

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 336 440**

(51) Int. Cl.:

**C12N 15/11** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03703543 .3**

(96) Fecha de presentación : **06.02.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1554381**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **20.07.2005**

(54) Título: **Silenciamiento postranscripcional de la expresión del factor tisular mediante ARN de interferencia cortos.**

(30) Prioridad: **07.02.2002 NO 20020612**  
**08.02.2002 US 354515 P**  
**16.10.2002 NO 20024987**

(73) Titular/es: **siRNAsense AS.**  
**Gaustadallée 21**  
**0349 Oslo, NO**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.04.2010**

(72) Inventor/es: **Prydz, Hans Peter B.;**  
**Holen, Torgeir;**  
**Amarzguioui, Mohammed;**  
**Wiiger, Merete y**  
**Babaie, Eshrat**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.04.2010**

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Silenciamiento postranscripcional de la expresión del factor tisular mediante ARN de interferencia cortos.

5 La presente invención se refiere a los ARN sintetizados, más específicamente a los ARN cortos de interferencia (ARNsi) que pueden modular la expresión del Factor Tisular (FT), así como a la preparación farmacéutica que comprende los ARNsi sintetizados y a su utilización.

### Antecedentes de la invención

10 Los mecanismos que silencian la expresión génica innecesaria son críticos para la función celular normal, y el silenciamiento del ARN es un nuevo campo de investigación que ha reunido durante la última década estudios independientes en varios organismos. Se ha sabido durante un largo periodo que las interacciones entre las secuencias homólogas del ADN y/o del ARN pueden silenciar genes y provocar la metilación del ADN (1). El descubrimiento de  
15 15 la interferencia del ARN (ARNi) en *C. elegans* en 1998 centró la atención en el ARN bicanalario (ARNds) como un productor de silenciamiento génico, y muchos efectos de silenciamiento génico en las plantas son conocidos por estar mediados por el ARNds (1).

20 El ARNi se describe normalmente como un fenómeno de silenciamiento génico tras las transcripción (PTGS) en que el ARNds activa la degradación del ARNm homólogo en el citoplasma (1). Sin embargo, el potencial del ARNds nuclear para introducir una serie de reacciones que conducen a modificaciones epigenéticas de secuencias de ADN homólogas y silenciar en el nivel de transcripción no debería pasarse por alto. Además, aun cuando los aspectos nucleares del silenciamiento del ARN han sido estudiados especialmente en plantas, existen indicaciones de que el ADN dirigido por ARN similar o las modificaciones de cromatina pueden producirse también en otros  
25 organismos.

30 El ARNi en animales, y los fenómenos relacionados de PTGS en plantas, proceden del mismo mecanismo muy conservado, indicando un origen antiguo (1). EL procedimiento básico implica un ARNds que es procesado en unidades más cortas (denominadas ARN corto de interferencia; ARNsi) que guían el reconocimiento y la escisión conocida del ARN mensajero (ARNm) homólogo. Los ARNds que (después del tratamiento) activan ARNi/PTGS pueden prepararse en el núcleo o citoplasma de numerosas maneras.

35 El tratamiento del ARNds en los ARNsi, que a su vez degradan el ARNm es un procedimiento de degradación del ARN en dos etapas. La primera etapa implica una actividad de ARNds endonucleasa (ribonucleasa de tipo III; ARNasa de tipo III) que procesa el ARNds en los ARN transcritos y complementarios que presentan 21 a 25 nucleótidos (nt) de longitud, es decir ARNsi. En *Drosophila* esta proteína ARNasa de tipo III se denomina Dicer. En la segunda etapa los ARNsi complementarios producidos se combinan con un complejo de ribonucleasa denominado complejo de silenciamiento producido por ARN (RISC), y actúan como guías del mismo, que escinde los ARNm monocatenarios homólogos. El RISC corta el ARNm aproximadamente en la mitad de la zona emparejada con el ARNsi complementario, después de lo cual el ARNm se degrada más. Los ARNds de diferentes procedencias pueden introducir la serie de reacciones de tratamiento lo que conduce a ARNi/PTGS. Además, recientes trabajos también sugieren que puede haber más de una serie de reacciones para la incisión del ARNds, produciendo distintas clases de ARNsi que pueden no ser funcionalmente equivalentes.

45 45 El silenciamiento del ARN, (que es activo a diferentes niveles de expresión génica en el citoplasma y en el núcleo) parece que ha evolucionado para contrarrestar la proliferación de secuencias extrañas tales como los elementos transponibles y los virus (muchos de los cuales producen ARNds durante la replicación). Sin embargo ya que el ARNi/PTGS produce una señal móvil que provoca el silenciamiento en puntos distantes, debería considerarse la posibilidad de inyectar directamente los ARNsi corta la síntesis de proteínas y/o funciona como una herramienta terapéutica en células de mamífero.

55 Hasta ahora, se sabe poco acerca de los efectos generales de las mutaciones o modificaciones químicas en una secuencia de ARNsi. Boutla *et al.* (14) publicaron que un ARNsi mutado con un solo apareamiento incorrecto situado en el centro con respecto a la secuencia diana del ARNm conservaba sustancialmente actividad en *Drosophila*. En cambio, Elbashir *et al.* (15) observaron que un solo apareamiento incorrecto era perjudicial para la actividad en un ensayo *in vitro* de lisado de embrión de *Drosophila*. En el contexto de la presente solicitud se ha tratado de reconciliar estos dos resultados conflictivos describiendo el proceso del ARNi *in vivo* como un proceso dinámico donde influyen varios factores en el resultado final, entre ellos la posición diana del ARNsi, la concentración de ARNsi, la concentración de ARNm, la producción de ARNm, y la actividad de la división inherente a los ARNsi, actividad que puede ser reducida gradualmente por mutaciones de apareamiento incorrecto.

60 Se han descrito también otros resultados. Por ejemplo, Jacque *et al.* (16) observan que un solo apareamiento incorrecto en un ARNsi que dirige la LTR de los VIH perdía solamente alguna actividad, mientras que otro ARNsi que dirige el VIF de los VIH no pierde casi ninguna actividad. Cuatro mutaciones, sin embargo, suprimieron la actividad completamente. Otros ejemplos de supresión completa de actividad son observados por Gitlin *et al.* (17), Klahre *et al.* (18) y Garrus *et al.* (19), utilizando 5, 6 y 7 mutaciones respectivamente. Unas mutaciones dobles, centrales, utilizadas por Boutla y el grupo propio de los autores (14, 15), condujo a una grave pérdida de actividad también para Yu *et al.* (20) y Wilda *et al.* (21), este último utilizando un ARNsi con solo 17 pares de bases. Es interesante, en vista de los

# ES 2 336 440 T3

ARNsi muy activos, metilados en el extremo de los inventores, que en el informe de Tuschl el ARNsi metilado en 2'-OH completamente es inactivo.

- Además, existen dos artículos publicados de supresión de la actividad por una sola mutación. Uno de ellos, sin embargo, el trabajo de Brummelkamp *et al.* (22), está utilizando un ARN corto en horquilla (ARNsh) que se supone que produce ARNsi por acción de Dicer (23). Este montaje de ARNsh fue inactivado por una sola mutación en el supuesto segundo nucleótido del ARNsh, o por un solo apareamiento incorrecto en el supuesto noveno nucleótido. Gitlin *et al.* (17), por otra parte, discutió el caso para la inactivación de una sola mutación más intensamente aislando cepas de poliovirus resistentes al ARNsi que contienen una sola mutación en la secuencia diana en el ARN genómico, o bien en el sexto nucleótido del ARNsi o en el noveno nucleótido, ambos contrarrestados en el extremo 5' de la cadena transcrita. En equilibrio, el ARNsi diferente parece estar activado a diferentes grados.

Tradicionalmente, la modificación química de los ácidos nucleicos ha sido utilizada entre otras cosas para proteger las secuencias de ácido nucleico monocatenario contra la degradación por la nucleasa y obtener de este modo secuencias con una vida media más larga. Por ejemplo, el documento WO 91/15499 da a conocer los 2'-O-alquilo oligonucleótidos útiles como sondas complementarias. Además, se ha utilizado la 2-O-metilación para estabilizar los ribozimas de cabeza de martillo (4). Sin embargo, se sabe poco acerca de los efectos de las modificaciones químicas de los ARNsi. Además, la presencia de sustituyentes largos en el 2'-hidroxilo del nucleótido con terminal 5' puede interferir con la propia fosforilación del ARNsi que se ha representado que es necesaria para la actividad del ARNsi (24).

De este modo, una actividad diferencial inherente en varios ARNsi en una población significaría que diferentes ARNsi serán afectados por las modificaciones del ARNsi, químicas o mutacionales, de diferentes maneras.

- El Factor Tisular (FT) es el activador más potente de la coagulación sanguínea (2) e instrumental originando la trombosis arterial en el momento de la ruptura de las placas ateroscleróticas. Existen además muchas pruebas de que el alto contenido de FT en las células cancerosas se correlaciona con la angiogénesis dirigida por el cáncer y con tendencia a la metástasis. Además, FT es de importancia patógena central en caso de la coagulación intravascular séptica diseminada (por ejemplo, sepsia meningocócica). De este modo, los procedimientos para modular o silenciar el FT serían de gran valor.

La solicitud de patente WO 01/75164 (A2) da a conocer un sistema de *Drosophila in vitro* que se utiliza para demostrar que el ARNd se procesa para los segmentos de ARN de 21 a 23 nucleótidos (nt) de longitud, en el que estos fragmentos de 21 a 23 nt son mediadores específicos de la degradación del ARN. Caplen *et al.* (28) señala que el ARNsi sintético dirigido hacia un gen CAT y el gen unc-22 de *C. elegans* redujo la expresión en los sistemas de vertebrados e invertebrados respectivamente. Sin embargo, ni el documento WO 01/75164 ni Caplen *et al.* (28) dan a conocer nada en relación con los ARNsi que pueden modular directamente la expresión de FT en mamíferos. Janowsky y Schwenzer (26) informan de que la activación de un ribozima de cabeza de martillo por los facilitadores de oligonucleótidos ilustrados entre otras cosas con un montaje de ribozima de cabeza de martillo y los facilitadores de oligonucleótidos dirigidos hacia hTF. Sin embargo, el mecanismo para inhibir la expresión génica con los ribozimas de cabeza de martillo y los facilitadores de oligonucleótidos utilizados por Janowsky y Schwenzer (26) son evidentemente diferentes del mecanismo por el que los ARNsi inhiben la expresión de algún gen tal como el gen de codificación de FT.

Además de los estudios preliminares sobre anticuerpos, ningún inhibidor directo clínicamente útil de FT está disponible, ni puede regularse únicamente a nivel de expresión génica. Los estudios sobre el silenciamiento de transgenes en plantas ha conducido a una oportunidad más bien general para suprimir la expresión génica, y el ARNd está ya establecido como herramienta de rutina para el silenciamiento génico por ejemplo, en plantas, *C. elegans* y *Drosophila* (3). Sin embargo, el ARNd no puede utilizarse en células de mamíferos a causa de efectos no especificados. Además, aun cuando toda la expresión génica puede suprimirse, en principio, mediante la utilización de por ejemplo, oligonucleótidos (cadenas sintéticas), ribozimas o moléculas de ARNsi, es sumamente difícil encontrar exactamente qué parte de una secuencia de ARNm que debería utilizarse para sintetizar el o los ARNsi que son activos en la supresión de un gen específico como los ARNsi son aquí muy dependientes de la posición. Este aspecto está más apoyado por los resultados descritos por Harborth *et al.* (31), que experimentaron que sin revelar ninguna propiedad inusual, las secuencias de ARNsi dirigidas hacia diferentes secuencias del mismo gen ejercían una eficacia completamente distinta. Además, como las secuencias en el ARNm diana pueden también ser diferencialmente accesibles a los ribozimas (4), los esfuerzos para identificar los ribozimas realmente eficaces para con FT con poca o ninguna toxicidad, todavía no han tenido éxito. Por lo tanto, hay esperanzas de que los esfuerzos actuales para aprovechar el ARNi en los mamíferos puedan conducir a nuevos desarrollos en la terapia génica (5) y que los ARNsi puedan proporcionar una herramienta en el silenciamiento específico de FT de mamífero.

## Sumario de la invención

Por consiguiente un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar ARNsi que, junto con el RISC, pueden modular directamente la expresión de FT en mamíferos. Estos objetivos se han obtenido mediante la presente invención y caracterizado por las reivindicaciones adjuntas. Generalmente, la presente invención se refiere a moléculas de ARN corto de interferencia que son mono o bicatenarias y comprenden por lo menos 21 a 25 nucleótidos, y en las que dichos ARNsi pueden modular la expresión génica de FT.

# ES 2 336 440 T3

Los ARNsi son ARNs de  $\approx$  21 a 25 nucleótidos que se ha representado que funcionan como intermedios clave en el desencadenamiento de la degradación de ARN específico para la secuencia. En el trabajo con los ARNsi y el activador de coagulación FT, se demuestra que los ARNsi pueden desviar el iniciador Dicer de ARNi de el ARNasa de tipo III y cargar directamente el efecto nucleasa RISC de modo de que el ARNm de FT se degrada. Según la presente invención se demuestra que diferentes ARNsi contra la misma diana varían en eficacia, y de este modo, los ARNsi se sintetizan contra diferentes partes del ARNm de FT, después de lo cual se combinan con RISC que es guiado a continuación para la degradación/silenciamiento específico de ARNm de FT.

Además, el ARNsi de la presente invención puede comprender una o dos mutaciones de apareamiento de bases en comparación con la secuencia natural de las presentes moléculas de ARNsi, es decir, la secuencia modificada son aproximadamente 90% homólogos con las moléculas de ARNsi naturales de la presente invención.

La presente invención también da a conocer moléculas de ARNsi que están químicamente modificadas en comparación con el ARNsi natural de la presente invención, es decir, mediante la introducción de un alquilo inferior tal como metilo en la posición 2'OH o mediante la introducción de enlaces de fosforotioato en la secuencia.

La presente invención da a conocer además que el ARNsi de silenciamiento es relativamente estable pero disminuye a lo largo del tiempo y que la actividad de coagulación del FT puede reducirse cinco a diez veces y permanecer así durante un periodo de 5 días (120 horas) después de una sola transfección de ARNsi. De este modo, la presente invención se refiere también a una preparación farmacéutica que comprende los ARNsi de la presente invención, así como la utilización de la preparación farmacéutica. En el contexto de la presente invención, se da a conocer por primera vez el ARNsi de silenciamiento de la expresión génica subyacente a un sistema fisiológico complejo en células de mamífero. Los efectos de posición observados harán que se demande más la investigación de los ARNsi eficaces, pero cuando se identifican, los ARNsi eficaces demuestran ser muy prometedores para estudios *in vivo* en el futuro.

## 25 Descripción detallada de la invención

Más específicos, los presentes inventores dan a conocer moléculas de ARN de interferencia corto (ARNsi), caracterizadas porque es un ARNsi doble o monocatenarios que comprenden por lo menos 19 nucleótidos, y que está dirigida hacia un factor tisular (FT) que codifica la secuencia de ácido nucleico o fragmentos de la misma, y en la que la molécula de ARNsi se seleccionada de entre el grupo constituido por

- (a) una molécula de ARNsi que tiene la secuencia de ácido nucleico representada en la SEC. ID. nº 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10 u 11
- 35 (e) un ARNsi con la secuencia de ácido nucleico en (a)-(d) en el que las secuencias se modifican mediante la introducción de un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> o alquililo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> en uno o más del grupo hidroxilo 2' OH en la secuencia y/o sustituyendo el enlace fosfodiéster con un enlace fosforotioato.

40 Resulta preferido según un aspecto que los ARNsi de la presente invención sean bicatenarios. Según otro aspecto los ARNsi de la presente invención tienen de 21 a 25 nucleótidos de longitud, más preferentemente de 21 nucleótidos de longitud y aún más preferentemente están identificados por las SEC. ID. nº 1-4, 6-8 y 10-11.

Según otro aspecto todavía de la invención, los ARNsi se dirigen a FT o a fragmentos del mismo que son de origen 45 vertebrado, preferentemente de origen mamífero, más preferentemente de origen humano.

Además resulta preferido que el presente ARNsi provoque la división del ARNm cuyo episodio más preferentemente se identifica por la SEC. ID. nº 1 o SEC. ID. nº 2.

50 También se describen en la presente memoria moléculas de ARNsi que comprenden una secuencia que es aproximadamente 90% homóloga a una molécula de ARNsi representada en la SEC. ID. nº 1 a la SEC. ID. nº 8 o que el ARNsi comprende una secuencia como la representada en la SEC. ID. nº 1 a la SEC. ID. nº 8 en la que un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> o alquililo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> se introduce en uno o más grupos de hidroxilo 2' OH. Preferentemente, la molécula de ARNsi tiene la secuencia representada en la SEC. ID. nº 9 a la SEC. ID. nº 11).

55 Además según otro aspecto resulta preferido que las moléculas de ARNsi de la presente invención comprendan una secuencia como la representada en SEC. ID. nº 22 a SEC. ID. nº 25 en las que el enlace fosfodiéster ha sido sustituido por un enlace tiofosfodiéster. Preferentemente la secuencia modificada es la SEC. ID. nº 24, nº 28 o nº 29, más preferentemente SEC. ID. nº 29.

60 Se describe también un procedimiento para tratar, prevenir o inhibir la coagulación indeseada de la sangre en el que una preparación farmacéutica que comprende uno o más de los ARNsi según la presente invención se administra a un animal o a una persona que necesita dicho tratamiento. Preferentemente, la preparación comprende una o más de las SEC. ID. nº 1-4 ó 6-8, más preferentemente comprende la SEC. ID. nº 1 y/o SEC. ID. nº 2.

65 En otro aspecto todavía, la presente invención se refiere a preparaciones farmacéuticas que comprenden uno o más ARNsi según la presente invención. Preferentemente, la preparación comprende los ARNsi representados en las SEC. ID. nº 1 o nº 2. Resulta preferido también que la preparación según la invención comprenda una o más de las secuencias

# ES 2 336 440 T3

representadas por la SEC. ID. nº 10, nº 11, nº 24, nº 28 o nº 29, más preferentemente la SEC. ID. nº 29. La preparación según la presente invención comprende además por ejemplo, diluyentes, lubricantes, aglutinantes, portadores, medios de disgregación, medios de absorción, colorantes, edulcorantes y/o saborizantes. También es favorable que la presente invención comprenda adyuvantes y/u otros principios terapéuticos.

5 Además, todavía en otro aspecto, la presente preparación puede administrarse por ejemplo, por vía parenteral (por ejemplo, por inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraperitoneal), por vía oral, nasal, bucal, rectal, vaginal y/o por inhalación o insuflado. Más preferentemente, la presente preparación se formula como por ejemplo, soluciones o suspensiones en infusión, un aerosol, cápsulas, comprimidos, píldoras, atomizadores, supositorios, etc., en formulaciones de dosis que contienen portadores, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables inocuos convencionales. La preparación de la presente invención puede administrarse preferentemente en una dosis, en dosis divididas o a modo de dispositivos de liberación lenta, preferentemente solos o junto con otros productos farmacéuticos.

10 15 Además, la presente invención se refiere también a la utilización de uno o más de los presentes ARNsi para preparar una preparación farmacéutica adecuada para el tratamiento, prevención y/o inhibición de la coagulación de la sangre no deseada en vertebrados, preferentemente mamíferos, más preferentemente seres humanos. Preferentemente, la preparación preparada según la utilización de la presente invención puede administrarse por ejemplo, por vía parenteral (por ejemplo, por inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraperitoneal), por vía oral, nasal, bucal, rectal, vaginal y/o por inhalación o insuflado.

20 25 Por último, la presente invención también da a conocer un procedimiento para utilizar la preparación farmacéutica según la presente invención en la que dicha preparación farmacéutica adecuada para el tratamiento, prevención y/o inhibición de la coagulación no deseada de la sangre se administra a un animal o persona necesitada de dicho tratamiento. La vía de administración según el procedimiento de la presente invención es por ejemplo, por vía parenteral (por ejemplo, por inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraperitoneal), por vía oral, nasal, bucal, rectal, vaginal y/o por inhalación o insuflado.

30 La presente invención se describe a continuación con mayor detalle, haciendo referencia a figuras y ejemplos.

35 Figura 1. Los ARNsi, montaje indicador y ARNi de la expresión transgénica; a) Se representan las cadenas transcrita (superior) y complementaria (inferior) de las especies de ARNsi que se dirigen a ocho puntos en el ARNm del FT humano (registro de entrada en Genbank nº M16553), b) Montaje indicador de Luciferasa de FT humano y c) ARNi por ARNsi en ensayos de contrasfección (se representan medias de tres o más experimentos independientes cada uno por triplicado  $\pm$  s.d.).

40 Figura 2. Eficacia de los ARNsi en ensayos de cotransfección normalizados en células HaCaT. Diferentes lotes sintéticos del ARNsi de hTF167i presentaban eficacia similar. Los resultados son medias de por lo menos tres experimentos, cada uno por triplicado.

45 Figura 3. Reducción mediada por ARNsi de la expresión del FT endógeno; a) hTF167i y hTF372i produjo la escisión del ARNm en células transfectadas. El análisis Northern de ARNm del FT se llevó a cabo después de la transfección de células HaCaT con el ARNsi (100 nM) con GADPH como referencia. La cabeza de flecha indica los fragmentos de la división resultantes de la acción del ARNsi, b) Mediciones del efecto de los ARNsi en los niveles de ARNm en estado estacionario (barras rellenas), la actividad procoagulante (barras punteadas) y la expresión de la proteína FT (antígeno) (barras con trama) demuestran que el ARNsi reduce el ARNm, concentraciones de antígeno FT y actividad procoagulante. Para la medición de la actividad procoagulante y del antígeno, se recogieron las células 48 h después de la transfección de si para adaptar la vida media de 7 a 8 h de la proteína FT. Los datos son de un experimento representativo por triplicado.

50 Figura 4. Curva de respuesta a la dosis para hTF167i.

55 Figura 5. Dependencia del tiempo de ARNi mediado por ARNsi; a) La actividad inhibidora se reduce cuando las mutaciones (M1 y M2 se refieren a las mutaciones una y dos, respectivamente) se introducen en los ARNsi. Las células se transfecaron con ARNsi 100 nM y se recogieron para el aislamiento del ARNm 4, 8, 24 y 48 h (barras rellenas, barras con líneas, barras blancas con puntos negros y barras con trama, respectivamente). Los niveles de expresión se normalizaron a GADPH y se normalizaron para las células pseudotransfектadas en todos los puntos de tiempo, b) Transcurso de tiempo de la disminución del efecto inhibidor para las concentraciones de ARNm (rombos negros), actividad génica del indicador (triángulos blancos) y actividad procoagulante (barras rellenas).

60 Figura 6. Modificaciones del ARNsi. (A) Versiones de tipo mutado y natural del hTF167i del ARNsi. La secuencia de la cadena transcrita del ARNsi natural (wt) corresponde a las posiciones 167 a 187 en el Factor Tisular humano (nº de registro M16553). Los mutantes individuales (s1, s2, s3, s4, s7, s10, s11, s13 y s16) y dobles (ds7/10, ds10/11, ds10/13 y ds10/16) denominados en su totalidad según la posición de la mutación, contados a partir del extremo 5' de la cadena transcrita. Todas las mutaciones (en negrita) son inversiones de GC en relación con el tipo natural. (B) Versiones modificadas químicamente del hTF167i del ARNsi. Los ribonucleótidos no modificados están en el recuadro inferior. Los enlaces de fosforotioato están indicados por asteriscos (\*), mientras que los ribonucleótidos 2'-O-metilado y 2'-O-alilados están en letra normal y negrita subrayada en el recuadro superior, respectivamente.

## ES 2 336 440 T3

Figura 7. Actividad de los mutantes contra el ARNm del hTF endógeno. Se recogieron las células HaCaT para el aislamiento del ARNm 24h después de la transfección. La expresión de FT se normalizó a la del GAPDH. La expresión normalizada en células pseudotransfectadas se situó en el 100%. Los datos son las medias ± s.d. de por lo menos tres experimentos independientes.

5

Figura 8. Actividad de ARNsi modificado químicamente frente al ARNm del FT endógeno. Se realizaron los experimentos y se analizaron tal como se describe en la Figura 7.

Figura 9. Persistencia del silenciamiento de FT por los ARNsi modificados químicamente. A) Expresión de FT 10 específicamente 5 días después de la transfección de ARNsi 100 nM. B) Periodo del silenciamiento del ARNm de FT. Se recogieron las células 1-3-5 días después de la transfección individual de ARNsi 100 nM. El medio se reemplazó cada dos días.

Con el fin de suministrar los ARNsi para obtener el silenciamiento del FT humano (hTF), se sintetizaron químicamente los ARN de 21 nucleótidos utilizando fosforamiditas (Pharmacia y ABI). Se purificaron los oligorribonucleótidos sintéticos desililados en HPLC en fase inversa. Se hibridaron los ribonucleótidos a 10  $\mu$ M en 500  $\mu$ l de Tris-HCl 10 mM pH 7,5 a ebullición y enfriamiento gradual en un baño de agua. La consecución de la hibridación se confirmó por electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizada. Se diseñaron especies de ARNsi dirigiéndose cada una a una zona dentro del ARNm del FT humano (nº de registro M16553) diseñado con dos nucleótidos de desoxitimidina 20 con prolongaciones 3' y denominados según la posición del primer nucleótido de la cadena transcrita, utilizando la numeración de la entrada en el Genbank (Figura 1a). Según la presente invención trece ARNsi frente a ARNm del TFh (6) se sintetizaron (Fig. 1a). Ocho de éstos (los ocho primeros) ARNsi se denominaron SEC. ID. nº. 1 a SEC. ID. nº. 8, respectivamente, y algunos de los puntos seleccionados en el gen del hTF fueron los dos más accesibles (SEC. ID. nº 1 y nº 2) y los dos menos accesibles (SEC. ID. nº. 3 y nº. 4) en el ensayo de ribozima de los autores descritos 25 anteriormente (4). La presente invención se refiere a los ARNsi sintetizados según las SEC. ID. nº 1-4, 6-8, 10-11 y 22-31.

Para determinar si las mutaciones eran toleradas de la misma manera en el ARNsi completo, los ARNsi según la 30 presente invención se cartografiaron más sistemáticamente. Para evitar afectar la estabilidad doble del ARNsi, sólo los pares de GC fueron dirigidos por mutación, por inversión de los pares tal como se describe en el ejemplo 5 más adelante.

Además, el efecto de los ARNsi en las células humanas es temporal y típicamente desaparece en unos pocos días 35 en el cultivo celular (NO 2002 0612, 29, 30). La capacidad para ampliar el periodo de silenciamiento eficaz sería de gran importancia para la utilización opcional de los ARNsi como terapéuticos. Por lo tanto se debería aumentar la estabilidad intracelular de ARNsi, sin alterar la actividad, mediante la introducción de cantidades gradualmente crecientes de varias modificaciones químicas en ambos extremos del ARNsi. Se han utilizado anteriormente enlaces de tiofosfato y modificaciones en 2'-O- en forma de metilación y alilación (4) para estabilizar las ribozimas de cabeza de martillo, y decidieron explorar la viabilidad de una estrategia similar para la estabilización de los ARNsi.

40

Los montajes indicadores del FT humano que van a utilizarse en el sistema doble de Luciferasa (Promega) se diseñaron utilizando la zona de codificación del FT que se clonó en el marco con el gen de Luciferasa (LUC) de la luciérnaga, produciendo el montaje de fusión TF-LUC (nº. de registro AF416989). La numeración del montaje de fusión se refiere a la de la entrada en el Genbank para el FT y para el plásmido potenciador del pGL3 (Promega) 45 para LUC. El plásmido pcADN3-Rluc (nº de registro AF416990), que codifica la Luciferasa de renilla (Rluc; no representada) se utilizó como referencia interna. Las zonas del FT y del ADNc de LUC contenidas en el montaje están indicadas en la Figura 1b. El sistema doble de Luciferasa es un sistema indicador que se utiliza para detectar cuento ARNm de FT es el que es degradado por el/los ARNsi.

50

Se mantuvieron las células HeLa, Cos-1 y 293 en Medio Esencial Mínimo de Dulbecco (DMEM) enriquecido con suero de ternero fetal al 10% (Gibco BRL). Las HaCaT de la estirpe celular de queratinocito humano se cultivó en suero exento de medio de queratinocitos enriquecido con 2,5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico y 25  $\mu$ g/ml de extracto de pituitaria bovina. Todas las estirpes celulares se pasaron con regularidad a subconfluencia. La víspera las células del experimento cultivas en DMEM se trataron con tripsina y se volvieron a suspender en medio completo antes 55 de colocarlas en placas. Las células HaCaT se trataron con tripsina hasta su desprendimiento. Se añadió a continuación inhibidor de tripsina y las células se centrifugaron durante 5 min a 400x g antes de volver a la suspensión en medio enriquecido y la colocación en placas. Las células se transfecaron uno o dos días después.

60

Se realizaron cotransfecciones transitorias mediadas por lipofectamina por triplicado en placas de 12 pocillos con 0,40  $\mu$ g/ml de plásmido (0,38  $\mu$ g/ml de indicador y 20  $\mu$ g/ml de referencia), y por lo general ARNsi 30 nM (0,43  $\mu$ g/ml) esencialmente como se describe (4). Se midieron las concentraciones de actividad de Luciferasa en 25  $\mu$ l de lisado celular 24 h después de la transfección utilizando el análisis de Luciferasa Doble (Promega). Se realizaron transfecciones en serie transfeciendo inicialmente con ARNsi 100 nM, seguido de transfección con indicador y plásmidos de referencia interna antes de los puntos de tiempo de recogida.

65

Para el análisis Northern, células HaCaT en placas de 6 pocillos se transfecaron con ARNsi 100 nM en medio exento de suero. Se utilizó Lipofectamine2000<sup>TM</sup> para una eficacia de transfección mayor. Se aisló el Poli(A) ARNm 24 h después de la transfección utilizando Dynabeads oligo(dT)<sub>25</sub> (Dynal). El ARNm aislado se fraccionó durante 16

# ES 2 336 440 T3

a 18 h en geles de agarosa/formaldehído al 1,3% (0,8 M) y se inmunotransfirieron a membranas de nilón (Magna-Charge, Micron Separations Inc.). Se hibridaron las membranas con TF cebado al azar (posición 61-1217 en ADNc) y sondas de ADNc con GAPDH (1,2 kb) en tampón de hibridación PerfectHyb (Sigma) recomendado por el fabricante.

- 5 Para la medición de la actividad del FT se lavaron tres veces las monocapas de las células HaCaT con solución salina tamponada con barbital (BBS) enfriada en hielo pH 7,4 (BBS, barbital sódico 3 nM, NaCl 140 mM) y se desecharon en BBS. Inmediatamente después de la recogida y homogeneización se midió la actividad en un ensayo de coagulación de una etapa utilizando plasma pobre en plaquetas valorado normal mezclado con dos donantes y CaCl<sub>2</sub> 10 mM. La actividad se relacionó a un patrón (6, 7). Una unidad (U) de FT corresponde a 1,5 ng de FT determinados en  
10 el ELISA de FT (6, 7). La actividad se normalizó al contenido en proteínas de los homogeneizados celulares, medidos por el ensayo DC BioRad.

Se cuantificó el antígeno del FT utilizando el kit ELISA para el Factor Tisular Imubind (American Diagnostica, Greenwich, CT, US). Este ELISA reconoce la apoproteína del FT, y los complejos de FT:Factor de coagulación VII (FVII). Las muestras se dejaron descongelar a 37°C y se homogeneizaron. Una alícuota de cada homogeneizado (100 µl) se diluyó en solución salina tamponada con fosfato que contenía BSA al 1% y Tritón X-100 al 0,1%. Esta muestra se añadió a continuación al pocillo de ELISA y el procedimiento del fabricante continuó. Las concentraciones de antígeno se normalizaron al contenido en proteína total en los homogeneizados celulares.

- 20 En los diversos ARNsi mutantes se analizó la disminución del ARNm del FT endógeno en células HaCaT, 24 h después de la transfección mediada por LIPOFECTAMINE2000, como se describió anteriormente para las secuencias del ARNsi natural de la presente invención.

Los ARNsi según la presente invención pueden utilizarse para silenciar el FT de mamífero y de este modo impedir la coagulación de la sangre no deseada. Por lo tanto, la presente invención se refiere también a la utilización del o de los ARNsi según la presente invención para preparar una preparación farmacéutica y de acuerdo con las técnicas bien conocidas en la materia para la formulación farmacéutica, que es adecuada para el tratamiento, prevención y/o inhibición de la coagulación indeseada de la sangre. La preparación según la presente invención puede comprender de este modo uno o más de los ARNsi según la presente invención, diluyentes, lubricantes, aglutinantes, vehículos, medios 30 de dispersión y/o absorción, colorantes, edulcorantes, saborizantes, etc., conocidos todos en la materia. Además, la presente preparación puede contener también adyuvantes y/o otros principios terapéuticos, y puede administrarse sola o junto otros productos farmacéuticos.

Una preparación farmacéutica según la presente invención puede administrarse por ejemplo por vía parenteral (por ejemplo por inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraperitoneal de soluciones o suspensiones estériles), por vía oral (por ejemplo en forma de cápsulas, comprimidos, píldoras, suspensiones o soluciones), nasal (por ejemplo en forma de soluciones/atomizaciones), bucal, rectal (por ejemplo en forma de supositorios), vaginal (por ejemplo en forma de supositorios), por inhalación o insuflado (por ejemplo en forma de aerosol o solución/pulverización), mediante un depósito implantado, o por cualquier otra vía de administración adecuada, en 40 formulaciones de dosificación que contienen portadores, adyuvantes y/o vehículos inocuos convencionales farmacéuticamente aceptables. La preparación farmacéutica puede administrarse además en una dosis, en dosis divididas o por medio de dispositivos de liberación lenta.

## Ejemplos

45 La invención se describirá a continuación mediante ejemplos. Aunque los ejemplos representan las formas de realización preferidas de la presente invención, no deben considerarse como limitativos del alcance de la presente invención.

50 Para obtener los ARNsi que silencian los ARN del nucleótido 21 del FT humano según la SEC. ID. nº 1 a la SEC. ID. nº 8 se sintetizaron químicamente utilizando fosforamiditas (Pharmacia y ABI). Se purificaron oligonucleótidos sintéticos desprotegidos y desililados en HPLC en fase inversa. Se hibridaron ribonucleótidos a 10 µM en 500 µl de Tris-HCl 10 mM pH 7,5 a ebullición y enfriamiento gradual en un baño de agua. Se confirmó la hibridación satisfactoria por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizada. Se diseñaron especies de ARNsi dirigiendo 55 cada una a una zona dentro del ARNm del FT humano (nº de registro M16553), diseñados con 2 nucleótidos de las prolongaciones 3' de desoxitimidina y se nombraron según la posición del primer nucleótido de la cadena transcripta utilizando la numeración de la entrada al Genbank anterior (Figura 1a).

En conclusión se demuestra, en las células de mamífero, que el ARNsi bicatenario sintetizado para ser complementario a una determinada secuencia parcial en la secuencia del ARNm del TF dirigida, produce la degradación de este ARNm específico (véase el Ejemplo 1). Este efecto dependía mucho de la secuencia, y era contrario a los datos en los organismos inferiores, ya que solamente unas pocas zonas en ARNm del FT fueron muy sensibles a los ARNsi correspondientes. Como puede apreciarse en el Ejemplo 2, la disminución del ARNm del FT produce una notable reducción de la proteína del FT y de actividad del procoagulante que, según el conocimiento de los presentes inventores, 60 es la primera demostración de dicho efecto reproducible en FT no acompañado por efectos secundarios tóxicos. En la actualidad no es posible basar la selección de una secuencia diana sensible a la información actual disponible en las estructuras tridimensionales previstas de los complejos de la proteína del ARN. Sin embargo, según la presente invención se proporcionan dos posiciones de susceptibilidad satisfactoria frente al ARNm de FT.

## ES 2 336 440 T3

Además, se demuestra que una amplia variedad de modificaciones mutacionales y químicas del mejor candidato hTF167i de ARNsi de los autores es bien tolerada. Las modificaciones químicas presentaban alguna pérdida de actividad con las modificaciones de alilo en el extremo 5', y algunas, cabe esperar, toxicidad con tiofosfatos de tramos más largos, pero el ARNsi con los extremos metilados en 2'O no representan actividad fuerte ni aumento de vida útil en los experimentos a lo largo del tiempo.

### Ejemplo 1

10 *Análisis de la eficacia del ARNsi del hTF en células cotransfectadas temporalmente con hTF-LUC y ARNsi hTF (es decir análisis de ARNi por el o los ARNsi en ensayos de cotransfección)*

15 El análisis inicial de la eficacia del ARNsi del FT se realizó en células HeLa cotransfectadas temporalmente con hTF-LUC (Fig. 1b) y ARNsi de hTF (Fig. 1a) utilizando el sistema de Luciferasa Doble (Promega). Las relaciones de LUC a la expresión de Rluc se normalizaron a los niveles en las células transfectadas con un ARNsi representativo inadecuado, proteína serina quinasa 314i (PSK314i).

20 Los ARNsi tenían efectos potentes y específicos en los ensayos de cotransfección, con los mejores candidatos, hTF167i y hTF372i, dando como resultado solamente del 10 a 15% de actividad de Luciferasa residual en células HeLa (Fig. 1c). Además, también se encontró un efecto de posición, ya que hTF562i presentaba solamente efecto intermedio, y hTF478i tenía muy poca actividad. Este modelo se encontró también en las células 293, COS-1 y HaCaT (Fig. 1c), y con los ARNsi de diferentes lotes sintéticos y a varias concentraciones (los ARNsi produjeron el mismo grado de inhibición sobre un intervalo de concentración de 1 a 100 nM en ensayos de cotransfección; datos no representados).

25 Cultivando conjuntamente células transfectadas con ARNsi con células transfectadas con plásmido indicador, tanto en las células HeLa como en el crecimiento inhibido por contacto de las células HaCaT, no indicaba la transferencia del ARNsi entre las células (datos no representados), a pesar de la transferencia mediada por el medio descrita anteriormente por otros investigadores (8).

### Ejemplo 2

30 *Investigación de la dependencia de posición del ARNsi en la resolución a nivel del codón*

35 Se investigó la accesibilidad de la zona que rodea la secuencia diana del mejor ARNsi (es decir hTF167i) a una resolución mayor. Se sintetizaron los ARNsi (hTF158i, hTF161i, hTF164i, hTF170i, hTF173i y hTF176i) con secuencias dirigidas desplazadas en ambos lados del hTF167i en incrementos de 3 nucleótidos, en el que cada uno de ellos compartía 18 de cada 21 nucleótidos con sus vecinos (véase Fig. 1c). Se descubrió sorprendentemente que a pesar de la secuencia mínima y de las diferencias de posición entre estos ARNsi, presentaban un amplio intervalo de actividades (Fig. 2). Existía un cambio gradual fuera de la actividad total de hTF167i que era más pronunciado para los ARNsi corriente arriba. Los dos hTF158i y hTF161i de los ARNsi se desplazaron solamente nueve a seis nucleótidos, respectivamente, de hTF167i, aunque su actividad disminuyó severamente. Estos resultados sugieren que el factor o factores locales produjeron el efecto de posición.

### Ejemplo 3

40 *Ánalisis de la eficacia del ARNsi de hTF en el ARNm endógeno*

45 Los resultados de los ensayos de cotransfección que implican la utilización de la expresión forzada de los genes indicadores como sustratos pueden ser difíciles de interpretar. El efecto del ARNsi se midió también por consiguiente en las dianas del ARNm endógeno en células HaCaT (Fig. 3a) que expresa de manera constitutiva el FT. Los dos mejores ARNsi de FT, hTF167i y hTF372i, presentaban fuerte actividad también en este ensayo, ya que el ARNm del FT normalizado se redujo hasta el 10% y 26%, respectivamente (Fig. 3a). De manera interesante, los productos de escisión, cuyos tamaños eran coherentes con las escisiones primarias en las secuencias diana, eran claramente visibles bajo la banda principal disminuida, aunque los ensayos de escisión del ARNm basados en ARNi han fracasado hasta ahora en los sistemas de mamífero (9). Por lo tanto, la presente invención se refiere también al ARNsi que es capaz de extinguir el ARNm en células de un mamífero. Además, el efecto observado sugiere que el RISC puede ser activo también en mamíferos. El tercer mejor ARNsi en los ensayos de cotransfección, hTF256i, produjo también una reducción significativa de los niveles de ARNm del FT (expresión residual del 57%, datos no representados). El ARNsi del FT restante no presentaba ninguna actividad tal como se mide por los ensayos Northern (Fig. 3b), ni estimulaban la expresión de FT, un punto de algún interés, como la transfección con ribozimas modificadas químicamente pueden producir tres veces el ARNm de FT (datos no representados). Por lo tanto, esta inactividad relativa de los ARNsi inapropiados (es decir, los ARNsi con efectos "inespecíficos") hace más prometedor los fármacos a base de ARNsi.

50 La actividad de coagulación en las células HaCaT se redujo 5 veces y 2 veces, respectivamente, en las células transfectadas con hTF167i i hTF372i, en comparación con las células pseudotransfectadas (Fig. 3b y Fig. 5b). El

## ES 2 336 440 T3

efecto de los ARNsi sobre la proteína FT celular total se midió también (Fig. 3b), y se demostró un efecto inhibidor que era generalmente mayor que el efecto observado sobre la actividad de procoagulación. De este modo, según la presente invención, los inventores concluyen que los ARNsi hTF167i y hTF372i presentan especificidad y potencia en un sistema fisiológico complejo y, que los autores han derrapado efectos de posición, ya que otras moléculas de ARNsi contra el mismo ARNm diana son básicamente inactivas. Los datos de una nueva serie de ARNsi del FT apoyan esta conclusión (datos no representados), y esta inactividad de determinados ARNsi puede ser debida a la estructura de soporte del ARNm o al bloqueo de las secuencias de escisión por la cobertura de la proteína impenetrable (10).

### 10 Ejemplo 4

#### *Análisis a lo largo del tiempo y persistencia del silenciamiento del ARNsi*

Se midió el transcurso del tiempo del silenciamiento del ARNm, y el análisis Northern de las células recogidas 4, 15 8, 24 y 48 horas después del comienzo de la transfección presentaba el silenciamiento máximo del ARNsi después de 24 horas (Fig. 5a). Parecía existir una diferencia en la cantidad de disminución aparente, ya que hTF167i redujo el nivel ARNm más que hTF173i en cada punto de tiempo. Se realizaron observaciones similares para las versiones modificadas de hTF167i, en las que las mutaciones inducidas (M1 y M2) produjeron actividad inhibidora reducida. Las mutaciones en la cadena complementaria tuvieron un efecto más pronunciado que las correspondientes mutaciones 20 en la cadena transcripta. El hecho de que la degradación diana inducida por el ARNsi fuera incompleta (un nivel de aproximadamente el 10% del ARNm diana permaneció aún con los ARNsi más eficaces) puede ser debido a la presencia de una fracción de ARNm en un compartimiento protegido, por ejemplo en los complejos de corte y empalme o en otras posiciones nucleares. Sin embargo, a la vista de los datos anteriores y de los datos de experimentos de competencia, una posibilidad más probable puede ser un equilibrio determinado cinéticamente entre la transcripción 25 y degradación, siendo esta última un proceso que emplea mucho tiempo.

Los experimentos en plantas (11) y nemátodos (12, 13) han sugerido la existencia de un sistema mediante el cual determinados genes de ARNsi están implicados en la cualidad de ser heredable de los fenotipos inducidos. Para investigar la existencia de dichos propagadores en las estirpes celulares de mamífero, se midió la persistencia del 30 silenciamiento del ARNsi en las células HaCaT transfectadas a muy baja densidad celular. En un experimento basado en la transfección en serie de montajes indicadores había una recuperación gradual de la expresión entre los días 3 y 5 después de la transfección, y la dependencia del tiempo del efecto del ARNsi sobre el ARNm del FT endógeno era similar (Fig. 5b). El nivel del ARNm del FT en las células de referencia pseudotransfectadas disminuyó gradualmente durante el experimento, en el que parecía existir regulación por disminución de la expresión en función de la expansión 35 celular. De manera interesante, la actividad procoagulante mostraba poca indicación de la recuperación para los niveles de referencia en las células transfectadas (Fig. 5b, columnas). Se realizaron observaciones similares con hTF372i y con una combinación de hTF167i, hTF372i y hTF562i (datos no representados).

### 40 Ejemplo 5

#### *Análisis del efecto de introducción de mutaciones de apareamiento de bases en las secuencias del ARNsi*

Como se mencionó anteriormente, el presente ARNsi se cartografió de manera más sistemática para determinar 45 si las mutaciones eran igualmente toleradas en todo el ARNsi. Un total de 8 nuevos ARNsi con un solo mutante diferentes se diseñaron y se nombraron según la posición (partiendo del 5' de la cadena transcripta) de la mutación (s1, s2, s3, s4, s7, s11, s13, s16, es decir las SEC. ID. nº 9 a nº 17). El único mutante M1 central descrito anteriormente (Ejemplo 4) se incluyó en este análisis y se volvió a denominar s10. En todos los ARNsi se analizó la hibridación productiva por PAGE desnaturalizante (15%).

50 En los diversos ARNsi mutantes se analizó la disminución del ARNm del FT endógeno en células HaCaT, 24h después de la transfección mediada por LIPOFECTAMINE2000, como se describió anteriormente. Un resumen de los datos se representa en la Figura 7. El ARNsi natural, y el mutante s10, se incluían como referencias positivas, ARNm de FT reducido a aproximadamente los niveles residuales del 10% y 20%, como cabía esperar y se indicó anteriormente. Las actividades de los demás mutantes están comprendidas en tres grupos diferentes dependiendo de su posición a lo largo del ARNsi. Las mutaciones en el extremo 5' del ARNsi (s1-s3) eran muy bien toleradas, presentando esencialmente la misma actividad que el tipo natural. Las mutaciones localizadas además en, hasta el punto medio aproximado del ARNsi (s4, s7, s10 y s11), estaban ligeramente afectadas en su actividad, dando como resultado la disminución del ARNm a niveles residuales del 25 al 30%. Ambas mutaciones en la mitad 3' del ARNsi, sin embargo, presentaban actividad gravemente afectada. Esto sugirió a los inventores un sesgo en la tolerancia para las mutaciones en el ARNsi. Se analizaron también las actividades de varios mutantes dobles, en las que la posición central (s10) estaba mutada juntamente con una posición adicional (s7, s11, s13 y s16). El sesgo en la tolerancia a la mutación fue también evidente para estos mutantes dobles, ya que el orden de magnitud de su actividad reflejaba el de la actividad de los mutantes individuales de la posición de la variante. Esta observación refuerza la proposición de que 55 la actividad diferencial de los mutantes es debida a un sesgo intrínseco en la tolerancia para las incompatibilidades diana a lo largo de la secuencia del ARNsi. La razón de dicho sesgo puede estar ligada a la existencia propuesta de una zona gobernadora en el ARNsi que es utilizada principalmente por el complejo RISC para "medir por exceso" el ARNm diana para su división (15).

## Ejemplo 6

*Efectos de la modificación química de las secuencias del ARNsi*

Una serie de ARNsi con una modificación en cada uno de los extremos 5' y 3' de las cadenas del ARNsi (P1+1, M1+1, A1+1, es decir SEC. ID. nº 22, nº 26 y nº 30, respectivamente) se sintetizó inicialmente. El extremo 5' de los ARNsi sintetizado químicamente puede ser más sensible a la modificación ya que ha de fosforilarse *in vivo* para ser activo (24). Se incluyeron asimismo por lo tanto los ARNsi con dos modificaciones solamente en las prolongaciones del apareamiento 3' sin base (ARNsi P0+2, M0+2 y A0+2, es decir las SEC. ID. nº 23, nº 27 y nº 31, respectivamente, véase la Figura 6), cuya tolerancia a varios tipos de modificaciones resultaba conocida (10, 15, 25). El análisis Northern de las células HaCaT transfectadas demostró esencialmente actividad no disminuida de todos los ARNsi modificados, con excepción del ARNsi con alilación en ambos extremos (Figura 8). La modificación con alilo únicamente en el extremo 3' no presentaba ningún efecto sobre la actividad. La presencia de un gran sustituyente en el 2'-hidroxilo del nucleótido del terminal 5' podría interferir con la propia fosforilación del ARNsi que Nykänen *et al.* (24) demostró que era necesaria.

Se requería a continuación conocer si algunas de estas modificaciones eran suficientes para aumentar la persistencia del silenciamiento mediado por ARNsi. El ARNm de FT endógeno se recupera gradualmente 3 a 5 días después de la transfección con hTF167 que se dirige al ARNsi natural. Transfectando células HaCaT con ARNsi activo y modificado químicamente en paralelo, no se pudo demostrar ninguna diferencia significativa en las actividades de silenciamiento 3 y 5 días después de la transfección (datos no representados). Las modificaciones moderadas que se han introducido, si bien presentando actividad inicial completa, no eran hasta ahora claramente suficientes para estabilizar sustancialmente los ARNsi *in vivo*.

Con la actividad del ARNsi todavía intacta después de las modificaciones moderadas iniciales en el contexto de la presente invención, el grado de modificaciones se amplió para incluir dos en ambas caras o dos en el extremo 5' en combinación con cuatro en el extremo 3'. Debido a los resultados menos prometedores con las versiones aliladas de la primera serie, y el coste más elevado asociado a estas modificaciones, los inventores decidieron limitarse a las modificaciones del fosforotioato y a las metilaciones para las series siguientes. En el nuevo conjunto de ARNsi se analizó asimismo la actividad inicial 24 h después de la transfección en células HaCaT. Los niveles de expresión normalizada en las células transfectadas con los ARNsi modificados se elevaron ligeramente, a niveles residuales del 16 al 18% en comparación con el 11% en las células transfectadas con el tipo natural. El ARNsi fosforotioado más extensamente demostró ser tóxico para las células, dando como resultado aproximadamente 70% de muerte celular en comparación con las células pseudotransfectadas (medido como el nivel de expresión del GAPDH del ARNm de referencia). Debido a estas complicaciones, esta especie de ARNsi no se incluyó en análisis posteriores. En las especies de ARNsi restante se evaluó el aumento de persistencia del silenciamiento analizando la expresión del ARNm del FT 5 días después de una transfección única del ARNsi 100 nM. En este punto, la expresión de FT en las células transfectadas con el ARNsi natural se había recuperado casi completamente (80% de expresión residual en comparación con las células pseudotransfectadas) (Figura 9a). En las células transfectadas con el ARNsi modificado más extensamente (M2+4; SEC. ID. nº 29), sin embargo, resultaba todavía evidente el potente silenciamiento (32% de expresión residual). Las especies de ARNsi muy modificadas (P2+2, M2+2; SEC. ID. nº 24 y SEC. ID. nº 28 respectivamente), aunque menos eficaz que Me2+4, resultó consistentemente en la expresión de FT menos 5 días después de la transfección (55 a 60%) que el tipo natural. Los experimentos a lo largo del tiempo demostraron que el ARNsi natural era todavía el más eficaz 3 días después de la transfección, cuando el silenciamiento estaba relativamente inalterado, pero este silenciamiento disminuye a una velocidad muy superior posteriormente (Figura 9b).

## Referencias

1. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366 (2001).
2. Camerer E, Kolsto AB, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res.* 81, 1-41 (1996).
3. Clemens, J. C. *et al.* Use of double-stranded RNA interference in Drosophila cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 6499-6503 (2000).
4. Amarzguioui M, Brede G, Babaie E, Grotli M, Sproat B, Prydz H. Secondary structure prediction and *in vitro* accessibility of mRNA as tools in the selection of target sites for ribozymes. *Nucleic Acids Res.* 28, 4113-4124 (2000).
5. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293, 834-838 (2001).
6. Wiiger MT, Pringle S, Pettersen KS, Narahara N, Prydz H. Effects of binding of ligand (FVIIa) to induced tissue factor in human endothelial cells. *Thromb Res.* 98, 311-321 (2000).

## ES 2 336 440 T3

7. Camerer E, Pringle S, Skartlien AH, Wiiger M, Prydz K, Kolsto AB, Prydz H. Opposite sorting of tissue factor in human umbilical vein endothelial cells and Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Blood*. 88, 1339-1349 (1996).
- 5 8. Caplen, N. J., Fleenor, J., Fire, A. & Morgan, R. A. dsRNA-mediated gene silencing in cultured Drosophila cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. *Gene* 252, 95-105 (2000).
- 10 9. Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes Dev.* 13, 3191-3197 (1999).
- 10 10. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498 (2001).
- 15 11. Palauqui JC, Balzergue S. Activation of systemic acquired silencing by localised introduction of DNA. *Curr Biol.* 9, 59-66 (1999).
- 15 12. Fire, A. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* 15, 358-363 (1999).
- 20 13. Grishok A, Tabara H, Mello CC. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science* 287, 2494-2497 (2000).
- 20 14. Boutla, A., Delidakis, C., Livadaras, L, Tsagris, M. y Tabler, M. (2001) Short 5'-phosphorylated double-stranded RNAs induce RNA interference in Drosophila. *Curr. Biol.*, 11:1776-1780.
- 25 15. Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. y Tuschl, T. (2001) Functional anatomy of siRNAs for mediating effiecient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.*, 20:6877-6888.
- 30 16. Jacque, J.M., Triques, K., Stevenson, M. (2002) Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature*, 418: 435-438.
- 30 17. Gitlin, L., Karelsky, S., Andino, R. (2002) Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*, 418:430-434.
- 35 18. Klahre, U., Crete, P., Leuenberger, S.A., Iglesias, V.A., Meins, F. Jr. (2002) High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99: 11981-11986.
- 40 19. Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Cote, M., Rich, R.L., Myszka, D.G., Sundquist, W.I. (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*, 107:55-65.
- 45 20. Yu, J.Y., DeRuiter, S.L., Turner, D.L. (2002). RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:6047-52.
- 45 21. Wilda, M., Fuchs, U., Wossmann, W., Borkhardt, A. (2002). Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene*, 21:5716-24.
- 50 22. Brummelkamp, T.R., Bernards, R., Agami, R. (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 296:550-3.
- 50 23. Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J., Conklin, D.S. (2002) Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.*, 16:948-58.
- 55 24. Nykänen, A., Haley, B. y Zamore, P.D. (2001) ATP Requirements and Small Interfering RNA Structure in the RNA Interference Pathway. *Cell*, 107:309-321.
- 55 25. Elbashir, S.M., Lendeckel, W. y Tuschl, T. (2001) RNA interference is mediated by 21 and 22 nt RNAs. *Genes Dev.*, 15:188-200.
- 60 26. Janowsky, E., y Schwenzer, B. (1998), Oligonucleotide facilitators enable a hammerhead ribozyme to cleave long RNA substrates with multiple-turnover activity. *Eur. J. Biochem.*, 254, 129-134.
- 65 27. Billy, E. et al. (2001), Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:25, 14428-33.
28. Caplen, N.J. et al. (2001), Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:17, 9742-47.

# ES 2 336 440 T3

29. **Holen, T.** *et al.* (2002), Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor, *Nucleic Acid Res.*, 30, 1757-1766.
- 5 30. **Tuschl, T.** and **Borkhardt, A.** (2002), Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analyses of gene function and gene therapy, *Mol. Interv.*, 2, 158-167.
31. **Harborth** *et al.* (2001), Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs, *J. Cell Science*, 114, 4557-4565.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 336 440 T3

## REIVINDICACIONES

5 1. Molécula de ARN corto de interferencia (ARNsi), **caracterizada** porque comprende por lo menos 19 nucleótidos dirigida hacia un factor tisular (FT) que codifica la secuencia de ácido nucleico o fragmentos de la misma, y en la que la molécula de ARNsi comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de entre el grupo constituido por

10 hTF167

5' g-c-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-a-t-t  
t-t-c-g-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-u-u 5';

15 hTF372

5' g-a-a-g-c-a-g-a-c-g-u-a-c-u-u-g-g-c-a-t-t  
t-t-c-u-u-c-g-u-c-u-g-c-a-u-g-a-a-c-c-g-u 5';

20 hTF562

5' c-g-g-a-c-u-u-u-a-g-u-c-a-g-a-a-g-g-a-t-t  
t-t-g-c-c-u-g-a-a-a-u-c-a-g-u-c-u-u-c-c-u 5';

hTF256

5' c-c-c-g-u-c-a-a-u-c-a-a-g-u-c-u-a-c-a-t-t  
t-t-g-g-c-a-g-u-u-a-g-u-u-c-a-g-a-u-g-u 5';

35 hTF164

5' c-c-g-g-c-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-t-t  
t-t-g-g-c-c-g-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g 5';

40 hTF170

5' c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-u-a-c-t-t  
t-t-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-u-u-a-u-g 5';

hTF173

5' c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-u-a-c-u-g-u-t-t  
t-t-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-u-u-a-u-g-a-c-a 5';

55 hTF167-s2

5' g-g-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-u-a  
g-c-c-c-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-u-u 5';

60 hTF167-s3

5' g-c-c-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-u-a  
g-c-c-g-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-u-u 5'.

## ES 2 336 440 T3

2. Molécula de ARN (ARNsi) según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicha molécula es bicatenaria.

3. Molécula de ARN (ARNsi) según las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizada** porque dicha molécula es de 21 a 25 nucleótidos de longitud, preferentemente de 21 nucleótidos de longitud.

5

4. Molécula de ARN (ARNsi) según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque dicha molécula está constituida por una de las secuencias seleccionadas de entre el grupo constituido por

10

hTF167

15

5' g-c-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-a-t-t  
t-t-c-g-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-u-u 5';

hTF372

20

5' g-a-a-g-c-a-g-a-c-g-u-a-c-u-u-g-g-c-a-t-t  
t-t-c-u-u-c-g-u-c-u-g-c-a-u-g-a-a-c-c-g-u 5';

25

hTF562

30

5' c-g-g-a-c-u-u-u-a-g-u-c-a-g-a-a-g-g-a-t-t  
t-t-g-c-c-u-g-a-a-u-c-a-g-u-c-u-u-c-c-u 5';

hTF256

35

5' c-c-c-g-u-c-a-a-u-c-a-a-g-u-c-u-a-c-a-t-t  
t-t-g-g-g-c-a-g-u-u-a-g-u-u-c-a-g-a-u-g-u 5';

40

hTF164

5' c-c-g-g-c-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-t-t  
t-t-g-g-c-c-g-c-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g 5';

45

hTF170

50

5' c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-u-a-c-t-t  
t-t-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-u-u-a-u-g 5';

55

hTF173

5' c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-u-a-c-u-g-u-t-t  
t-t-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-u-u-a-u-g-a-c-a 5'.

60

65

# ES 2 336 440 T3

5. Molécula de ARN (ARNsi) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque se introducen una o más mutaciones en relación con la secuencia natural en la que dicha molécula está constituida por la secuencia

5 hTF167-s2

10  
5' g-g-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-a-u-a  
g-c-c-c-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-u-u 5'; o

hTF167-s3

15  
5' g-c-c-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-a-u-a  
g-c-c-g-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-u-u 5'.

20 6. Molécula de ARN (ARNsi) según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicha molécula de ARNsi se modifica sustituyendo el enlace fosfodiéster con un enlace tiofosfodiéster.

7. Molécula de ARN (ARNsi) según la reivindicación 6, **caracterizada** porque dicha molécula de ARNsi se selecciona de entre el grupo constituido por

25

hTF167-P1+1

30  
5' g\*c-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-a-u\*a  
g\*c-c-g-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-u\*u 5'

hTF167-P0+2

35  
5' g-c-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-a\*u\*a  
g\*c\*c-g-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-u-u 5'

hTF167-P2+2

40  
5' g\*c\*g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-a\*u\*a  
g\*c\*c-g-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u\*u\*u 5'

hTF167-P2+4

45

5' g\*c\*g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a\*a\*a\*u\*a  
g\*c\*c\*g\*c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u\*u\*u 5'.

50 en las que el asterisco indica los nucleótidos unidos por enlaces fosforotioato.

8. Molécula de ARN (ARNsi) según la reivindicación 7, **caracterizada** porque dicha molécula es

55

hTF167-P2+2

5' g\*c\*g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-a\*u\*a  
g\*c\*c-g-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u\*u\*u 5',

60

en la que el asterisco indica los nucleótidos unidos por enlaces fosforotioato.

65

9. Molécula de ARN (ARNsi) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque dicha molécula está modificada por la introducción de un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> o alquililo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> en uno o más de entre los grupos hidroxilo 2' OH en la secuencia.

# ES 2 336 440 T3

10. Molécula de ARN (ARNsi) según la reivindicación 9, **caracterizada** porque dicha molécula se selecciona de entre el grupo constituido por

5

hTF167-M1+1

10  
5' **G-c-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-a-u-A**  
**G-c-c-g-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-u-U** 5'

10

hTF167-M0+2

15  
5' **g-c-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-a-U-A**  
**G-C-c-g-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-u-U** 5'

15

hTF167-M2+2

20  
5' **G-C-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-a-U-A**  
**G-C-c-g-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-U-U** 5'

20

hTF167-M2+4

25  
5' **G-C-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-a-U-A**  
**G-C-C-G-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-U-U** 5'

25

hTF167-A1+1

30

5' **G-c-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-a-u-A**  
**G-c-c-g-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-u-U** 5'

35

hTF167-A0+2

40

5' **g-c-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-a-U-A**  
**G-C-c-g-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-u-U**, 5'

45 en la que una letra mayúscula en negrita indica que el nucleótido está metilado en 2-O y en la que una letra mayúscula en negrita subrayada indica que el nucleótido está alilado en 2-O.

45

11. Molécula de ARN (ARNsi) según la reivindicación 10, **caracterizada** porque dicha molécula está constituida por la secuencia

50

hTF167-M2+2

55

5' **G-C-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-a-U-A**  
**G-C-c-g-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-U-U** 5' o

hTF167-M2+4

60

5' **G-C-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-a-U-A**  
**G-C-C-G-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-U-U**, 5'

60

65 en la que una letra mayúscula en negrita indica que el nucleótido está metilado en 2-O.

# ES 2 336 440 T3

12. Molécula de ARN (ARNsi) según la reivindicación 10, **caracterizada** porque dicha molécula está constituida por la secuencia

5 hTF167-M2+4

5' **G-C-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-A-A-U-A**  
**G-C-C-G-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-U-U** 5',

10 en la que una letra mayúscula en negrita indica que el nucleótido está metilado en 2-O.

13. Molécula de ARN (ARNsi) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizada** porque el FT o  
15 fragmento del mismo es de origen vertebrado, preferentemente de origen mamífero, más preferentemente de origen humano.

14. Preparación farmacéutica, **caracterizada** porque comprende una o más de las moléculas de ARN corto de  
interferencia (ARNsi) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

20 15. Preparación farmacéutica según la reivindicación 14, **caracterizada** porque comprende la secuencia

25 hTF167

5' g-c-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-a-t-t  
t-t-c-g-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-u-u 5';

30 O

hTF372

35 5' g-a-a-g-c-a-g-a-c-g-u-a-c-u-u-g-g-c-a-t-t  
t-t-c-u-u-c-g-u-c-u-g-c-a-u-g-a-a-c-c-g-u 5'.

40 16. Preparación farmacéutica según la reivindicación 14, **caracterizada** porque comprende la secuencia

hTF167-s2

45 5' g-g-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-a-u-a  
g-c-c-c-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-u-u 5';

50 O  
hTF167-s3

55 5' g-c-c-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-a-u-a  
g-c-c-g-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-u-u 5'.

60 17. Preparación farmacéutica según la reivindicación 14, **caracterizada** porque dichas moléculas se seleccionan  
de entre el grupo constituido por:

hTF167-P2+2

65 5' g\*c\*g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-a\*u\*a  
g\*c\*c-g-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u\*u\*u 5';

ES 2 336 440 T3

hTF167-M2+2

5' **G-C-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-a-a-U-A**  
**G-C-c-g-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-U-U** 5';

5

O

hTF167-M2+4

10

5' **G-C-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-A-A-U-A**  
**G-C-C-G-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-U-U** 5',

15 en la que el asterisco indica los nucleótidos unidos por enlaces fosforotioato y en la que una letra mayúscula en negrita indica que el nucleótido está metilado en 2-O.

18. Preparación farmacéutica según la reivindicación 17, en la que la molécula de ARN es una molécula de ARN  
20 aislada que comprende la secuencia

hTF167-M2+4

25 5' **G-C-g-c-u-u-c-a-g-g-c-a-c-u-a-c-a-A-A-U-A**  
**G-C-C-G-c-g-a-a-g-u-c-c-g-u-g-a-u-g-u-U-U** 5',

en la que una letra mayúscula en negrita indica que el nucleótido está metilado en 2-O.

30 19. Preparación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, **caracterizada** porque comprende  
además diluyentes, lubricantes, aglutinantes, portadores, medios de disgregación, medios de absorción, colorantes,  
edulcorantes y/o saborizantes.

35 20. Preparación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, **caracterizada** porque comprende  
adyuvantes.

40 21. Preparación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, adecuada para ser administrada por  
vía parenteral, preferentemente por inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraperitoneal, por  
vía oral, nasal, bucal, rectal, vaginal y/o por inhalación o insuflado.

45 22. Preparación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21, **caracterizado** porque se formula  
como suspensiones o soluciones de infusión, un aerosol, cápsulas, comprimidos, píldoras, atomizadores, supositorios,  
en formulaciones de dosificación que contienen portadores, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables  
no tóxicos convencionales.

50 23. Utilización de una o más de las moléculas de ARN (ARNsi) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para  
preparar una preparación farmacéutica adecuada para el tratamiento, la prevención y/o la inhibición de la coagulación  
de la sangre indeseada.

55 24. Utilización según la reivindicación 23, en la que dicha preparación se formula para administración parenteral,  
preferentemente por inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraperitoneal, por vía oral, nasal,  
bucal, rectal, vaginal y/o por inhalación o insuflado.

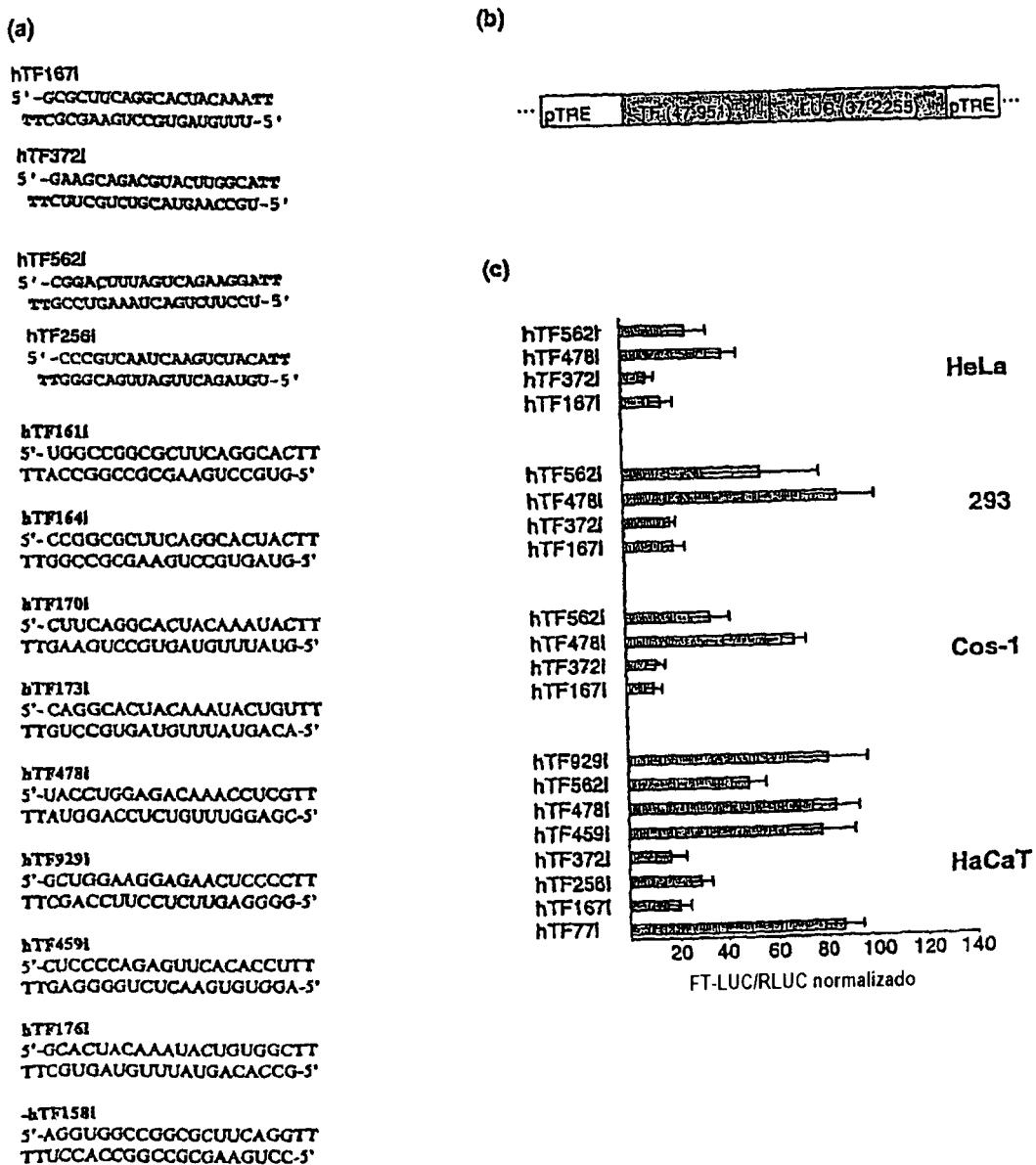
55

60

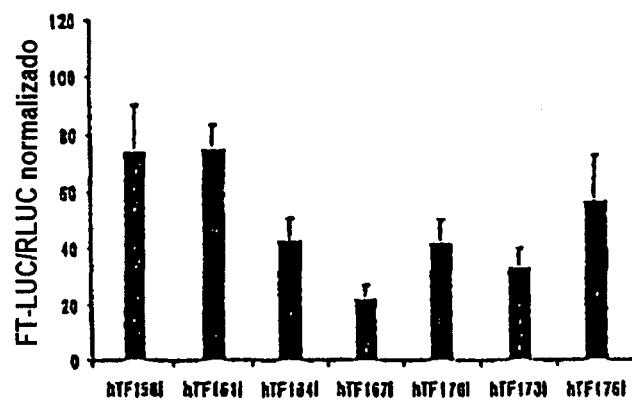
65

# ES 2 336 440 T3

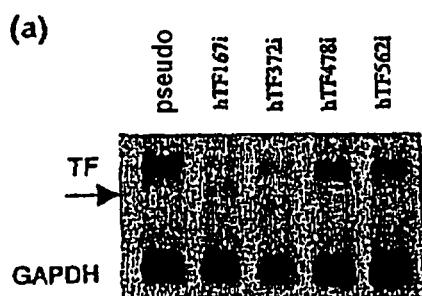
**Fig. 1**



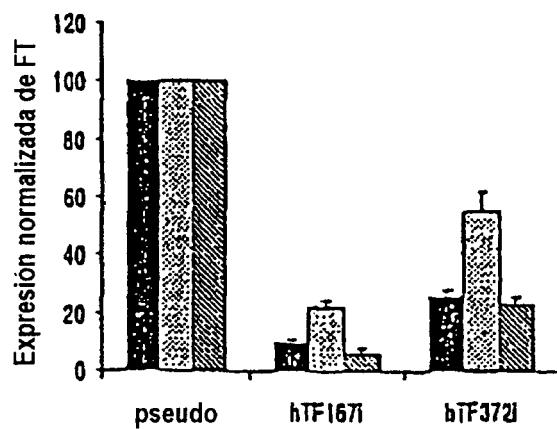
**Fig. 2**



**Fig. 3**

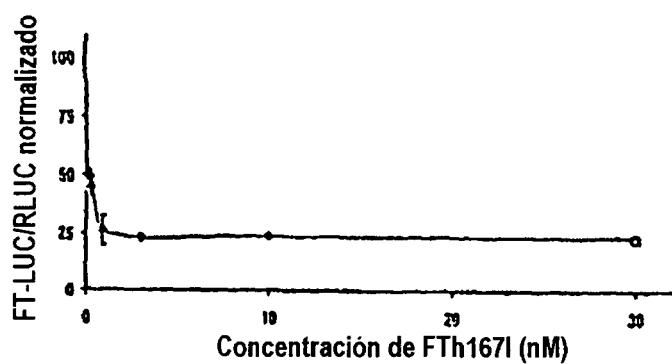


(b)



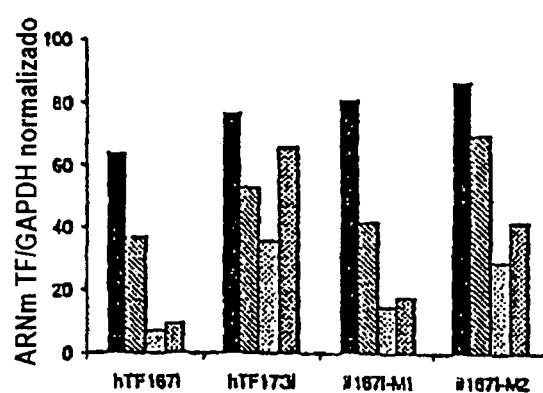
ES 2 336 440 T3

**Fig. 4**

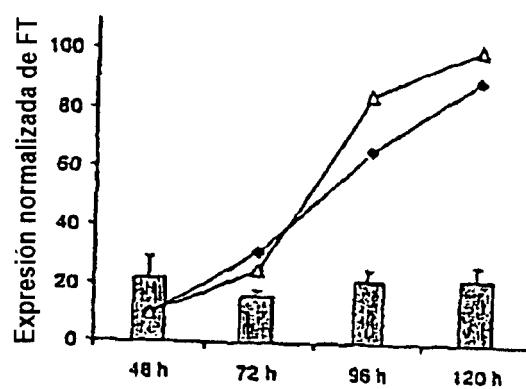


**Fig. 5**

(a)



(b)

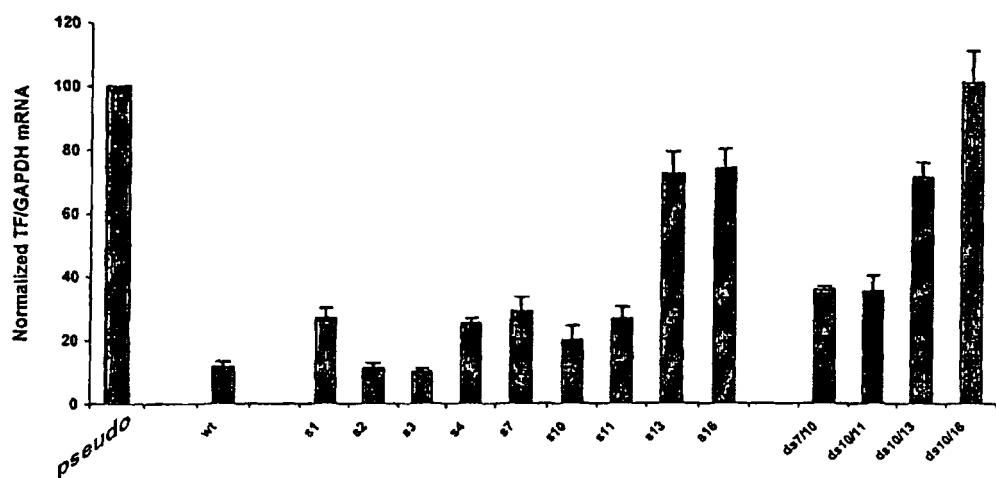


# ES 2 336 440 T3

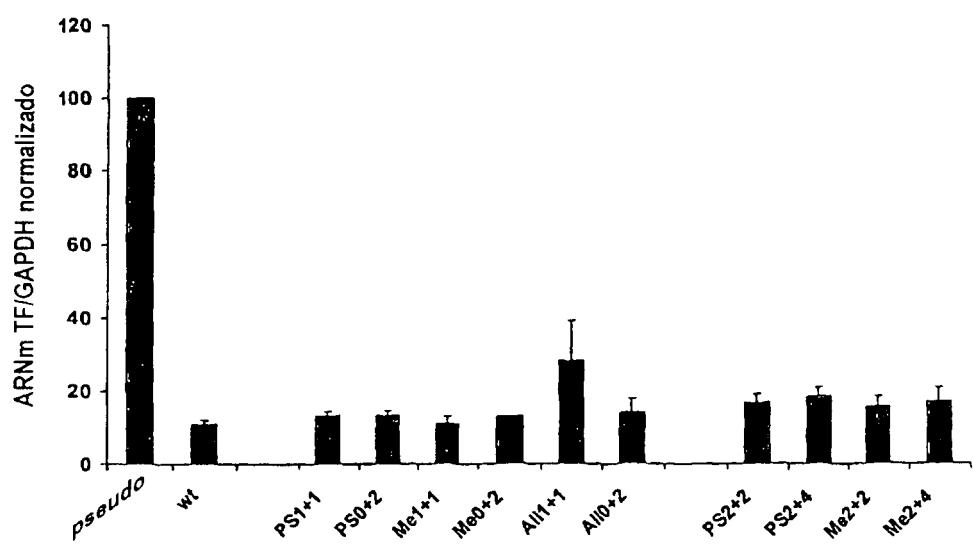
**Fig. 6**

hTF167-RO	5'-GCGCUUCAGGCACUACAAAUA-3' 3'-CGGGCGAAGUCCGUGAUGUUU-5'	P1+1	5'-GCGCUUCAGGCACUACAAAUA-3' 3'-CGGGCGAAGUCCGUGAUGUUU-5'
s1	5'-CCGCUUCAGGCACUACAAAUA-3' 3'-CGGGCGAAGUCCGUGAUGUUU-5'	P0+2	5'-GCGCUUCAGGCACUACAAAUA-3' 3'-CGGGCGAAGUCCGUGAUGUUU-5'
s2	5'-GGGCUUCAGGCACUACAAAUA-3' 3'-GCCCGGAAGUCCGUGAUGUUU-5'	M1+1	5'-GCGCUUCAGGCACUACAAAUA-3' 3'-GCGGCAGAUCCGUGAUGUUU-5'
s3	5'-GCCUUUCAGGCACUACAAAUA-3' 3'-GCCGGGAAGUCCGUGAUGUUU-5'	M0+2	5'-GCGCUUCAGGCACUACAAAUA-3' 3'-GCGGCAGAUCCGUGAUGUUU-5'
s4	5'-GCGGUUCAGGCACUACAAAUA-3' 3'-GCCGCCAAGUCCGUGAUGUUU-5'	A1+1	5'-GCGCUUCAGGCACUACAAAUA-3' 3'-GCGGCAGAUCCGUGAUGUUU-5'
s7	5'-GCGCUUUGAGGCACUACAAAUA-3' 3'-GCGCGAACUCCGUGAUGUUU-5'	A0+2	5'-GCGCUUCAGGCACUACAAAUA-3' 3'-GCGGCAGAUCCGUGAUGUUU-5'
s9	5'-GCGCUUCACGCACUACAAAUA-3' 3'-GCCGCGAAGUGCGUGAUGUUU-5'	P2+2	5'-GCGCUUCAGGCACUACAAAUA-3' 3'-GCGGCAGAUCCGUGAUGUUU-5'
s10	5'-GCGCUUUCAGGCACUACAAAUA-3' 3'-GCCGCGAAGUCCGUGAUGUUU-5'	P2+4	5'-GCGCUUUCAGGCACUACAAAUA-3' 3'-GCGGCAGAUCCGUGAUGUUU-5'
s11	5'-GCGCUUUCAGGCACUACAAAUA-3' 3'-GCCGCGAAGUCCGUGAUGUUU-5'	M2+2	5'-GCGCUUUCAGGCACUACAAAUA-3' 3'-GCGGCAGAUCCGUGAUGUUU-5'
s13	5'-GCGCUUUCAGGCAGUACAAAUA-3' 3'-GCCGCGAAGUCCGUGAUGUUU-5'	M2+4	5'-GCGCUUUCAGGCACUACAAAUA-3' 3'-GCGGCAGAUCCGUGAUGUUU-5'
s16	5'-GCGCUUUCAGGCACUAGAAAUA-3' 3'-GCCGCGAAGUCCGUGAUCUUU-5'		
ds1	5'-GCGCUUUGAGCCACUACAAAUA-3' 3'-GCCGGGAACUCCGUGAUGUUU-5'		
dsM2	5'-GCGCUUUCAGCGACUACAAAUA-3' 3'-GCCGGGAAGUCCGUGAUGUUU-5'		
ds2	5'-GCGCUUUCAGCCAGUACAAAUA-3' 3'-GCCGCGAAGUCCGUGAUGUUU-5'		
ds3	5'-GCGCUUUCAGCCACUAGAAAUA-3' 3'-GCCGCGAAGUCCGUGAUCUUU-5'		

**Fig. 7.** Actividad de mutantes contra ARNm de FT endógeno

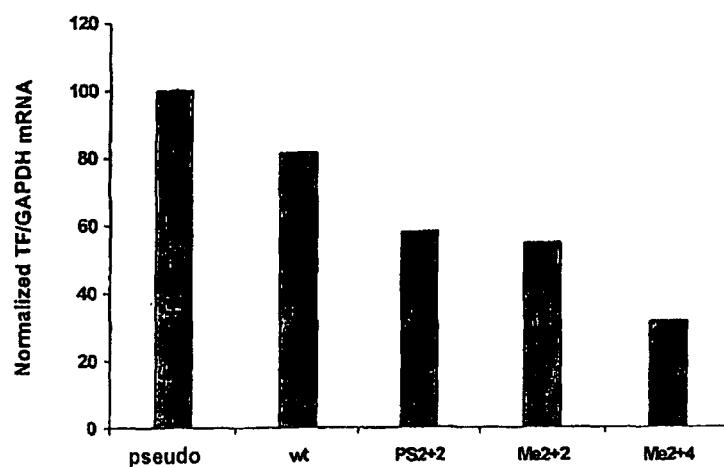


**Fig. 8.** Actividad de ARNsi químicamente modificado contra ARNm de FT endógeno

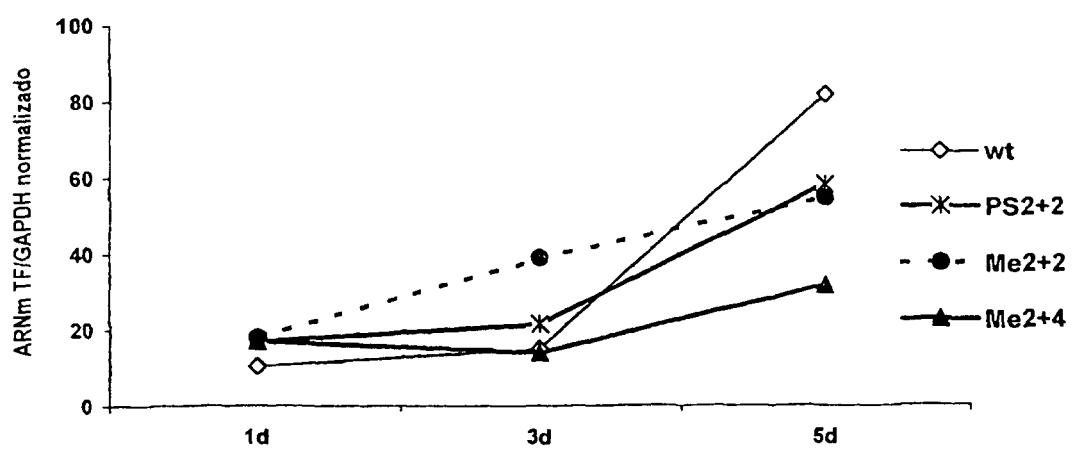


# ES 2 336 440 T3

**Fig. 9a.** Expresión específica de FT 5 días después de la transfección de ARNsi 100 nM



**Fig. 9b.** Transcurso del silenciamiento del ARNm del FT por varios ARNsi del FT modificados químicamente



# ES 2 336 440 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Hans Prydz

5 <120> Silenciamiento postranscripcional mediante ARN de interferencia cortos

<130> 114577/KHS

10 <150> NO 2002 0612

<151> 2002-02-07

<160> 31

15

<210> 1

<211> 21

<212> ARN

20

<213> ADN de factor tisular humano

<223> ARNsi

25 <400> 1

gc gcu uca ggc acu aca aa tt

30 <210> 2

<211> 21

<212> ARN

35

<213> ADN de factor tisular humano

<223> ARNsi

40 <400> 2

g aag cag acg uac uug gca tt

45 <210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> ADN de factor tisular humano

50

<223> ARNsi

<400> 3

55

cgg acu uua guc aga agg a tt

<210> 4

<211> 21

60

<212> ARN

<213> ADN de factor tisular humano

65

<223> ARNsi

# ES 2 336 440 T3

<400> 4

ccc guc aau caa guc uac a tt

5 <210> 5  
<211> 21

<212> ARN

10 <213> ADN de factor tisular humano

<223> ARNsi

15 <400> 5

ug gcc ggc gcu uca ggc ac tt

20 <210> 6  
<211> 21  
<212> ARN  
<213> ADN de factor tisular humano

25 <223> ARNsi

<400> 6

30 cc ggc gcu uca ggc acu ac tt

<210> 7  
35 <211> 21  
<212> ARN  
<213> ADN de factor tisular humano

40 <223> ARNsi

<400> 7

45 cu uca ggc acu aca aau ac tt

<210> 8  
<211> 21  
50 <212> ARN  
<213> ADN de factor tisular humano

<223> ARNsi

55 <400> 8

ca ggc acu aca aau acu gu tt

60 <210> 9  
<211> 21  
<212> ARN  
65 <213> sintético

<220>

## ES 2 336 440 T3

<221> misc-diferencia  
<223> ARNsi, comprende una mutación de apareamiento de bases comparado con la secuencia de ARNsi natural

5    <400> 9  
      cc gcu uca ggc acu aca aa a

10   <210> 10  
    <211> 21  
    <212> ARN  
    <213> ADN de factor tisular humano

15   <223> ARNsi  
      <210> 10  
20   <211> 21  
    <212> ARN  
    <213> sintético

25   <220>  
    <221> misc-diferencia  
    <223> ARNsi, comprende una mutación de apareamiento de bases comparado con la secuencia de ARNsi natural

30   <400> 10  
      gg gcu uca ggc acu aca aa a

35   <210> 11  
    <211> 21  
    <212> ADN  
    <213> sintético

40   <220>  
    <221> misc-diferencia  
    <223> ARNsi, comprende una mutación de apareamiento de bases comparado con la secuencia de ARNsi natural

45   <400> 11  
      gc ccu uca ggc acu aca aa a

50   <210> 12  
    <211> 21  
55   <212> ARN  
    <213> sintético  
      <220>  
60   <221> misc-diferencia  
    <223> ARNsi, comprende una mutación de apareamiento de bases comparado con la secuencia de ARNsi natural  
      <400> 12  
65   <400> 12  
      gc ggu uca ggc acu aca aa a

# ES 2 336 440 T3

<210> 13  
<211> 21  
<212> ARN  
5 <213> sintético  
  
10 <220> misc-diferencia  
<223> ARNSi, comprende una mutación de apareamiento de bases comparado con la secuencia de ARNSi natural  
<400> 13  
  
15 gc gcu uga ggc acu aca aa a  
  
19 <210> 14  
<211> 21  
<212> ARN  
20 <213> sintético  
  
25 <220>  
<221> misc-diferencia  
<223> ARNSi, comprende una mutación de apareamiento de bases comparado con la secuencia de ARNSi natural  
<400> 14  
  
30 gc gcu uca gcc acu aca aa a  
  
35 <210> 15  
<211> 21  
<212> ARN  
<213> sintético  
  
40 <220>  
<221> misc-diferencia  
<223> ARNSi, comprende una mutación de apareamiento de bases comparado con la secuencia de ARNSi natural  
<400> 15  
  
45 gc gcu uca ggg acu aca aa a  
  
50 <210> 16  
<211> 21  
<212> ARN  
<213> sintético  
  
55 <220>  
<221> misc-diferencia  
<223> ARNSi, comprende una mutación de apareamiento de bases comparado con la secuencia de ARNSi natural  
60 <400> 16  
  
65 gc gcu uca ggc agu aca aa a  
<210> 17  
<211> 21

## ES 2 336 440 T3

<212> ARN  
<213> sintético

5    <220>  
    <221> misc-diferencia  
    <223> ARNsi, comprende una mutación de apareamiento de bases comparado con la secuencia de ARNsi natural

10   <400> 17  
  
         gc gcu uca ggc acu aga aaau a

15   <210> 18  
    <211> 21  
    <212> ARN  
    <213> sintético

20  
    <220>  
    <221> misc-diferencia  
    <223> ARNsi, comprende dos mutaciones de apareamiento de bases comparado con la secuencia de ARNsi natural

25  
    <400> 18  
  
         gc gcu uga gcc acu aca aaau a

30  
    <210> 19  
    <211> 21  
    <212> ARN  
35    <213> sintético  
  
    <220>  
    <221> misc-diferencia  
    <223> ARNsi, comprende dos mutaciones de apareamiento de bases comparado con la secuencia de ARNsi natural

40  
    <400> 19  
  
        gc gcu uca gcg acu aca aaau a

45  
    <210> 20  
    <211> 21  
50    <212> ARN  
    <213> sintético  
  
    <220>  
    <221> misc-diferencia  
    <223> ARNsi, comprende dos mutaciones de apareamiento de bases comparado con la secuencia de ARNsi natural

55  
    <400> 20  
  
         gc gcu uca gcc agu aca aaau a

60  
    <210> 21  
    <211> 21  
65    <212> ARN

# ES 2 336 440 T3

<213> sintético

<220>

5 <221> misc-diferencia

<223> ARNsi, comprende dos mutaciones de apareamiento de bases comparado con la secuencia de ARNsi natural

<400> 21

10 gc gcu uca gcc acu aga aa u a

<210> 22

15 <211> 21

<212> ARN

<213> sintético

20 <200>

<221> base modificada

<223> ARNsi, los primer y penúltimo nucleótidos y el último nucleótido en las direcciones 5'-3' y 3'-5' están unidos mediante enlaces fosforotioato.

25 <400> 22

*5'-g\*c-gcuucaggcacuaca-a-a-u\*a-3'  
3'-g\*c-c-g-cgaaguccgugaug-u\*u-5'*

30 <210> 23

<211> 21

<212> ARN

35 <213> sintético

<200>

<221> base modificada

40 <223> ARNsi, los tres últimos nucleótidos en la dirección 5'-3' y los primeros tres nucleótidos en la dirección 3'-5' están unidos mediante enlaces fosforotioato.

<400> 23

45       *5'-g-c-gcuucaggcacuaca-a-a\*u\*a-3'  
3'-g\*c\*c-g-cgaaguccgugaug-u-u-5'*

<210> 24

50 <211> 21

<212> ARN

<213> sintético

55 <200>

<221> base modificada

<223> ARNsi, los primer y segundo nucleótidos y los últimos tres nucleótidos en la cadena 5'-3' y la cadena 3'-5' están unidos mediante enlaces fosforotioatos.

60 <400> 24

*5'-g\*c\*gcuucaggcacuaca-a-a\*u\*a-3'  
3'-g\*c\*c-g-cgaaguccgugaug\*u\*u-5'*

65 <210> 25

<211> 21

## ES 2 336 440 T3

<212> ARN  
<213> sintético

5 <200>  
<221> base modificada  
<223> ARNsí, los primer y segundo nucleótidos y los últimos cinco nucleótidos en la cadena 5'-3' y 3'-5' están unidos mediante enlaces de fosforotioato.

10 <400> 25  
  
15            5'-g\*c\*gcuucaggcacuaca\*a\*a\*u\*a-3'  
              3'-g\*c\*c\*g\*cgaaguccgugauu\*u\*u-5'  
  
20 <210>26  
<211> 21  
<212> ARN  
<213> sintético

25 <200>  
<221> base modificada, gm, um  
<223> ARNsí, los primer y último nucleótidos en la dirección 5'-3' están metilados en 2-O.  
  
<400> 26  
  
30            5'-GcgcuucaggcacuacaaauA-3'  
              3'-GccgcgaaguccgugauuuU-5'  
  
35 <210> 27  
<211> 21  
<212> ARN  
<213> sintético

40 <200>  
<221> base modificada, gm, cm, um  
<223> ARNsí, los dos últimos nucleótidos en ambas direcciones 5'-3' y 3'-5' están metilados en 2-O

45 <400> 27  
  
50            5'-gcgcuucaggcacuacaaaUA-3'  
              3'-GCgcgcgaaguccgugauuu-5'  
  
55 <210> 28  
<211> 21  
<212> ARN  
<213> sintético

60 <200>  
<221> base modificada, gm, cm, um  
<223> ARNsí, los primer, segundo y dos últimos nucleótidos en ambas direcciones 5'-3' y 3'-5' están metilados en 2-O.  
  
<400> 28  
  
65            5'-GCgcuucaggcacuacaaaUA-3'  
              3'-GCgcgcgaaguccgugauuuUU-5'  
  
<210> 29

# ES 2 336 440 T3

<211> 21

<212> ARN

<213> sintético

5

<200>

<221> base modificada, gm, cm, um

10 <223> ARNsi, los primer, segundo y cuatro últimos nucleótidos en ambas direcciones 5'-3' y 3'-5' están metilados en 2-O.

<400> 29

15 **5'-GCgcuucaggcacuacaAAUA-3'**  
**3'-GCCGcgaaguccgugauguuUU-5'**

<210> 30

20 <211> 21

<212> ARN

<213> sintético

25 <200>

<221> base modificada

<223> ARNsi, el primer y el último nucleótido en ambas direcciones están alilados en 2-O.

30 <400> 30

**5'-GcgcuucaggcacuacaaaA-3'**  
**3'-GccgcgaaguccgugauguuU-5'**

35 <210> 31

<211> 21

<212> ARN

40 <213> sintético

<200>

<221> base modificada

45 <223> ARNsi, el primer y los dos últimos nucleótidos en ambas direcciones están alilados en 2-O.

<400> 31

**5'-gcgcuucaggcacuacaaaUA-3'**  
**3'-GCccgcgaaguccgugauguuu-5'**

55

60

65