggtagt ttatcacagt taaattgcta acgcagtcag 60
gcaccgtgta tgaatctaa caatgcgctc atcgtcatcc tcggcaccgt caccctggat 120
gctgtaggca taggcttggg tatgccggtg ctgccgggcc tcttgccgga tatcgtccat 180
tccgacagca tcgccagtca ctatggcgtg ctgctagcgc tatatgcgtt gatgcaattt 240
ctatgcgcac cgttctcgg agcaetgtcc gaccgcttg gccgcccgcc agtctctgtc 300
gcttcgttac ttggagccac tctcgactac gcgatcatgg cgaccacacc cgtctctgtg 360
atc 363
    
```

10

<210> 5
 < 211> 315
 15 < 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
ggcgacguua acggccacaa guucagcgug uccggcgagg gcgagggcga ugccaccuac 120
ggcaagcuga cccugaaguu caucugcacc accggcaagc ugcccugucc cuggcccacc 180
cucgugacca cccugaccua cggcgugcag ugcuucagcc gcuaccccga ccacaugaag 240
cagcacgacu ucuucaaguc egccaugccc gaaggcuacg uccaggagcg caccaucuuc 300
uucaaggacg acggc 315
    
```

20

<210> 6
 < 211> 52
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial

25 <220>
 < 223> Descripción de la secuencia artificial:

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

Zona complementaria respecto al gen YFP

```

<400> 6
ggaattctaa tacgactcac tatagggcga atggtgagca agggcgagga gc
    
```

30

52

ES 2 628 535 T3

<210> 7
< 211> 53
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

5 <220>
< 223> Descripción de la secuencia artificial:

Punto de corte BamHI, promotor de SP6-ARN-polimerasa, zona complementaria respecto al gen YFP

<400> 7
gggatccatt taggtgacac tatagaatac gccgtcgtcc ttgaagaaga tgg 53

10 <210> 8
< 211> 21
< 212> ARN
< 213> Secuencia artificial

15 <220>
< 223> Descripción de la secuencia artificial: ARN, que corresponde a una secuencia del gen YFP

<400> 8
ucgagcugga cggcgacgua a 21

REIVINDICACIONES

- 1.- Oligorribonucleótidos con estructura de hebra doble (dsARN) para la inhibición de la expresión de un gen objetivo predeterminado en células de mamífero, estando constituido el dsARN por 15 a 49 pares de bases, y presentando una hebra de dsARN una zona I complementaria al gen objetivo, constituida a lo sumo por 49 pares de bases sucesivos, y formándose una zona II complementaria dentro de la estructura de hebra doble a partir de dos hebras dobles de ARN separadas, presentando el oligorribonucleótido en suma una una secuencia de nucleótidos definida por la zona I, presentando la zona I la misma longitud que el dsARN, y presentándose el dsARN empacutado en estructuras micelares, preferentemente en liposomas.
- 2.- DsARN según la reivindicación 1, seleccionándose el gen objetivo a partir del siguiente grupo: oncogen, gen de citoquina, gen de proteína Id, gen de desarrollo, gen de prión.
- 3.- DsARN según una de las reivindicaciones precedentes, estando encerrado el dsARN en cápsidos virales naturales o en cápsidos artificiales obtenidos por vía química o enzimática, o estructuras derivadas de los mismos.
- 4.- DsARN según una de las reivindicaciones precedentes, siendo el gen objetivo componente de un virus.
- 5.- DsARN según la reivindicación 4, siendo el virus un virus patógeno humano.
- 6.- DsARN según la reivindicación 4, siendo el virus un virus patógeno animal.
- 7.- DsARN según una de las reivindicaciones precedentes, estando modificados los extremos de dsARN para contrarrestar una degradación en las células de mamífero o una disociación en las hebras simples.
- 8.- DsARN según una de las reivindicaciones precedentes, elevándose la cohesión de la zona II complementaria ocasionada por los pares de nucleótidos a través de al menos un, preferentemente dos enlace/s químicos adicionales.
- 9.- DsARN según la reivindicación 8, formándose la unión química a través de un enlace covalente o iónico, un enlace por puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas, preferentemente interacciones de Van-der-Waals o de apilado, o mediante coordinación de iones metálicos.
- 10.- DsARN según la reivindicación 8 o 9, produciéndose el enlace químico en al menos un, preferentemente en ambos extremos de la zona complementaria II.
- 11.- DsARN según una de las reivindicaciones 8 a 10, formándose el enlace químico por medio de uno o varios grupos de compuestos, siendo los grupos de enlace preferentemente cadenas de poli-(oxifosfinooxi-1,3-propanodiol) y/o polietilenglicol.
- 12.- DsARN según una de las reivindicaciones 8 a 10, formándose el enlace químico por medio de análogos de purina utilizados en lugar de purinas en las zonas complementarias II.
- 13.- DsARN según una de las reivindicaciones 8 a 10, formándose el enlace químico por medio de unidades azabenceno insertadas en las zonas complementarias II.
- 14.- DsARN según una de las reivindicaciones 8 a 10, formándose el enlace químico por medio de análogos de nucleótidos ramificados utilizados en lugar de nucleótidos en las zonas complementarias II.
- 15.- DsARN según una de las reivindicaciones 8 a 10, utilizándose para la producción del enlace químico al menos uno de los grupos siguientes: azul de metileno; grupos bifuncionales, preferentemente bis-(2-cloroetil)-amina; N-acetil-N'-(p-glioxil-benzoil)-cistamina; 4-tiouracilo; psoraleno.
- 16.- DsARN según una de las reivindicaciones 8 a 10, formándose el enlace químico por medio de grupos tiofosforilo previstos en los extremos de la zona de hebra doble.
- 17.- DsARN según una de las reivindicaciones 8 a 10, siendo el enlace químico enlaces de triple hélice previstos en los extremos de la zona de hebra doble.

- 18.- DsARN según una de las reivindicaciones precedentes, estando modificados los nucleótidos de dsARN.
- 19.- DsARN según una de las reivindicaciones precedentes, estando substituido al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos de dsARN en la zona complementaria II por un grupo químico, preferentemente un grupo 2'-amino o 2'-metilo.
- 5 20.- DsARN según una de las reivindicaciones precedentes, siendo al menos un nucleótido en al menos una hebra de la zona complementaria II un "nucleótido cerrado" con un anillo sacárico, de modo preferente modificado químicamente mediante un puente 2'-0, 4'-C-metileno.
- 10 21.- DsARN según una de las reivindicaciones precedentes, estando el dsARN unido a al menos una proteína envolvente viral procedente de un virus, derivada del mismo o producida por vía sintética, asociado a la misma o envuelto en la misma.
- 22.- DsARN según la reivindicación 21, siendo la proteína envolvente derivada del poliomavirus.
- 23.- DsARN según la reivindicación 21 o 22, conteniendo la proteína envolvente la proteína viral 1 (VP1) y/o la proteína viral 2 (VP2) del poliomavirus.
- 15 24.- DsARN según una de las reivindicaciones 21 a 23, estando orientado un lado al interior del cápsido o de la estructura de tipo cápsido en el caso de formación de un cápsido o una estructura de tipo cápsido.
- 25.- DsARN según una de las reivindicaciones precedentes, siendo el dsARN complementario al elemento de transcripción de ARN primario o procesado del gen objetivo.
- 26.- DsARN según una de las reivindicaciones precedentes, siendo las células de mamífero células humanas.

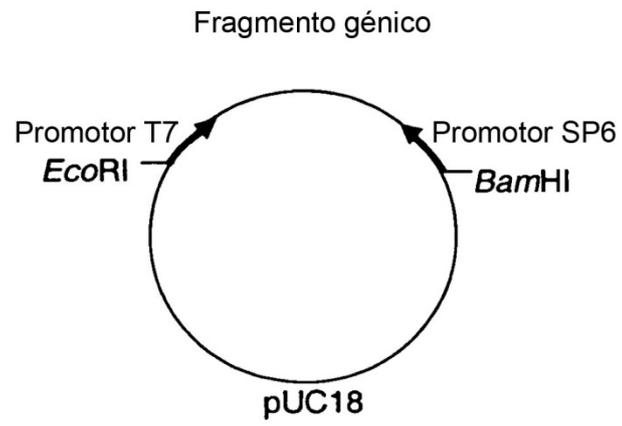


Fig. 1

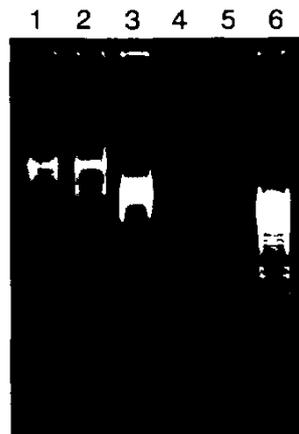


Fig. 2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

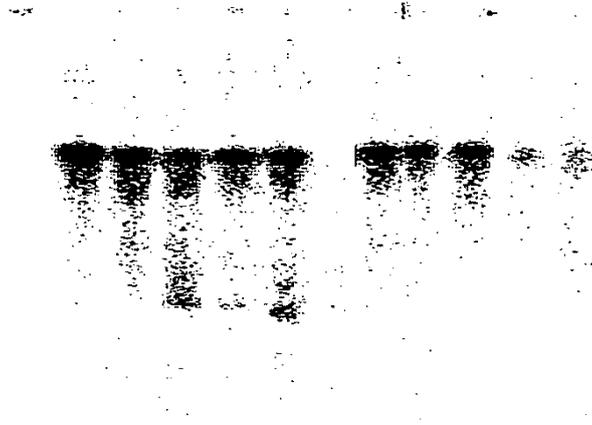


Fig. 3

