



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

06-27688

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO *INTERFERENCIA DE ARN DOBLE QUE TIENE EXTREMOS ROMOS Y MODIFICACIONES 3'.*

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL *C12N15/11, A61K48/00*

71. SOLICITANTE *NOVARTIS AG*

DOMICILIO *BASILEA, SUIZA*

74. APODERADO *JIMENA ESCOBAR URIBE*

22. BOGOTÁ, D. C., *Marzo - 21 - 2006*

OK

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT**

ENTRADA EN FASE NACIONAL = 28-03-2006

SÓLICITUD DE:

1



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I



Capítulo II

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **NOVARTIS AG**

Dirección: Lichtstrasse 35, CH -4056
Basilea, Suiza

Nacionalidad o Domicilio: Basilea, Suiza.

Lugar de Constitución: Suiza

Teléfono: 4161324111 Fax: 416 13227532

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)**

Nombre: **JIMENA ESCOBAR URIBE**

Dirección: Cra. 11A No. 94-76 (Of. 305)

Teléfono: 6 162051/61 Fax: 6 161889

E-mail: tm-patent@escobaruribe.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número 39.778.452T.P 68228

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: **VER ANEXOS**

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2004/009599 Fecha 27 de agosto de 2004

Publicación Internacional No. WO 2005/021749 A1 Fecha 10 de marzo de 2005

6 TÍTULO (54) INTERFERENCIA DE ARN DOBLE QUE TIENE EXTREMOS
ROMOS Y MODIFICACIONES 3'.

7 Clasificación Internacional (51) C12N 15/11, A61K 48/00

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen
Estados Unidos de América

(32) Fecha
28 de agosto de 2003

(31) Número de Solicitud
60/498.514

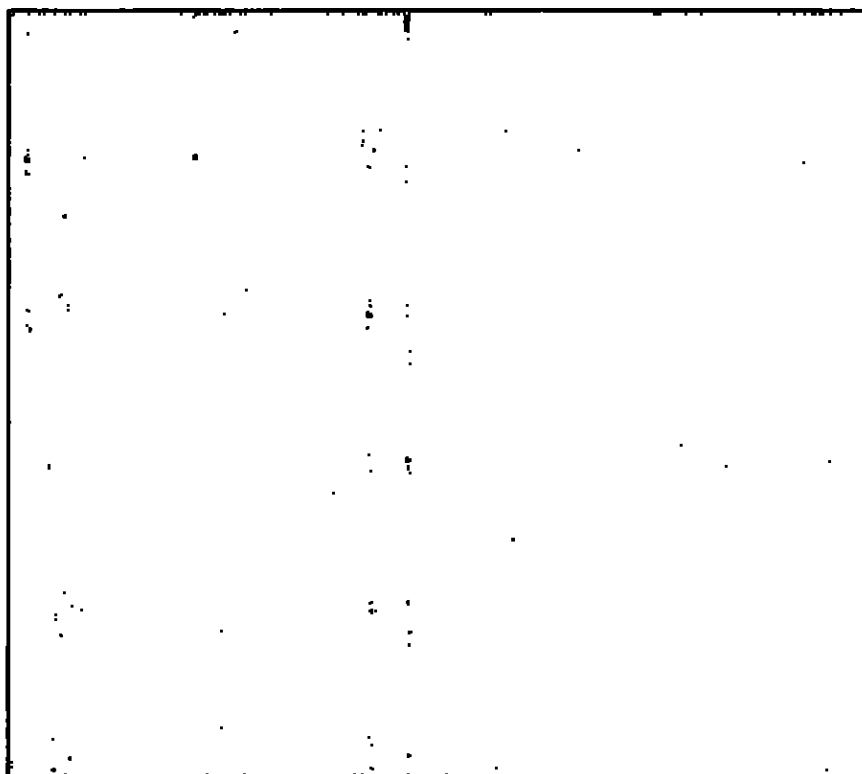
9 Comprobante de pago N 06 - 14.883 Fecha 22 de febrero de 2006

10

ANEXOS

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Prot. 17.398
- ☐ Poderes si fuere el caso Protocolo No. 17.398
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros "Opinión escrita".

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBE

FIRMA: 

C.C. 39.779.452 DE Usaquén T.P. 68.228

As. 2938/PCT

2938

2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 06027600 00000000 Folios: 07
Fecha (NM): 2006-02-21 14:16:20
Tramite : 011 PCT-PATENT 370 FASE NACI 411 PRESENTAR
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 14,883
FECHA : FEBRERO 22 DE 2006

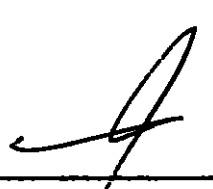
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
ESCOBAR URIBE ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	10659566	21/02/2006	7,631,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

ANEXOS

INVENTORES

1.)

WEILER, Jan

(Kandelstrasse 4, 79541 Lörrach-Haagen, Alemania);

2.)

HALL, Jonathan

(Ramstelweg 19, CH-4143 Dornach, Suiza);

3.)

BOLOGNA, Jean-Charles

(10, rue du Grand-Pont, CH-1950 Sion, Suiza);

4.)

NATT, François, Jean-Charles

(Traugott Meyer-Strasse 5, CH-4147 Aesch, Suiza);

5.)

HÄNER, Robert

(Scheuermattweg 23, CH-3043 Uettligen, Suiza).

4

Solicito expresamente a nombre de la sociedad **NOVARTIS AG**, sociedad constituida de conformidad con las leyes de Suiza, domiciliada en Lichtstrasse 35, CH-4056 Basilea, Suiza, el otorgamiento de Patente para la invención titulada **“INTERFERENCIA DE ARN DOBLE QUE TIENE EXTREMOS ROMOS Y MODIFICACIONES 3’”**.

Clase: C12N 15/11


JIMENA ESCOBAR URIBE
C.C. 39.779.452 de Usaquen.
T.P. 68.228

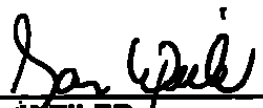
**D CUMENTO DE CESIÓN
ASSIGNMENT DOCUMENT**

El (los) suscrito (s), en su calidad de inventor (es) de

"Interferencia de ARN Doble que tiene extremos romos y
declara (an) que cede (n) y traspasa (n) todos los derechos que les correspondan en y sobre el
invento atrás mencionado a NOVARTIS AG, una compañía suiza constituida y existente bajo las
leyes de Suiza, domiciliada en CH-4002 Basilea, Suiza, en cuanto se refiere a la República de
Colombia: modificaciones 3' "

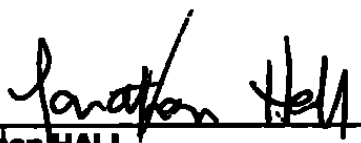
The undersigned, as inventor (s) of
INTERFERING RNA DUPLEX HAVING BLUNT-ENDS AND 3'-MODIFICATIONS

hereby declare (s) that assign (s) all the rights in and to the aforementioned invention to
NOVARTIS AG, a Swiss company incorporated and existing in conformity with the laws of
Switzerland, domiciled at CH-4002 Basel, Switzerland, as far as the Republic of Colombia is
concerned.



Jan WEILER
domiciled at
Kandelstrasse 4, 79541 Lörrach-Haagen, Germany

FIRMA DEL CEDENTE
domiciliado en



Jonathan HALL
domiciled at
Ramsteinweg 19, 4143 Dornach, Switzerland

FIRMA DEL CEDENTE
domiciliado en



Jean-Charles BOLOGNA
domiciled at
15, rue Saint Castor, 30000 Nimes, France

FIRMA DEL CEDENTE
domiciliado en



François Jean-Charles NATT
domiciled at
Traugott Meyer-Strasse 5, 4147 Aesch, Switzerland

FIRMA DEL CEDENTE
domiciliado en



Robert HÄNER
domiciled at
Scheuermattweg 23, 3043 Uettilgen, Switzerland

FIRMA DEL CEDENTE
domiciliado en

**DOCUMENTO DE CESIÓN
ASSIGNMENT DOCUMENT**

El (los) suscrito (s), en su calidad de inventor (es) de "Interferencia de ARN doble que tiene extremos romos y modificaciones 3'"

declara (an) que cede (n) y traspasa (n) todos los derechos que les correspondan en y sobre el invento atrás mencionado a NOVARTIS AG, una compañía suiza constituida y existente bajo las leyes de Suiza, domiciliada en CH-4002 Basilea, Suiza, en cuanto se refiere a la República de Colombia.

The undersigned, as inventor (s) of
INTERFERING RNA DUPLEX HAVING BLUNT-ENDS AND 3'-MODIFICATIONS

hereby declare (s) that assign (s) all the rights in and to the aforementioned invention to NOVARTIS AG, a Swiss company incorporated and existing in conformity with the laws of Switzerland, domiciled at CH-4002 Basel, Switzerland, as far as the Republic of Colombia is concerned.

Jan WEILER
domiciled at
Kandelstrasse 4, 79541 Lörrach-Haagen, Germany

FIRMA DEL CEDENTE
domiciliado en

Jonathan HALL
domiciled at
Ramstelweg 19, 4143 Domach, Switzerland

FIRMA DEL CEDENTE
domiciliado en

Jean-Charles Bologna 17/02/2006

Jean-Charles BOLOGNA
domiciled at
15, rue Saint Castor, 30000 Nimes, France

FIRMA DEL CEDENTE
domiciliado en

François Jean-Charles NATT
domiciled at
Traugott Meyer-Strasse 5, 4147 Aesch, Switzerland

FIRMA DEL CEDENTE
domiciliado en

Robert HÄNER
domiciled at
Scheuermattweg 23, 3043 Uettilgen, Switzerland

FIRMA DEL CEDENTE
domiciliado en

**DOCUMENTO DE CESIÓN
ASSIGNMENT DOCUMENT**

El (los) suscrito (s), en su calidad de inventor (es) de "Interferencia de ARN doble que tiene extremos romos y modificaciones 3' "

declara (an) que cede (n) y traspasa (n) todos los derechos que les correspondan en y sobre el invento atrás mencionado a NOVARTIS AG, una compañía suiza constituida y existente bajo las leyes de Suiza, domiciliada en CH-4002 Basilea, Suiza, en cuanto se refiere a la República de Colombia.

The undersigned, as inventor (s) of
INTERFERING RNA DUPLEX HAVING BLUNT-ENDS AND 3'-MODIFICATIONS

hereby declare (s) that assign (s) all the rights in and to the aforementioned invention to NOVARTIS AG, a Swiss company incorporated and existing in conformity with the laws of Switzerland, domiciled at CH-4002 Basel, Switzerland, as far as the Republic of Colombia is concerned.

Jan WEILER
domiciled at
Kandelstrasse 4, 79541 Lörrach-Haagen, Germany

FIRMA DEL CEDENTE
domicillado en

Jonathan HALL
domiciled at
Ramsteinweg 19, 4143 Dornach, Switzerland

FIRMA DEL CEDENTE
domicillado en

Jean-Charles BOLOGNA
domiciled at
15, rue Saint Castor, 30000 Nîmes, France

FIRMA DEL CEDENTE
domicillado en

François Jean-Charles NATT
domiciled at
Traugott Meyer-Strasse 5, 4147 Aesch, Switzerland

FIRMA DEL CEDENTE
domicillado en



Robert HANER
domiciled at
Scheuermattweg 23, 3043 Uettiligen, Switzerland

FIRMA DEL CEDENTE
domicillado en

Attestation

I, the undersigned notary public of Basel, Switzerland, certify herewith the authenticity of the signatures of **Mr. Jan Weller**, German citizen, residing in Lörrach-Haagen, Germany, **Mr. Jonathan Hall**, British citizen, residing in Dornach, Switzerland, **Dr. François Jean-Charles Natt**, French citizen, residing in Aesch/BL, Switzerland, **Mr. Jean-Charles Bologna**, French citizen, residing in Nîmes, France, and **Mr. Robert Häner**, citizen of Zullwil/SO, Switzerland, residing in Uettilingen, Switzerland.

The authenticity of the signatures was established by comparison.

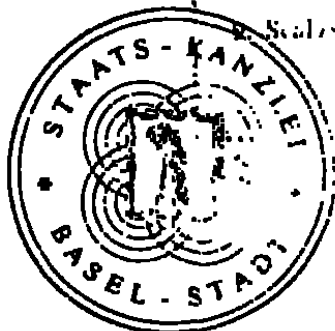
BASEL, this 1st (first) day of March 2006 (twothousandandsix)

M. Staehelin, Notar

Dr. M. Staehelin
Notar

Leg.Prot.Nr. 341 /2006

APOSTILLE	
(Hague Convention of October 5 th , 1961)	
1. Country: Switzerland (Schweiz/Suisse)	
This official document	
2. is signed by	<i>M. Staehelin</i>
3. in his/her function as	<i>Notar</i>
4. and certified by the seal of the	<i>Staehelin</i>
Certified 2 März 2006	
5. in Basel (Bâle)	6. on
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt	
8. No. 2'974/3'885	
9. Seal/stamp:	10. Signature: <i>Heidi Fischer</i>
..... Heidi Fischer	



CO Case DC/4-33332A

Assignment of Priority Rights

I / We, the undersigned

Jan WEILER, Kandelstrasse 4, 79541 Lörrach-Haagen, Germany, citizen of Germany

assign to Novartis AG, a body corporate organized according to the laws of Switzerland, of
Lichtstrasse 35, 4056 Basel, Switzerland, the right of priority

for **Colombia**

in respect of the invention disclosed and claimed in my (our) patent application(s)
hereinafter identified, and in consequence thereof, authorize Novartis AG to file

in **Colombia**

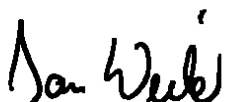
In its name a patent application corresponding to my (our) patent application(s) filed

in **USA**

on **August 28, 2003** under No. **60/498,514**

while claiming the priority of my (our) above named patent application(s) in conformity with
the dispositions of the International Convention.

dated with effect from **August 16, 2004**



Jan WEILER

Attestation

I, the undersigned notary public of Basel, Switzerland, certify herewith the authenticity of the signature of **Mr. Jan Weller**, German citizen, residing in Lörrach-Haagen, Germany.

The authenticity of the signature was established by comparison.

BASEL, this 1st (first) day of March 2006 (twothousandandsix)

M. Staehelin, Notar

Dr. M. Staehelin
Notar

Leg.Prot.Nr. 310 /2006

APOSTILLE
(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)
This official document

2. is signed by *M. Staehelin*

3. in his/her function as *Notar*

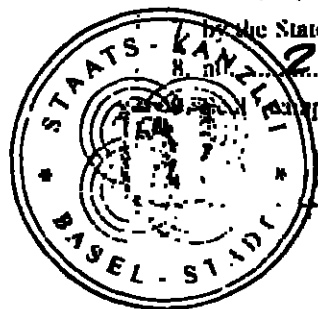
4. and certified by the seal of the *Germanien*

Certified **2 März 2006**

5. in Basel (Bâle) 6. on

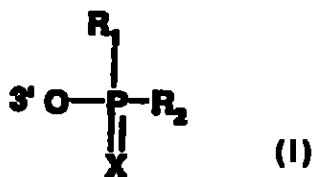
by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

10. Signature: *Flecher*
Heldi Flecher



RESUMEN

La presente invención se refiere a compuestos de ARN de estructura de cadena doble con por lo menos un extremo romo que comprende por lo menos un extremo 3' de la Fórmula (I): en donde X es O o S, R₁ y R₂ son independientemente OH, NH₂, SH, alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-alquilo, en donde el alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-alquilo pueden estar substituidos por átomos heterogéneos adicionales y grupos funcionales, preferiblemente un átomo heterogéneo seleccionado del grupo de N, O, o S o un grupo funcional seleccionado de OH, NH₂, SH, ácido o éster carboxílico; o, R₁ y R₂ pueden ser de la fórmula Y-Z en donde Y es O, N, S y Z es H, alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-alquilo, en donde el alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-alquilo pueden estar substituidos por átomos heterogéneos adicionales, preferiblemente un átomo heterogéneo seleccionado del grupo de N, O, o S; y en donde dicho ARN de estructura de cadena doble media la interferencia de ARN. Las modificaciones del extremo 3' preferidas son: fosfato, fósforotioato, ribonucleósido abásico, fósforodiéster de hidroxipropilo.



20

25

**INTERFERENCIA DE ARN DOBLE QUE TIENE EXTREMOS ROMOS Y
MODIFICACIONES 3'**

CAMPO DE LA INVENCION

5

La invención se refiere a la inhibición selectiva de genes objetivo utilizando ARN de estructura de cadena doble y provee compuestos útiles para este propósito.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los ARN dobles cortos han demostrado que son guías efectivas que median la interferencia de ARN en muchos modelos *in vitro* e *in vivo* (Hamilton y otros 1999, Zamore y otros, 2000, Caplen y otros, 15 2001, Elbashir y otros, 2001, Yang y otros, 2000).

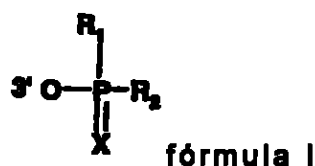
Más comúnmente, los ARNsi dobles sintéticos están diseñados como un tramo de 19 pares base de ribonucleótidos contiguos flanqueado con 2-3 nucleótidos no emparejados en el extremo 3' de cada estructura de cadena ("terminal"). Se ha encontrado que estas 20 21-nt especies de ARNsi se van a generar durante la división mediada por DICER de ARN-ds largo en mamíferos y sistemas no de mamífero (Bernstein y otros, 2001, Ketting y otros, 2001). Este forma de ARNsi de 21-mer particular ha sido primeramente seleccionado del modelo *drosophila melanogaster* y después resaltado con 25 respecto a su eficiencia (Elbashir y otros 2001). Consecuentemente,

la mayor parte de los estudios de hoy en día que aplican ARNsis
sintéticos como inhibidores del gen se basan en este tipo de
derivado de ARNsi de 21-mer "de tipo silvestre". Para las terminales
usualmente se utilizan 2'-deosxinucleótidos, notablemente por
5 razones de costo pero también con respecto a una protección
potencial contra la actividad de nucleasa intracelular.

La presente invención ahora provee un formato nuevo e
ingenioso para ARN de estructura de cadena doble ("ARNds") que
media ARNi. Los ARNsis de extremos romos de acuerdo con la
10 presente invención superan las desventajas de los ARNsis sintéticos
con terminales 3' que actualmente se utilizan en la técnica.

COMPENDIO DE LA INVENCION

15 La presente invención provee un ARN de estructura de cadena
doble con por lo menos un extremo romo que comprende por lo
menos un extremo 3' de la fórmula:



20

en donde

X es O o S

R₁ y R₂ son independientemente OH, NH₂, SH, alquilo, arilo,
alquil-arilo, aril-alquilo, en donde el alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-
25 alquilo pueden estar substituidos por átomos heterogéneos

adicionales y grupos funcionales, preferiblemente un átomo heterogéneo seleccionado del grupo que consiste de N, O, o S o un grupo funcional seleccionado del grupo OH, NH₂, SH, ácido o éster carboxílico;

5 También, R₁ y R₂ pueden ser de la fórmula Y-Z en donde Y es O, N, S y Z es H, alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-alquilo, en donde el alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-alquilo pueden estar substituidos por átomos heterogéneos adicionales, preferiblemente un átomo heterogéneo seleccionado del grupo de N, O, o S;

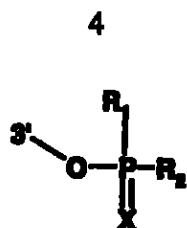
10 y en donde dicho ARN de estructura de cadena doble media la interferencia de ARN.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que las moléculas de ARN de estructura de cadena doble sintéticas (RNAds) con por lo menos un extremo romo comprenden incierto tipo de modificación química que eficientemente media la interferencia de ARN. Los ARNdss de acuerdo con la presente invención son
20 particularmente útiles para métodos de alta capacidad de producción utilizando ARNsis debido a su procedimiento sintético simplificado, tal como por ejemplo el uso de un soporte sólido universal.

 En un aspecto, la presente invención se refiere a ARN de estructura de cadena doble con por lo menos un extremo romo y que
25 comprende por lo menos un extremo 3' de la fórmula:

16
15



Fórmula I

en donde

5 X es O, o S

 R₁ y R₂ son independientemente OH, NH₂, SH, alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-alquilo, en donde el alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-alquilo puede estar substituido a través de átomos heterogéneos adicionales y grupos funcionales, preferiblemente un átomo
10 heterogéneo seleccionado del grupo de N, O, o S o un grupo funcional seleccionado de OH, NH₂, SH, ácido o éster carboxílico;

 También, R₁ y R₂ pueden ser de la fórmula Y-Z en donde Y es O, N, S y Z es H, alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-alquilo, en donde el alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-alquilo pueden estar substituidos por
15 átomos heterogéneos adicionales, preferiblemente un átomo heterogéneo seleccionado del grupo de N, O, o S;

 y en donde dicho ARN de estructura de cadena doble media la interferencia de ARN.

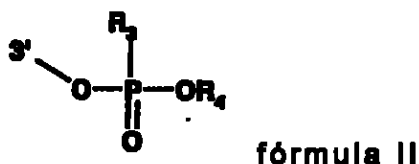
 R₁ y R₂ también pueden formar una estructura cíclica, por
20 ejemplo, un anillo carbocíclico o heterocíclico, la estructura de anillo preferiblemente teniendo de 3 a 7 miembros.

 En una modalidad preferida, Z es uno o más nucleósidos abásicos, preferiblemente porciones de nucleósidos. Las porciones de nucleósido pueden estar enlazadas a través de un grupo
25 fosfodiéster o fósforotioato.

En otra modalidad preferida, R_1 es OH. En otra modalidad preferida, R_1 y R_2 juntos comprenden de 1 a 24 átomos de carbono más preferiblemente de 1 a 12, o de 2 a 10 y más preferiblemente de 1 a 8 o de 2 a 6. En otra modalidad preferida, R_1 y R_2 son
 5 independientemente OH, alquilo inferior, arilo inferior, alquil-arilo inferior, aril-alquilo inferior, en donde el arilo inferior, alquil-arilo inferior, aril-alquilo inferior pueden estar substituidos por átomos heterogéneos adicionales y grupos funcionales como se definió anteriormente. En otra modalidad preferida, R_1 y R_2 ambos no son
 10 OH.

El término "inferior" en conexión con radicales orgánicos o compuestos significa un compuesto o radical que puede ser ramificado o no ramificado con hasta e incluyendo 7 átomos de carbono, preferiblemente de 1-4 átomos de carbono. Alquilo inferior
 15 representa, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, ter-butilo, n-pentilo y pentilo ramificado, n-hexilo y hexilo ramificado.

En un aspecto relacionado, la presente invención se refiere a ARN de estructura de cadena doble con por lo menos un extremo
 20 como comprendiendo por lo menos un extremo 3' de la fórmula:



en donde R_2 es OH, NH_2 , SH, alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-alquilo,
 25 en donde el alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-alquilo puede estar

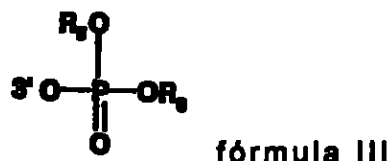
substituido a través de átomos heterogéneos adicionales y grupos funcionales, preferiblemente un átomo heterogéneo seleccionado del grupo de N, O, o S y R₄ es independientemente alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-alquilo, en donde el alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-alquilo
5 puede estar substituido por átomos heterogéneos adicionales, preferiblemente un átomo heterogéneo seleccionado del grupo de N, O, o S o un grupo funcional seleccionado del grupo de OH, NH₂, SH, ácido o éster carboxílico, y en donde dicho ARN de estructura de cadena media la interferencia de ARN. R₃ y R₄ también pueden
10 formar una estructura cíclica, por ejemplo, la estructura de anillo preferiblemente de 3 a 7 miembros.

R₃ y R₄ además comprenden átomos heterogéneos adicionales, preferiblemente un átomo heterogéneo seleccionado del grupo de N, O, o S.

15 En una modalidad preferida, R₃ es OH. En otra modalidad preferida, R₃ y R₄, respectivamente, juntos comprenden de 1 a 24 átomos de carbono más preferiblemente de 1 a 12, o de 2 a 10, y más preferiblemente de 1 a 8 o de 2 a 6. En otra modalidad preferida, R₃ es alquilo inferior, arilo inferior, alquil-arilo inferior,
20 aril-alquilo inferior, en donde el alquilo inferior, arilo inferior, alquil-arilo inferior, aril-alquilo inferior, pueden estar substituidos por átomos heterogéneos adicionales y grupos funcionales como se definió anteriormente y R₄ es, independientemente es alquilo inferior, arilo inferior, alquil-arilo inferior, aril-alquilo inferior, en donde el
25 alquilo inferior, arilo inferior, alquil-arilo inferior, aril-alquilo inferior,

pueden estar substituidos por átomos heterogéneos adicionales y grupos funcionales como se definió anteriormente

En un aspecto relacionado, la presente invención se refiere a ARN de estructura de cadena doble con por lo menos un extremo
5 como comprendiendo por lo menos un extremo 3' de la fórmula:



en donde R_5 y R_6 son iguales o diferentes y son H, alquilo, arilo,
10 alquil-arilo, aril-alquilo, en donde el alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-
alquilo pueden estar substituidos por átomos heterogéneos,
preferiblemente un átomo heterogéneo seleccionado del grupo de N,
O o S, o un grupo funcional seleccionado del grupo de OH, NH_2 , SH,
ácido o éster carboxílico, en donde el ARN de estructura de cadena
15 doble media la interferencia de ARN. R_5 y R_6 también pueden formar
una estructura cíclica, por ejemplo, un anillo carbocíclico o
heterocíclico, la estructura de anillo preferiblemente teniendo de 3 a
7 miembros. R_5 y R_6 además comprende átomos heterogéneos
adicionales, preferiblemente un átomo heterogéneo seleccionado del
20 grupo de N, O o S.

En una modalidad preferida, R_5 y R_6 , respectivamente, juntos
comprenden de 1 a 24 átomos de carbono, más preferiblemente de 1
a 12 o de 2 a 10, y más preferiblemente de 1 a 6 o de 2 a 6. En otra
modalidad preferida, R_5 y R_6 son independientemente alquilo inferior,
25 arilo inferior, alquil-arilo inferior, aril-alquilo inferior, en donde

alquilo inferior, arilo inferior, alquil-arilo inferior, aril-alquilo inferior pueden estar substituidos por átomos heterogéneos adicionales y grupos funcionales como se definió anteriormente. En otra modalidad R_5 y R_6 ambos no son H.

5 Las moléculas de ARN de la presente invención tendrán por lo menos una estructura de cadena que comprende un extremo 3' de la fórmula I, II o III. Preferiblemente, ambas estructuras de cadena de ARN de estructura de cadena doble que comprende extremos 3' comprendiendo un grupo de la fórmula I, II o III. Las moléculas de
10 ARN de la presente invención además tendrán por lo menos un extremo romo, preferiblemente dos extremos romos. En una modalidad particularmente preferida, las moléculas de ARN de la presente invención tienen extremos romos en ambos lados y ambos extremos comprenden extremos 3' de la fórmula I, II o III.

15 Las moléculas de ARN de acuerdo con la presente invención tendrán por lo menos un caracter de estructura de cadena doble parcialmente. En una modalidad preferida, son completamente de estructura de cadena doble. Pueden estar compuestas de dos estructuras de cadena separadas, pero también pueden estar
20 compuestas de una estructura de cadena que forma un bucle de horquilla. En una modalidad particularmente preferida, las moléculas de ARN de la presente invención están compuestas de dos estructuras de cadena separadas que son completamente de estructura de cadena doble comprendiendo por lo menos uno,
25 preferiblemente dos extremos romos.

Las moléculas de ARN de acuerdo con la presente invención median la interferencia de ARN ("ARNi"). El término "ARNi" es bien conocido en la técnica y comúnmente se entiende que significa la inhibición de uno o más genes objetivo en una célula a través de ARNds con una región que es complementaria al gen objetivo. Se conocen varios ensayos en la técnica para probar ARNds para su habilidad para mediar ARNi (ver, por ejemplo Elbashir y otros, Methods 26 (2002), 199-213). El efecto de los ARNds de acuerdo con la presente invención en la expresión del gen típicamente dará como resultado la expresión de un gen objetivo que está siendo inhibido mediante por lo menos 10%, 33%, 50%, 90%, 95% o 99% cuando se compara con una célula no tratada con las moléculas de ARN de acuerdo con la presente invención.

Las moléculas de ARN de acuerdo con la presente invención comprenden una región de estructura de cadena doble que es substancialmente idéntica a una región de ARNm del gen objetivo. Particularmente preferida es una región con 100% de identidad con la secuencia correspondiente del gen objetivo. Sin embargo, la región también puede contener una o más diferencias según comparado con la región correspondiente del gen objetivo. La presente invención incluye moléculas de ARN que activan más de un gen. En una modalidad preferida, las moléculas de ARN de la presente invención específicamente activan más de un gen. Con el fin de solamente activar el ARNm deseado, el reactivo de ARNsi deberá tener 100% de homología con ARNm objetivo y por lo menos

dos nucleótidos no coincidentes con todos los otros genes presentes en la célula u organismo. Los métodos para analizar e identificar ARNdss con identidad de secuencia suficiente con el fin de efectivamente inhibir la expresión de una secuencia objetivo específica son conocidos en la técnica. La identidad de secuencia se puede optimizar a través de la comparación de la secuencia y los algoritmos de alineación conocidos en la técnica (ver, Gribskov y Devereux, Sequence Analysis Primer, Stockton Press, 1991, y referencias citadas ahí) y calculando el porcentaje de diferencia entre las secuencias de nucleótido a través de, por ejemplo, el algoritmo de Smith-Waterman según implementado en el programa de software BESTFIT, utilizando parámetros por omisión (por ejemplo, University of Wisconsin Genetic Computing Group). Otro factor que afecta la eficiencia del reactivo ARNi es la región objetivo del gen objetivo. La región de un gen objetivo efectiva para la inhibición de ARNi se puede determinar a través de experimentación. La región objetivo de ARNm más preferida sería la región de codificación. También se prefieren regiones no traducidas, particularmente los empalmes de división 3'-UTR. Por ejemplo, los ensayos de transfección como se describen en Elbashir S. M. y otros, 2001 EMBO J., 20, 6877-6888 se pueden llevar a cabo para este propósito. Existen en la técnica un número de otros ensayos y métodos adecuados que son bien conocidos para alguien con experiencia en la técnica.

25 La longitud de la región complementaria de las moléculas de

ARN de acuerdo con la presente invención es preferiblemente de 10 a 100 nucleótidos, más preferiblemente de 15 a 50 nucleótidos, aún más preferiblemente de 17 a 30 nucleótidos y más preferiblemente de 19 a 25 nucleótidos. En una modalidad particularmente preferida las moléculas de ARN de acuerdo con la presente invención consiste de moléculas de ARNs cortas que tienen una longitud de 15 a 50 nucleótidos, más preferiblemente de 17 a 30 nucleótidos y más preferiblemente de 19 a 25 nucleótidos.

El extremo 3' del ARNs de acuerdo con la presente invención confiere una alta estabilidad *in vivo* en medio de suero y de crecimiento para los cultivos de célula. De esta forma los ARNs de acuerdo con la presente invención no requieren de estabilización adicional contra la degradación de nucleasa como es común en la técnica, por ejemplo, a través de la adición de la terminal 3' de 2 o 3 desoxinucleótidos. Sin embargo, los ARNs de acuerdo con la presente invención también pueden contener por lo menos un ribonucleótido modificado o no natural. Las modificaciones preferidas se incluyen, pero no se limitan a modificaciones en la posición 2' de la porción de azúcar, tal como por ejemplo 2'-O--(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin y otros, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504) es decir, un grupo alcoxialcoxi. Otras modificaciones preferidas incluyen las modificaciones del eje incluyendo, pero no limitándose al reemplazo del grupo fosforester que conecta los ribonucleótidos adyacentes con por ejemplo los fosforotioatos, fosforotioatos quirales o fosforoditioatos. Los métodos para la síntesis del ribonucleótido

modificado o no natural son bien conocidos y fácilmente disponibles para aquellos con experiencia en la técnica.

Las moléculas de ARNds se pueden preparar a través de un método que comprende los pasos:

5 (i) sintetizar las dos estructuras de cadena del ARN cada una utilizando, por ejemplo, química TOM como se ilustra en el Ejemplo 1. Otros métodos para sintetizar ARN son fácilmente aparentes para aquellos con experiencia en la técnica. La reacción se puede llevar a cabo en solución, preferiblemente, sobre fase sólida o a través del
10 uso de reactivos soportados por polímero.

(ii) combinar las estructuras de cadena del ARN sintetizado bajo condiciones, en donde la molécula de ARNds se forma, la cual es capaz de mediar ARN.

En otro aspecto, la presente invención provee métodos para la
15 inhibición de un gen objetivo que comprenden introducir dentro de una célula de ARNds de acuerdo con la presente invención, la cual es capaz de inhibir por lo menos un gen objetivo a través de ARNi. También, más de una especie de ARNds, la cual cada una es específica para otra región objetivo, se puede introducir dentro de
20 una célula al mismo tiempo o secuencialmente. El ARNds de acuerdo con la presente invención, se puede introducir dentro de una célula a través de varios métodos estándares en ingeniería genética, incluyendo métodos físicos, por ejemplo, difusión simple, a través de inyección de una solución conteniendo el ácido nucleico, bombardeo
25 con partículas cubiertas con el ácido nucleico, empapando la célula u

organismo en una solución del ácido nucleico, lipofección o electroporación de las membranas de célula en la presencia de ácido nucleico. Un método particularmente preferido para entregar ácidos nucleicos es el uso de lipofección. Las células subsecuentemente se controlan bajo condiciones bajo las cuales el ARNi ocurre. Será fácilmente aparente para el técnico experto bajo que condiciones una línea de célula dada se controla con el fin de que ocurra ese ARNi. Este método para la inhibición de un gen objetivo se puede utilizar terapéuticamente (por ejemplo, para destruir un gen sobre expresado en una enfermedad particular) o para investigación (por ejemplo, examinar la función de un gen o validar objetivos para el descubrimiento de fármacos). En una modalidad preferida, la función del gen se elimina completamente a través de este método, es decir, la destrucción de las células para un gen particular se puede generar a través de este método.

En una modalidad preferida, la célula es una célula de mamífero, más preferiblemente una célula de ser humano. El tipo y origen de la célula no es crítico para la invención, de esta forma la invención incluye por ejemplo, células de masa de célula interna, células de ectodermo extra embriónicas o de tallo embriónicas, totipotentes o pluripotentes, dividiendo o no dividiendo, parénquima o del epitelio, inmortalizadas o transformadas o similares. La célula puede ser una célula de tallo o una célula diferenciada. Los tipos de células que están diferenciadas incluyen sin limitación, adipocitos, fibroblastos, miocitos, cardiomiocitos, endotelio, células dendríticas,

neuronas, glia, células de mástil, células sanguíneas, y leucocitos (por ejemplo, eritrocitos, megacariotes, linfocitos, tales como B, T y células aniquiladoras naturales), células epiteliales, queratinocitos, condrocitos, osteoblastos, osteoclastos, hepatocitos, y células de las glándulas endocrina o exocrina, así como células sensoras.

En otro aspecto, el ARNds de acuerdo con la presente invención se utiliza para la identificación de la función del gen en un organismo en donde se inhibe la actividad del gen objetivo de la función previamente desconocida. En lugar del consumo de tiempo y aislamiento de laboratorio de los mutantes a través de clasificación genética tradicional, la genómica funcional contemplaría la determinación de la función de genes no caracterizados a través del empleo de ARNds de acuerdo con la presente invención, para reducir la cantidad y/o alterar el cronometraje de la actividad del gen objetivo. El ARNds de acuerdo con la presente invención se podría utilizar en la determinación de objetivos potenciales para farmacéuticos, entendiendo los eventos normales y patológicos asociados con el desarrollo, determinación de las trayectorias de señalización responsables del desarrollo/envejecimiento postnatal y similares. La velocidad aumentada para adquirir la información de la secuencia de nucleótido del genómico y los orígenes del gen expresados, incluyendo el genoma humano, se pueden acoplar con la invención para determinar la función del gen en sistemas de mamíferos, en particular sistemas de cultivo de célula de seres humanos.

Para facilitar cuál ARN puede ser introducido dentro una célula de mamífero intacta conteniendo el gen objetivo para habilitar al método en la inhibición de un gen objetivo de acuerdo con la presente invención que se va a utilizar en la clasificación de la alta producción (HTS). Por ejemplo, las soluciones conteniendo moléculas de ARN de acuerdo con la presente invención que son capaces de inhibir un gen objetivo dado se pueden colocar dentro de cavidades individuales colocadas sobre una placa de microtitulación como un arreglo ordenado. Subsecuentemente, las células intactas en cada cavidad se pueden ensayar para cualesquiera cambios o modificaciones en el comportamiento o desarrollo debido a la inhibición de la actividad del gen objetivo o a través proteómica, genómica o técnicas de biología molecular estándares. De esta forma, la función del gen objetivo se puede ensayar a partir de los efectos que tiene sobre la célula cuando se inhibe la actividad del gen.

La presente invención no está limitada a ningún tipo de gen objetivo o secuencia de nucleótido. Por ejemplo, el gen objetivo puede ser un gen celular, un gen endógeno, un gen asociado con patógeno, un gen viral o un oncogen. Las siguientes clases de posibles genes objetivos se listan para propósitos ilustrativos solamente y no se interpretarán como limitante: factores de transcripción y genes de desarrollo (por ejemplo, moléculas de adhesión, inhibidores de quinasa de ciclina, miembros de la familia Wnt, miembros de la familia Pax, miembros de la familia de hélice

28
27

Winged, miembros de la familia Hox ,cotoquinas/linfoquinas y sus receptores, factores de crecimiento /diferenciación y sus receptores, neurotransmisores y sus receptores); oncogenes, (por ejemplo ABLI, BCL1, BCL2, BCL6, CBFA2, CBL, CSFIR, ERBA, ERBB, ERBB2, ETSI, 5 ETV6, FGR, FOS, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MDM2, MLL, MYB, MYC, MYCLI, MYCN, NRAS, PIMI, PML, RET, SKP2, SRC, TAL1, TCL3, y YES); genes supresores de tumor (por ejemplo, APC, BRAI, BRCA2, CTMP, MADH4, MCC, NFI, NF2, RBI, TP53, y WTI); y enzimas (por ejemplo, desaturasas e hidroxilasas ACP, ADP-glucosa 10 piroforilasas, ATPasas, alcohol de deshidrogenasas, amilasas, amiloglucosidasas, catalasas, ciclooxigenasas, descarboxilasas, dextrinasas, polimerasas de ADN y ARN, galactosidasas, oxidasas de glucosa, GTPasas, helicasas, inegrasas, insulinasas, invertasas, isomerasas, cinasas, lactasas, lipasas, lipooxigenasas, lisozimas, 15 peroxidasas, fosfatasas, fosfolipasas, fósforolisas, proteinasas, y peptidasas, recombinasas, transcriptasas inversas, telomerasa, incluyendo componentes de ARN y/o proteina, y topoisomerasas).

Un gen derivado de cualquier patógeno se puede activar para inhibición. Por ejemplo, el gen causaría inmunosupresión del 20 huésped directamente o puede ser esencial para la replicación del patógeno, transmisión del patógeno, o mantenimiento de la infección. Las células en riesgo de infección a través de un patógeno o células ya infectadas, tales como las células infectadas a través infecciones del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), infecciones de 25 influenza, malaria, hepatitis, plasmodio, citomegalovirus, virus de

29
28

herpes simple, y virus de enfermedad de pies y boca se pueden activar para tratamiento a través de la introducción de ARN de acuerdo con la invención. El gen objetivo podría ser un patógeno o gen huésped responsable de la entrada de un patógeno dentro de su huésped, metabolismo de fármaco a través del patógeno o huésped, replicación o integración del genoma del patógeno, establecimiento o difusión de una infección en el huésped, o ensamble de la siguiente generación del patógeno. Los métodos de profilaxis (es decir, prevención o riesgo disminuido de infección), así como la reducción en la frecuencia y severidad de los síntomas asociados con la infección, pueden ser contemplados.

En otro aspecto, la invención además provee un método para identificar y/o caracterizar los agentes farmacológicos que actúan en por lo menos una proteína objetivo que comprende: poner en contacto una célula eucariótica, preferiblemente una célula de mamífero, más preferiblemente una célula de ser humano capaz de expresar por lo menos un gen endógeno que codifica para la proteína(s) de interés con (a) por lo menos una molécula de ARNs de acuerdo con la presente invención, la cual es capaz de inhibir la expresión del gen(es) que codifican la proteína(s) de interés y (b) una sustancia de prueba o una colección de sustancias de prueba en donde las propiedades farmacológicas de dicha sustancia de prueba o dicha colección van a ser identificadas y/o caracterizadas. Las células podrían ser concomitantemente o secuencialmente contactadas con el ARNs y el compuesto(s) que se va a probar, el

orden en el cual las células se ponen en contacto con el ARNds y el compuesto(s) no es crucial. En una modalidad preferida, las células además comprenden por lo menos un ácido nucleico exógeno que codifica una forma variante o mutada de la proteína(s) de interés, en
5 donde en la expresión de dicho ácido nucleico exógeno es menos inhibida a través de dicho ARNds.

En otro aspecto, la invención también provee un equipo que comprende reactivos para inhibir la expresión de un gen objetivo en una célula, en donde dicho equipo comprende ARNds de acuerdo con
10 la presente invención. El equipo comprende por lo menos uno de los reactivos necesarios para llevar a cabo la introducción *in vitro* o *in vivo* del ARNds de acuerdo con la presente invención a las muestras o sujetos de prueba. En una modalidad preferida, dichos equipos también comprenden instrucciones detallando los procedimientos a
15 través de los cuales los componentes del equipo se van a utilizar.

Otro aspecto de la presente invención provee composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen ARNds de acuerdo con la presente invención que es capaz de inhibir por lo menos gen objetivo mediante el ARNi. Las composiciones farmacéuticas también pueden
20 contener más de una especie de ARNds que es específica para otra región objetivo. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse en un número de formas dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y dependiendo del área que se va a tratar. La administración puede ser
25 tópica (incluyendo distribución oftálmica y a las membranas

mucosas, incluyendo distribución vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo, a través de inhalación de polvos y aerosoles, incluyendo a través de nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye
5 inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o intraventricular.

Las composiciones de la presente invención se pueden formular en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles tales como,
10 pero no limitándose a, tabletas, cápsulas, jarabes líquidos, geles suaves, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también se pueden formular como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas además pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la
15 suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrana. La suspensión puede proveerse como una sal y se puede formar con muchos ácidos, incluyendo, pero no limitándose a, clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en solventes acuosos u
20 otros solventes protónicos que son las formas base libres correspondientes. En otros casos, la preparación preferida puede ser un polvo liofilizado que puede contener cualquiera o todos los siguientes: de 1-50 mM de histidina, 0. %-2% sacarosa, y 2-7% de manitol, a un rango de pH de 4.5 a 5.5, que está combinado con el
25 regulador de pH antes de uso.

La determinación de una dosis efectiva es bien conocida dentro de la capacidad de aquellos con experiencia en la técnica. La eficacia terapéutica y la toxicidad se pueden determinar a través de procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos de célula o animales experimentales, por ejemplo, ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de la población) y LD50 (la dosis letal para el 50% de la población). La proporción de la dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el Índice terapéutico, y se puede expresar como la proporción, LD50/ED50. Las composiciones farmacéuticas que exhiben grandes índices terapéuticos son preferidas. Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo de célula y estudios en animales se utilizan en la formulación del rango de dosificación para uso humano. La dosis contenida en dichas composiciones está preferiblemente dentro del rango de las concentraciones en circulación que incluyen el ED50 con poca o nada de toxicidad. Las dosis varían dentro de este rango dependiendo de la forma de dosis empleada, la sensibilidad del paciente, y la ruta de administración. Las cantidades de dosis normales pueden variar de 0.1 a 100,000 microgramos, hasta un total de dosis de alrededor de 1 g, dependiendo de la ruta de administración. La guía para dosis y métodos particulares de suministro se proveen en la literatura y generalmente están disponibles para los practicantes en la técnica. Aquellos con experiencia en la técnica emplearán diferentes formulaciones de nucleótidos que para proteínas y sus inhibidores. Similarmente, la

33
32

distribución de los polinucleótidos o polipéptidos será específica para las células, condiciones, lugares particulares, etc.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar la invención.

5

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Procedimientos para la síntesis del soporte sólido LM-17

3-[Bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoxi]-propan-1-ol (LM-14)

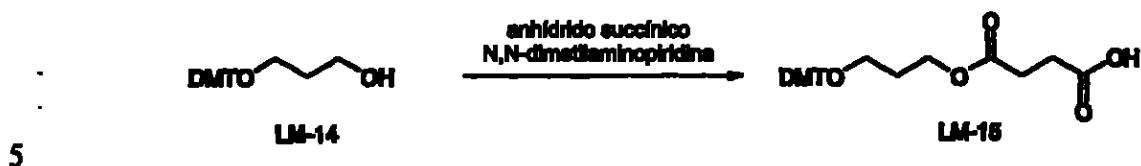
10



A una solución de 1,3-propandiol (20 ml, 268 mmoles) en 20 ml de piridina absoluta bajo una atmósfera de argón se agregó 4,4'-
15 dimetoxitrifenilclorometano (1.87 g, 5.4 mmoles). Después de agitar a temperatura ambiente durante 10 minutos, la mezcla se vació sobre una mezcla de hielo/agua y se extrajo con acetato de etilo (dos veces). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (dos veces) y salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y
20 se concentraron. El líquido café obtenido se purificó a través de cromatografía de columna (gel de sílice, eluyente: acetato de etilo/hexanos = 1:2) produciendo 1.56 g (77%) de LM-14 como un aceite ligeramente amarillo.

25

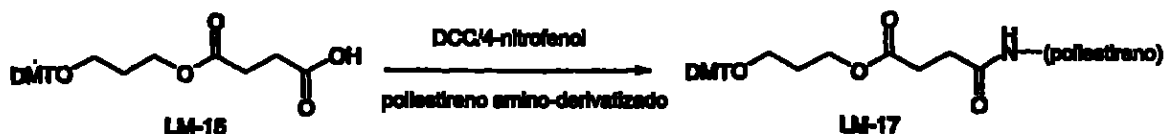
Éster de ácido mono-(3-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoxi]-propil) de ácido succínico (LM-15)



A una solución de LM-14 (250 mg, 0.69 mmoles) en 5 ml de piridina absoluta se agregó N,N-dimetilaminopiridina (45 mg, 0.37 mmoles). Después de la adición de anhídrido succínico (57 mg, 0.57 mmoles) la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche.

10 La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó tres veces con salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para producir 536 mg del crudo LM-15 el cual se utilizó sin purificación adicional en el paso subsiguiente.

15 **Soporte sólido LM-17**



amino al filtrado. Se agregaron 0.046 ml de trietilamina y la mezcla se agitó utilizando un agitador de botella mecánico durante 24 horas. La mezcla se filtró y el soporte sólido se lavó dos veces, cada una con 5 ml de DMF, 5 ml de metanol y 5 ml de éter dietílico para dar 453 mg de LM-17. La cuantificación (absorción a 498 nm) de los grupos dietilo liberada después del tratamiento con 0.1 ml de una de 1.9 g de solución de ácido p-toluensulfónico en 100 ml de acetonitrilo reveló una carga de 14 μ moles/g.

10

EJEMPLO 2

1. Síntesis de Oligoribonucleótidos (ARNs)'s)

Los oligoribonucleótidos sintéticos modificados descritos en esta invención se pueden preparar utilizando química de fósforoamidita TOM estándar en Sintetizadores ABI394 o Expedite/Moss (Applied Biosystems). Las fósforamiditas se disolvieron en acetonitrilo a una concentración de 0.05 M (0.2 M en OligoPilot II), el acoplamiento se hizo a través de la activación de fósforoamiditas mediante una solución de 0.2 M de triflato de bencimidazolio en acetonitrilo. Los tiempos de acoplamiento están usualmente comprendidos entre 3-6 minutos. Se hace una primera encapsulación se hace a través de reactivos de encapsulación estándares. La oxidación se hace a través de una solución de 0.1 M de yodo en THF/Piridina/Agua (77:20:3) o 0.5 M de t-butilhidroxiperóxido (Fluka) en diclorometano durante dos minutos.

25

286
35

Una segunda encapsulación se llevó a cabo después de la oxidación. Las cadenas en crecimiento del oligonucleótido se destritaron para el siguiente acoplamiento a través de ácido dicloroacético al 2% en diclorometano o dicloroetano. Después de la finalización de las

5 secuencias, los compuestos enlazados al soporte se dividieron y se desprotegieron como "Tritilo-en" a través de solución de metilamina (41% de metilamina acuosa/33% de metilamina etanólica 1:1 v/v) a 35°C durante 6 horas. Las suspensiones resultantes se liofilizaron a sequedad. Los grupos 2'-O-sillo se removieron una vez el

10 tratamiento con fluoruro de 1M de tetrabutilamonio, 10 minutos, a 50°C y 6 horas a 35°C. Las soluciones crudas obtenidas se purificaron directamente a través de RP-HPLC. Los compuestos destritados purificados se analizaron a través de espectrometría de Masas de Electroaspersión y Electroforesis de Gel Capilar y se

15 cuantificaron a través de UV de acuerdo con su coeficiente de extinción a 260 nM. Las secuencias de oligonucleótido se listan en el Cuadro 1:

	Apodo	Objetivo	Estructura de cadena antisentido	Estructura de cadena sentido
5	ARNsi 8646	p2x3	ACU CCA UCC AGC CGA GUG Aasg	UCA CUC GGC UGG AUG GAG Utst
	C3-8646	p2x3	ACU CCA UCC AGC CGA GUG A-C3	UCA CUC GGC UGG AUG GAG U-C3
	fosfato-8646	p2x3	ACU CCA UCC AGC CGA	UCA CUC GGC UGG AUG
	abásico-8646	p2x3	GUG A-GAG U-p ACU CCA UCC AGC CGA GUG A-ab-ab	UCA CUC GGC UGG AUG GAG Uab-ab
10	ARNsi 8549	luc	UCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTdT	CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT
	ARNsi-10557	GAPDH	GGC CAU CCA CAG UCU UCU Ggg	CAG AAG ACU GUG GAU GGC CUU
	MM ARNsi-10559	GAPDH	GGC CAG CCA CAU UCG UCU Ugg	AAG ACG AAU GUG GCU GGC CUU
	C3-10569	GAPDH	GGC CAU CCA CAG UCU UCU G-C3	CAG AAG-ACU GUG GAU GGC C-C3
15	MM C3-10571	GAPDH	GGC CAG CCA CAU UCG UCU U-C3	AAG ACG AAU GUG GCU GGC C-C3
	ARNsi2	hGAPDH	CAU GUA GUU GAG GUC AAU Gaa	CAU UGA CCU CAA CUA CAU GUU
	ARNsi2 MM	hGAPDH	CAU GUA GAU GAU GUC GAU Gaa	CAU CGA CAU CAU CUA CAU GUU
	C3-ARNsi2	hGAPDH	CAU GUA GUU GAG GUC AAU G-C3	CAU UGA CCU CAA CUA CAU G-C3
20	C3-ARNsi2 MM	hGAPDH	CAU GUA GAU GAU GUC GAU G-C3	CAU CGA CAU CAU CUA CAU G-C3
	OH-ARNsi	hGAPDH	CAU GUA GAU GAU GUC GAU G	CAU UGA CCU CAA CUA CAU G
	P2-ARNsi	hGAPDH	CAU GUA GAU GAU GUC GAU G-p	CAU UGA CCU CAA CUA CAU G-p

N: ARN, n: 2'-metoxietil ribonucleósido, dN: desoxiribonucleósido,
25 ab: ribonucleósido abásico, p: fosfato, s: fósforotioato, C3:

hidroxipropilfósodiéster

EJEMPLO 3

3.1 Materiales y Métodos

5 **Materiales:** La oligofectamina y otros reactivos del cultivo de célula se obtuvieron de Life Technologies, GibcoBRL, ahora Invitrogen, Gaithersburg, MD). JetPEI se compró en Polyplus-Transfection (Illkirch, Francia).

Líneas de célula: Se generaron células de ovario de hámster
10 Chino establemente transfectadas (CHO-K1) (ATCC CCL81, American Type Culture Collection, Rockville, MD) expresando P2X₃ de rata recombinante como se describe por (Hemmings y otros, NAR 31 (2003), 2117-2126). Las células CHO se cultivaron en medio esencial mínimo (MEM-a) suplementado con 10% (v/v) de FBS, 2 mM de
15 glutamina en una cámara humidificada con CO₂ al 5%. Las células HeLa se cultivaron en medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM 41965) suplementado con 10% (v/v) de FBS, 2 mM de glutamina en una cámara humidifica con CO₂ al 5%.

Síntesis del oligonucleótido: Los oligoribonucleótidos se
20 compraron en Qiagen o se sintetizaron utilizando química de fósforoamidita TOM, como se describe por el fabricante (Qiagen) y se purificaron a través de RP-HPLC. Los oligoribonucleótidos de 3'-hidroxipropilfosfato se sintetizaron en un soporte sólido LM-17 (cargando: 14 µmoles/g). La elongación de la cadena de
25 oligonucleótido, la división del soporte y la desprotección y

purificación son idénticas a aquellas de oligoribonucleótidos de 21-mer teniendo 2 desoxinucleótidos como terminales 3'.

La pureza se evaluó a través de electroforesis de gel capilar. La cuantificación se llevó a cabo a través de UV de acuerdo con el
5 coeficiente de extinción a 260 nM. El templado del ARN de estructura de cadena doble (ARNds) se llevó a cabo como se describe en cualquier lugar (Elbashir y otros, Methods 26 (2002), 199-213). Las secuencias de oligonucleótidos que se utilizaron en este reporte se listan en el Cuadro 1 y se caracterizan a través de espectroscopia de
10 masa de electroaspersión.

Transfección de la célula: Se prepararon mezclas de lípido-oligonucleótido catiónico (Oligofectamina) y polímero-oligonucleótido (jetPEI) inmediatamente antes de la transfección como se describió previamente. Dieciocho horas antes de la transfección se colocaron
15 en placas 4×10^4 células en placas de 24 cavidades en un volumen de 0.5 ml de MEM-a para células CHO o 0.5 ml de DMEM para células HeLa (ambas suplementadas con 10% (v/v) de FBS, 2 mM de glutamina) por cavidad. Antes de la transfección, el medio de crecimiento se removió de las células y se reemplazó con 500 μ l de
20 OptiMEM y 100 μ l de reactivo de transfección/mezcla de oligonucleótido. Las placas se incubaron a 37°C en un incubador con CO₂ al 5% humidificado. Después de 4 horas, se agregaron 60 μ l de FBS a cada cavidad, y la incubación se prolongó a 20 horas.

Cosecha de ARN y análisis de ARNm PCR cuantitativo en
25 Tiempo Real: El ARN total se aisló 24 horas antes de la transfección

del oligonucleótido con el equipo RNeasy 96 (Qiagen, Chatsworth, CA) de acuerdo con e protocolo del fabricante. Las muestras de ARN se mezclaron con reactivos del equipo Q-PCR mastermix de Transcriptasa Inversa (Eurogentec) y se corrieron de acuerdo con el
5 protocolo incluido.

3.2 Actividad de ARNsi de extremo romo

Una línea de células CHO expresando el receptor de purito P2X₃ se utilizó para comparar la actividad relativa de los diferentes
10 inhibidores de ARNm tales como la primera y segunda generación de oligonucleótidos (ASO) así como ARNs de interferencia cortos. El uso de PEI como reactivo de transfección "universal" permitió llevar a cabo comparaciones cara a cara entre estos varios inhibidores de la expresión del gen. La secuencia de ARNsi se seleccionó de una
15 secuencia ASO óptima previamente caracterizada (Dorn y otros, Antisense & Nucleic Acid Drug Development 11 (2001): 165- 174), y se diseñó para activar la secuencia de codificación P2X₃ y ha demostrado que eficientemente y selectivamente regula de manera descendente la expresión de P2X₃ a nivel molecular, según
20 demostrado por Q-RT-PCR, inmunodetección y el ensayo funcional. Como un control positivo, se utilizó la secuencia de ARNsi que dos terminales modificadas 2'-MOE complementarias objetivo, enlazadas a través de un enlace internucleosídico de fósforotioato. Después se sintetizó el ARNsi terminado romo de 19-mer correspondiente, por lo
25 que después de la división mediada por amoniaco a partir del soporte

sólido, el compuesto liberado sustenta un grupo hidroxipropilfosfato (hpp) en la posición 3' de su último ribonucleótido.

Como un intermediario entre el ARNsi de 21-mer (dos terminales complementarias) y el de 19-mer terminado romo, también se sintetizó una secuencia homóloga de 21-nt de ARNsi con dos terminales de nucleósido abásicas. Dichas terminales no nucleosídicas permitieron evaluar si uno de los pasos involucrados en la trayectoria de ARNi, y más particularmente durante la disolución del dúplex, absolutamente requerirá una elongación 3' en ARNsi.

Los ARNsis se transfectaron en células CHO utilizando JetPEI a una relación N/P de 5. Los niveles de ARNm se evaluaron a través de RT-Q-PCR 24 horas después de la transfección. Como se muestra en la Figura 2, se detectó una disminución en el nivel del ARNm GAPDH en células CHO con un nivel comparable de regulación descendente para los tres compuestos. El ARNsi de 19 bp terminado romo teniendo un ribonucleótido 3'-hidroxipropilfosfato muestra la misma eficacia en la inhibición de ARNm P2X₃ como ARNsi de 21-mer de "tipo silvestre".

Ahora se aplica una modificación con formato similar para ARNsi que activa un gen endógeno y se diseña la secuencia de ARNsi que active el ANRm GAPDH de hámster chino en una forma que también es específica y completamente homóloga al gen GAPDH humano. Después de la transfección en células CHO de ARNsi de 21-mer (dos terminales de desoxiribonucleótido) y ARNsi 3'-

hidroxipropilfosfato (19-mer) terminado a concentraciones en la escala de 25 a 200 nM, el análisis RT-Q-PCR de nivel de ARNm GAPDH de hámster chino mostró una regulación descendiente de ARNm equivalente para los dos compuestos, aunque la regulación descendientes es ligeramente menos pronunciada en el caso de un ARNsi de "tipo silvestre" a altas concentraciones. Sin embargo, cuando se transfectaron a las mismas concentraciones con el lípido catiónico Oligofectamina, ambos compuestos mostraron exactamente la misma inhibición de ARN.

Tomados juntos, estos datos muestran que la modificación o ausencia de terminales oligonucleotídicas en el extremo 3' de ARNsis en las células CHO no es crítico con respecto a su actividad de interferencia.

3.3 Actividad de ARNsi de extremos romos en células de ser humano

Para validar este primer resultado en células de ser humano, se diseñó la secuencia de ARNsi que activa el marco de lectura abierto de ARNm GAPDH humano. Ambos tipo de ARNsis, de extremo romo o de tipo silvestre silencian el GAPDG humano en células HeLa con el mismo nivel de regulación descendiente objetivo (Figura 3).

3.4 Requerimientos funcionales del extremo 3' de ARNsis de extremo romo

Habiendo mostrado en dos diferentes líneas de células de

43
42

mamífero y contra los objetivos que la reducción de las terminales no perjudica la actividad de silenciar los ARNsis de extremos romos resultante, también se evaluó si la posición del ribonucleótido 3' en el primer ribonucleótido 3' de un ARNsi de extremo romo requeriría
5 que una porción química específica fuera óptima en el proceso de silenciar.

Como se muestra en la Figura 4, ambos ARNsis de 3'-hidroxi y 3'-fosfato conducen a un nivel similar de regulación descendiente de ARN GAPDH activado en células HeLa como el ARNsi de 21-mer de
10 tipo silvestre, con una alta selectividad según comparado con los tres controles de diferencias nt.

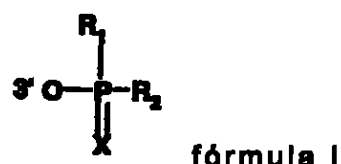
15

20

25

REIVINDICACIONES

1. ARN de estructura de cadena doble con por lo menos un extremo romo que comprende por lo menos un extremo 3' de la fórmula:



en donde

10 X es O o S

R₁ y R₂ son independientemente OH, NH₂, SH, alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-alquilo, en donde el alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-alquilo pueden estar substituidos por átomos heterogéneos adicionales y grupos funcionales, preferiblemente un átomo heterogéneo seleccionado del grupo que consiste de N, O, o S o un grupo funcional seleccionado del grupo OH, NH₂, SH, ácido o éster carboxílico;

o, R₁ y R₂ pueden ser de la fórmula Y-Z en donde Y es O, N, S y Z es H, alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-alquilo, en donde el alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-alquilo pueden estar substituidos por átomos heterogéneos adicionales, preferiblemente un átomo heterogéneo seleccionado del grupo de N, O, o S;

y en donde dicho ARN de estructura de cadena doble media la interferencia de ARN.

25 2. El ARN de estructura de cadena doble de acuerdo con la

reivindicación 1, en donde R_1 es OH.

3. El ARN de estructura de cadena doble de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 que comprende una región de 15 a 30 nucleótidos complementarios para un gen objetivo.

5 4. El ARN de estructura de cadena doble de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, en donde R_1 y R_2 son independientemente OH, NH_2 , SH, alquilo inferior, arilo inferior, alquil-arilo inferior, aril-alquilo inferior, en donde el alquilo inferior, arilo inferior, alquil-arilo inferior, aril-alquilo inferior pueden estar substituidos por átomos
10 heterogéneos adicionales y grupos funcionales, preferiblemente un átomo heterogéneo seleccionado del grupo de N, O o S, o un grupo funcional seleccionado de OH, NH_2 , SH, ácido o éster carboxílico; o, R_1 y R_2 pueden ser de la fórmula Y-Z en donde Y es O, N, S, B y Z es alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-alquilo, en donde el alquilo, arilo, alquil-arilo, aril-alquilo, se pueden substituir por átomos
15 heterogéneos adicionales, preferiblemente un átomo heterogéneo seleccionado del grupo de N, O o S, siempre que no ambos R_1 y R_2 sean OH.

5. El ARN de estructura de cadena doble de acuerdo con la
20 reivindicación 1, 2, 3 o 4, en donde R_1 es OH y R_2 comprende de 1 a 24 átomos de carbono.

6. El ARN de estructura de cadena doble de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3, 4 o 5, en donde dicho ARN comprende dos extremos romos.

25 7. El ARN de estructura de cadena doble de acuerdo con las

reivindicaciones 1-5 en donde Z es uno o más nucleósidos abásicos.

8. Un método para inhibir un gen objetivo que comprende la introducción de una célula dentro de un ARNds de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

5 9. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el gen objetivo es un gen asociado con patógeno, un gen viral o un oncogen.

10 10. Un equipo que comprende reactivos para la inhibición de expresión de un gen objetivo en una célula, en donde dicho equipo comprende ARNds de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en una célula y medios para la introducción de un ARNds dentro de una célula en una cantidad suficiente para inhibir la expresión del gen objetivo.

15 11. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de por lo menos un ARNds de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la inhibición de un gen objetivo.

20 12. Un método para identificar y/o caracterizar agentes farmacológicos que actúan en por lo menos una proteína objetivo que comprende: poner en contacto una célula eucariótica capaz de expresar por lo menos un gen endógeno que codifica la proteína(s) de interés con

(a) por lo menos una molécula de ARNds de acuerdo con la presente invención, la cual es capaz de inhibir la expresión del gen(es) que codifican la proteína(s) de interés y

25 (b) una sustancia de prueba o una colección de sustancias

de prueba en donde las propiedades farmacológicas de dicha
substancia de prueba o dicha colección van a ser identificadas y/o
caracterizadas.

13. El uso de un ARN de estructura de cadena doble de
5 acuerdo con las reivindicaciones 1-6 para la inhibición de un gen
objetivo.

10

15

20

25

48
47

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Novartis AG
<120> Compuestos Orgánicos
<130> 4-33332A
<160> 30
<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1
<211> 21
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido
<220>
<221> varios_aspectos
<222> (20)..(21)
<223> ribonucleósido 2'-metoxietil, enlace fosforotioato

<400> 1
acuccaucca gccgagugaa g 21

<210> 2
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido
<220>
<221> varios_aspectos
<222> (20)..(21)
<223> ribonucleósido 2'-metoxietil, enlace fosforotioato

<400> 2
ucacucggcu ggauggagut t 21

<210> 3
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<220>
<221> varios_aspectos
<222> (19)..(19)
<223> hidroxipropilfosfodiéster

<400> 3
acuccaucca gccgaguga 19

<210> 4
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<220>
<221> varios_aspectos
<222> (19)..(19)
<223> hidroxipropilfosfodiéster

<400> 4
ucacucggcu ggauggagu 19

<210> 5
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucileótido

<220>
<221> varios_aspectos
<222> (19)..(19)
<223> fosfato

<400> 5
acuccaucca gccgaguga 19

<210> 6
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<220>
<221> varios_aspectos
<222> (19)..(19)
<223> fosfato

<400> 6
ucacucggcu ggauggagu 19

<210> 7
<211> 19
<212> ARN

50
49

<213> Artificial		
<220>		
<223> oligonucleótido		
<220>		
<221> varios_aspectos		
<222> (19)..(19)		
<223> abásico_abásico		
<400> 7		
acuccaucca gccgaguga	19	
<210> 8		
<211> 19		
<212> ARN		
<213> Artificial		
<220>		
<223> oligonucleótido		
<220>		
<223> varios_aspectos		
<222> (19)..(19)		
<223> abásico_abásico		
<400> 8		
ucacucggcu ggauggagu	19	
<210> 9		
<211> 21		
<212> ADN		
<213> Artificial		
<220>		
<223> oligonucleótido		
<400> 9		
ucgaaguacu cagcguaagt t	21	
<210> 10		
<211> 21		
<212> ADN		
<213> Artificial		
<220>		
<223> oligonucleótido		
<400> 10		
cuuacgcuga guacuucgat t	21	
<210> 11		
<211> 21		

<212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <220>
 <221> varios_aspectos

 <222> (20)..(21)
 <223> ribonucleósido 2'-metoxietil

 <400> 11
 ggccauccac agucuucugg g 21

 <210> 12
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artififcial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 12
 cagaagacug uggauggccu u 21

 <210> 13
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <220>
 <221> varios_aspectos
 <222> (20)..(21)
 <223> ribonucleósido 2'-metoxietil

 <400> 13
 ggccagccac auucgucuug g 21

 <210> 14
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 14
 aagacgaaug uggcuggccu u 21

 <210> 15
 <211> 19

52
51

<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<220>
<221> varios_aspectos

<222> (19)..(19)
<223> hidroxipropilfosfodiéster

<400> 15
ggccauccac agucuucug

<210> 16
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<220>
<221> varios_aspectos

<222> (19)..(19)
<223> hidroxipropilfosfodiéster

<400> 16
cagaagacug uggauggcc 19
<210> 17
<211> 19

<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<220>
<221> varios_aspectos
<222> (19)..(19)
<223> hidroxipropilfosfodiéster

<400> 17
ggccagccac auucgucuu 19

<210> 18
<211> 19
<212> ARN

<213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

<220>
 <221> varios_aspectos
 <222> (19)..(19)
 <223> hidroxipropilfosfodiéster

<400> 18
 aagacgaaug uggcuggcc 19

<210> 19
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

<220>
 <221> varios_aspectos
 <222> (20)..(21)
 <223> ribonucleósido 2'-metoxietil

<400> 19
 cauguaguug aggucaauga a 21

<210> 20
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

<400> 20
 caugaccuc aacuacaugu u 21

<210> 21
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

<220>
 <221> varios_aspectos
 <222> (20)..(21)
 <223> ribonucleósido 2'-metoxietil

<400> 21
 cauguagauug augucgauga a 21

54
53

<210> 22
<211> 21
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 22
caucgacauc aucuacaugu u 21

<210> 23
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<220>
<221> varios_aspectos
<222> (19)..(19)
<223> hidroxipropilfosfodiéster

<400> 23
cauguaguug aggucaaug 19

<210> 24
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<220>
<221> varios_aspectos
<222> (19)..(19)
<223> hidroxipropilfosfodiéster

<400> 24
caugaccuc aacuacaug 19

<210> 25
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<220>
<221> varios_aspectos
<222> (19)..(19)

58
54

<223> hidroxipropilfosfodiéster

<400> 25

cauguagaug augucgaug

19

<210> 26

<211> 19

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<220>

<221> varios aspectos

<222> (19) .. (19)

<223> hidroxipropilfosfodiéster

<400> 26

caucgacauc aucuacaug

19

<210> 27

<211> 19

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 27

cauguagaug augucgaug

19

<210> 28

<211> 19

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 28

caugaccuc aacuacaug

19

<210> 29

<211> 19

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<220>

<221> varios aspectos

<222> (19) .. (19)

56
53

<223> fosfato

<400> 29
cauguagaug augucgaug 19

<210> 30
<211> 19
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

<220>
<221> varios aspectos
<222> (19)..(19)
<223> fosfato

<400> 30
caugaccuc aacuacaug 19

P2X₂ rec-células CHO: JetPEI™ Transfección 24h, 3 concentraciones

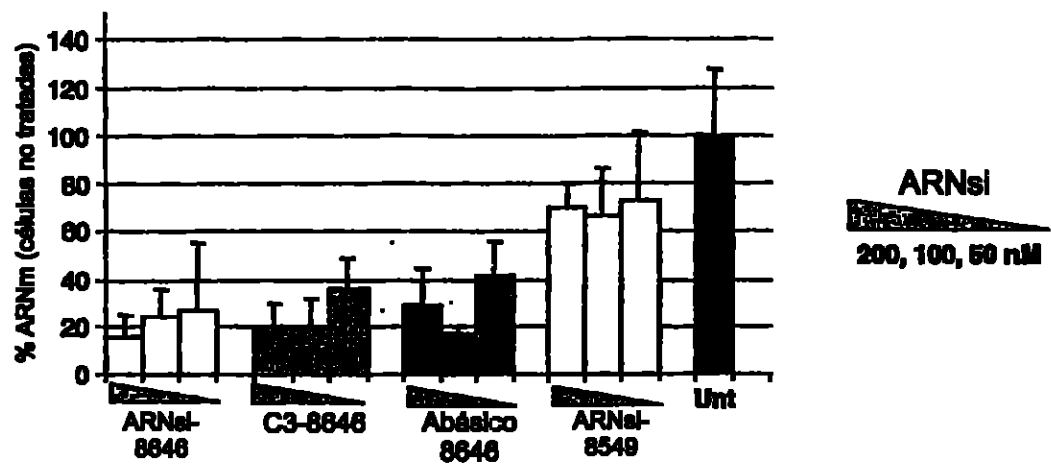


FIG. 1

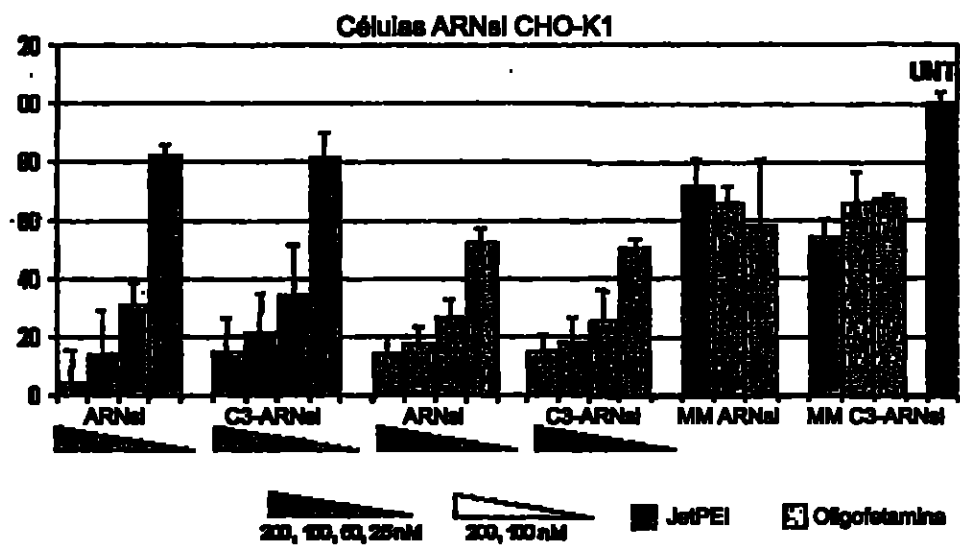


FIG. 2

58
57

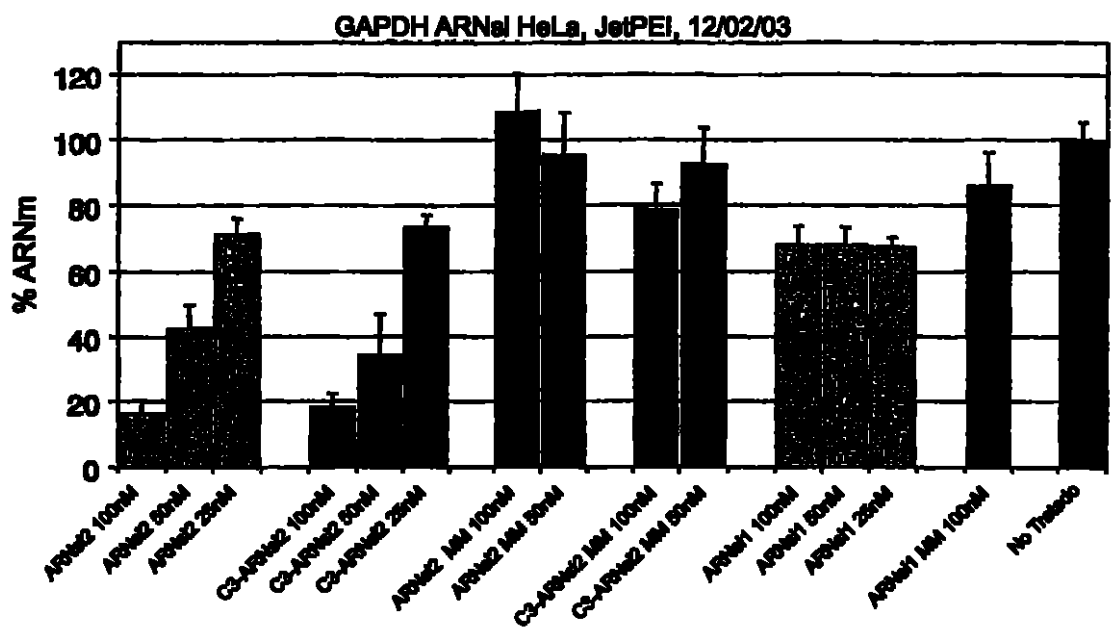


FIG. 3

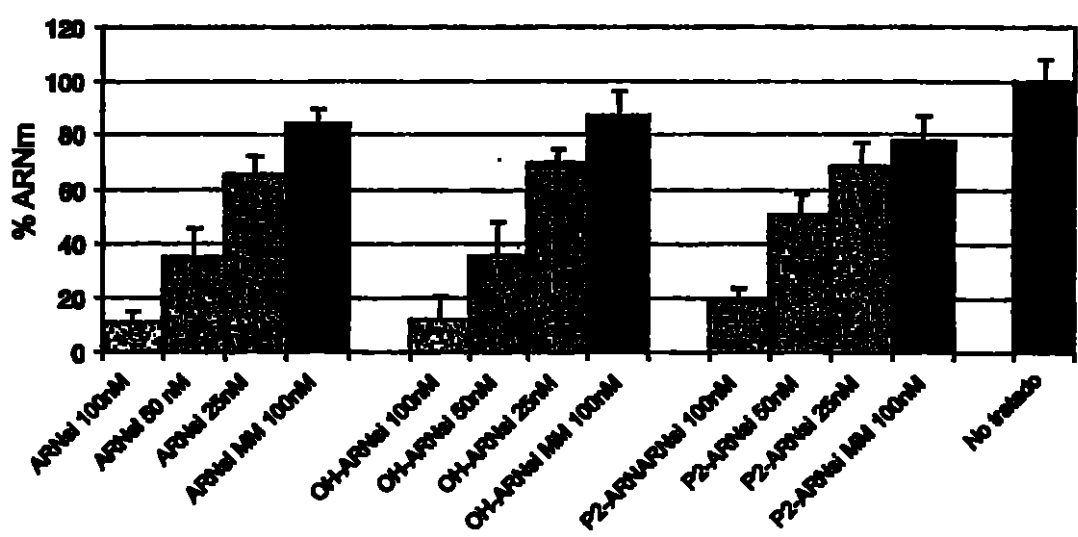


FIG. 4

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date/
10 March 2005 (10.03.2005)

PCT

(18) International Publication Number
WO 2005/021749 A1

(51) International Patent Classification²: C12N 15/11,
A61K 48/00

CH-4147 Aesch (CH). HÄNER, Robert [CH/CH];
Scheuermattweg 23, CH-3043 Uetdigen (CH).

(21) International Application Number:
PCT/EP2004/009599

(74) Agent: GRUBB, Philip; Novartis AG, Corporate Intellec-
tual Property, CH-4002 Basel (CH).

(22) International Filing Date: 27 August 2004 (27.08.2004)

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, M, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60498,514 28 August 2003 (28.08.2003) US

(71) Applicant (for all designated States except AT, US): NO-
VARTIS AG [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel
(CH).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,
SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for AT only): NOVARTIS PHARMA GMBH
[AT/AT]; Brunner Strasse 59, A-1230 Vienna (AT).

(72) Inventors; and

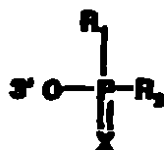
(75) Inventors/Applicants (for US, only): WEILER, Jan
[DE/DE]; Kandelstrasse 4, 79541 Litrach-Hangen (DE).
HALL, Jonathan [GB/CH]; Ramsteinweg 19, CH-4143
Dornach (CH). BOLOGNA, Jean-Charles [FR/CH]; 10,
rue du Grand-Pont, CH-1950 Sion (CH). NATI, François,
Jean-Charles [FR/CH]; Traugott Meyer-Strasse 5,

Published:

— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: INTERFERING RNA DUPLEX HAVING BLUNT-ENDS AND 3'-MODIFICATIONS



(I)

(57) Abstract: The present invention relates to double-stranded RNA compounds with
at least one blunt end comprising at least one 3'-end of Formula (I): wherein X is O or S, R₁
and R₂ are independently OH, NH₂, SH, alkyl, aryl, alkyl-aryl, aryl-alkyl, where alkyl,
aryl, alkyl-aryl, aryl-alkyl can be substituted by additional heteroatoms and functional
groups, preferably a heteroatom selected from the group of N, O, or S or a functional
group selected from the group OH, NH₂, SH, carboxylic acid or ester; or R₁ and R₂ may

be of formula Y-Z where Y is O, N, S and Z is H, alkyl, aryl, alkyl-aryl, aryl-alkyl, where alkyl, aryl, alkyl-aryl, aryl-alkyl can
be substituted by additional heteroatoms, preferably a heteroatom selected from the group of N, O, or S; and wherein said double-
stranded RNA mediates RNA interference. Preferred 3'-end modifications are: phosphate, phosphorothioate, abasic ribonucleoside,
hydroxyphosphoryl phosphodiester.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.
PCT/EP2004/009599

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/11 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CZAUDENA F ET AL: "Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 31, no. 11, 1 June 2003 (2003-06-01), pages 2705-2716, XP002270732 ISSN: 0305-1048 abstract; Page 2707, left-hand column; page 2710, left-hand column; figures 1-4 -/-	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"G" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 December 2004

Date of mailing of the international search report

21/12/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. 6616 Patentamt 2
NL - 2200 HV The Hague
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-8018

Authorized officer

Faust1, S

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 8, 9, 12 and 13 are directed (or can be directed) to methods of treatment of the human/animal body or equivalent in vivo testing procedures, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.
PCT/EP2004/009599

61 62

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HAMADA M ET AL: "EFFECTS OF RNA INTERFERENCE IN GENE EXPRESSION (RNAI) IN CULTURED MAMMALIAN CELLS OF MISMATCHES AND THE INTRODUCTION OF CHEMICAL MODIFICATIONS AT THE 3'-ENDS OF siRNAs" ANTISENSE & NUCLEIC ACID DRUG DEVELOPMENT, MARY ANN LIEBERT, INC., NEW YORK, US, vol. 12, no. 5, October 2002 (2002-10), pages 301-309, XP009006637 ISSN: 1087-2906 abstract; paragraph joining pages 304 and 305; figure 3	1-6,8-13
X	WO 02/096927 A (SANDBERG JENNIFER ; CHIRON CORP (US); ESCOBEDO JAIME (US); GORDON GILA) 5 December 2002 (2002-12-05) abstract; page 44, line 23 - page 45, line 17	1-13
P,X	EP 1 389 637 A (ATUGEN AG) 18 February 2004 (2004-02-18) abstract; page 6, lines 3-25; tables 1 and 2	1-13
P,X	WO 2004/015107 A (ATUGEN AG ; GIESE KLAUS (DE); KAUFMANN JOERG (DE); KLIPPEL-GIESE ANKE) 19 February 2004 (2004-02-19) abstract; page 12; table 1 on page 14	1-13
P,X	WO 03/070918 A (MOKLER VICTOR ; FOSNAUGH KATHY (US); JAMISON SHARON (US); MACEJAK DENN) 28 August 2003 (2003-08-28) paragraph joining pages 65 and 66; table I, compounds 135, 137, 140 and 141; figure 22	1-13
E	WO 2004/092383 A (BHARAT CHOWIRA ; HAEBERLI PETER (US); MCSWIGGEN JAMES (US); SIRNA THER) 28 October 2004 (2004-10-28) page 16, last paragraph; page 88, last paragraph; figure 10	1-13
E	WO 2004/090105 A (DHARMACON INC ; FEDEROV YURIY (US); LEAKE DEVIN (US); KHVOROVA ANGELA) 21 October 2004 (2004-10-21) page 48, line 21 - line 26 page 97, line 6 - line 22; claims 8,9,170,171	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.
PCT/EP2004/009599

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02096927	A	05-12-2002	US 2004077565 A1	22-04-2004
			CA 2448320 A1	05-12-2002
			EP 1390385 A2	25-02-2004
			WO 02096927 A2	05-12-2002
			US 2004102389 A1	27-05-2004
			US 2004220128 A1	04-11-2004
			US 2004142895 A1	22-07-2004
			US 2003216335 A1	20-11-2003
			US 2004209832 A1	21-10-2004
			US 2004198682 A1	07-10-2004
EP 1389637	A	18-02-2004	EP 1389637 A1	18-02-2004
			WO 2004015107 A2	19-02-2004
			US 2004180351 A1	16-09-2004
WO 2004015107	A	19-02-2004	EP 1389637 A1	18-02-2004
			WO 2004015107 A2	19-02-2004
			US 2004180351 A1	16-09-2004
WO 03070918	A	28-08-2003	CA 2455447 A1	12-09-2003
			CA 2455506 A1	28-08-2003
			CA 2456444 A1	28-08-2003
			CA 2457528 A1	28-08-2003
			CA 2459532 A1	28-08-2003
			CA 2463595 A1	28-08-2003
			CA 2471421 A1	28-08-2003
			CA 2476112 A1	28-08-2003
			CA 2476394 A1	28-08-2003
			CA 2477014 A1	28-08-2003
			EP 1432724 A1	30-06-2004
			EP 1463842 A1	06-10-2004
			EP 1472265 A2	03-11-2004
			EP 1465910 A2	13-10-2004
			EP 1423404 A2	02-06-2004
			EP 1442143 A2	04-08-2004
			EP 1448590 A2	25-08-2004
			EP 1432725 A1	30-06-2004
			EP 1478730 A2	24-11-2004
			EP 1476574 A2	17-11-2004
			EP 1476458 A2	17-11-2004
			EP 1472267 A2	03-11-2004
			EP 1448580 A2	25-08-2004
			EP 1430157 A2	23-06-2004
			EP 1476459 A2	17-11-2004
			EP 1458741 A2	22-09-2004
			EP 1476457 A2	17-11-2004
			EP 1474433 A2	10-11-2004
			EP 1472269 A1	03-11-2004
			EP 1470256 A2	27-10-2004
			EP 1470257 A2	27-10-2004
			EP 1436314 A2	14-07-2004
			EP 1423406 A2	02-06-2004
			GB 2396864 A	07-07-2004
			GB 2396155 A	16-06-2004
			GB 2396616 A	30-06-2004
			GB 2397062 A	14-07-2004
			GB 2397818 A	04-08-2004
			WO 03072590 A1	04-09-2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.
PCT/EP2004/009599

63 64

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03070918	A		WO 03072704 A2	04-09-2003
			WO 03072705 A2	04-09-2003
			WO 03070983 A1	28-08-2003
			WO 03070742 A1	28-08-2003
			WO 03070881 A2	28-08-2003
			WO 03070884 A2	28-08-2003
			WO 03070885 A2	28-08-2003
			WO 03070886 A2	28-08-2003
			WO 03070743 A1	28-08-2003
			WO 03070887 A2	28-08-2003
WO 2004092383	A	28-10-2004	US 2004110296 A1	10-06-2004
			US 2004192626 A1	30-09-2004
			WO 2004092383 A2	28-10-2004
			WO 2004097020 A2	11-11-2004
			WO 03106476 A1	24-12-2003
			US 2004209831 A1	21-10-2004
WO 2004090105	A	21-10-2004	US 2004198640 A1	07-10-2004
			WO 2004090105 A2	21-10-2004

21.02.2006
DC/4-33332A
Denis Bourgairel

OFFACT
PCT
EP2004/009599

BERATION TREATY

Corporate Intellectual Property

22 Dez. 2004

F/F M/D F/L PS Copy

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

64

To:

NOVARTIS AG
Corporate Intellectual Property
Attn. Grubb, Philip
4002 Basel
SWITZERLAND

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing (day/month/year)	21/12/2004
Applicant's or agent's file reference DC/4-33332A	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/EP2004/009599	International filing date (day/month/year) 27/08/2004
Applicant NOVARTIS AG	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the International search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 18:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 48):

When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no International search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the International application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the International application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for International publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an International preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 18 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for International preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority



European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Anu Evers

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

66
65

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the letter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 48.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 286(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 42.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequences if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence).

Consequences with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, where upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/selected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/selected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference DC/4-33332A	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/EP2004/009599	International filing date (day/month/year) 27/08/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 28/08/2003
Applicant NOVARTIS AG		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 7 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,

☐ the text is approved as submitted by the applicant.

☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

INTERFERING RNA DUPLEX HAVING BLUNT-ENDS AND 3'-MODIFICATIONS

5. With regard to the abstract,

☐ the text is approved as submitted by the applicant.

☒ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regards to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2004/009599

68

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

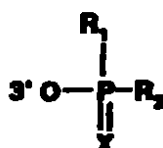
PCT/EP2004/009599

20
69

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

ABSTRACT

The present invention relates to double-stranded RNA compounds with at least one blunt end comprising at least one 3'-end of formula



wherein

X is O or S

R₁ and R₂ are independently OH, NH₂, SH, alkyl, aryl, alkyl-aryl, aryl-alkyl, where alkyl, aryl, alkyl-aryl, aryl-alkyl can be substituted by additional heteroatoms and functional groups, preferably a heteroatom selected from the group of N, O, or S or a functional group selected from the group OH, NH₂, SH, carboxylic acid or ester;

or R₁ and R₂ may be of formula Y-Z where Y is O, N, S and Z is H, alkyl, aryl, alkyl-aryl, aryl-alkyl, where alkyl, aryl, alkyl-aryl, aryl-alkyl can be substituted by additional heteroatoms, preferably a heteroatom selected from the group of N, O, or S;

and wherein said double-stranded RNA mediates RNA interference.

Preferred 3'-end modifications are: phosphate, phosphothioate, deoxyribonucleoside, hydroxypropyl phosphochiester.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/009599

70

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/11 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CZAUDERNA F ET AL: "Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 31, no. 11, 1 June 2003 (2003-06-01), pages 2705-2716, XP002270732 ISSN: 0305-1048 abstract; Page 2707, left-hand column; page 2710, left-hand column; figures 1-4 -/-	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *T* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

S document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 December 2004

Date of mailing of the international search report

21/12/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patenthaus 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fausti, S

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HAMADA M ET AL: "EFFECTS OF RNA INTERFERENCE IN GENE EXPRESSION (RNAI) IN CULTURED MAMMALIAN CELLS OF MISMATCHES AND THE INTRODUCTION OF CHEMICAL MODIFICATIONS AT THE 3'-ENDS OF siRNAs" ANTISENSE & NUCLEIC ACID DRUG DEVELOPMENT, MARY ANN LIEBERT, INC., NEW YORK, US, vol. 12, no. 5, October 2002 (2002-10), pages 301-309, XP009006637 ISSN: 1087-2906 abstract; paragraph joining pages 304 and 305; figure 3	1-6,8-13
X	WO 02/096927 A (SANDBERG JENNIFER ; CHIRON CORP (US); ESCOBEDO JAIME (US); GORDON GILA) 5 December 2002 (2002-12-05) abstract; page 44, line 23 - page 45, line 17	1-13
P,X	EP 1 389 637 A (ATUGEN AG) 18 February 2004 (2004-02-18) abstract; page 6, lines 3-25; tables 1 and 2	1-13
P,X	WO 2004/015107 A (ATUGEN AG ; GIESE KLAUS (DE); KAUFMANN JOERG (DE); KLIPPEL-GIESE ANKE) 19 February 2004 (2004-02-19) abstract; page 12; table 1 on page 14	1-13
P,X	WO 03/070918 A (MOKLER VICTOR ; FOSNAUGH KATHY (US); JAMISON SHARON (US); MACEJAK DENN) 28 August 2003 (2003-08-28) paragraph joining pages 65 and 66; table I, compounds 135, 137, 140 and 141; figure 22	1-13
E	WO 2004/092383 A (BHARAT CHOWIRA ; HAEBERLI PETER (US); MCSWIGGEN JAMES (US); SIRNA THER) 28 October 2004 (2004-10-28) page 16, last paragraph; page 88, last paragraph; figure 10	1-13
E	WO 2004/090105 A (DHARMACON INC ; FEDEROV YURIY (US); LEAKE DEVIN (US); KHVOROVA ANGELA) 21 October 2004 (2004-10-21) page 48, line 21 - line 26 page 97, line 6 - line 22; claims 8,9,170,171	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2004/009599

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 8, 9, 12 and 13 are directed (or can be directed) to methods of treatment of the human/animal body or equivalent in vivo testing procedures, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/009599

23

74

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02096927	A	05-12-2002	US 2004077565 A1 22-04-2004
			CA 2448320 A1 05-12-2002
			EP 1390385 A2 25-02-2004
			WO 02096927 A2 05-12-2002
			US 2004102389 A1 27-05-2004
			US 2004220128 A1 04-11-2004
			US 2004142895 A1 22-07-2004
			US 2003216335 A1 20-11-2003
			US 2004209832 A1 21-10-2004
			US 2004198682 A1 07-10-2004
EP 1389637	A	18-02-2004	EP 1389637 A1 18-02-2004
			WO 2004015107 A2 19-02-2004
			US 2004180351 A1 16-09-2004
WO 2004015107	A	19-02-2004	EP 1389637 A1 18-02-2004
			WO 2004015107 A2 19-02-2004
			US 2004180351 A1 16-09-2004
WO 03070918	A	28-08-2003	CA 2455447 A1 12-09-2003
			CA 2455506 A1 28-08-2003
			CA 2456444 A1 28-08-2003
			CA 2457528 A1 28-08-2003
			CA 2459532 A1 28-08-2003
			CA 2463595 A1 28-08-2003
			CA 2471421 A1 28-08-2003
			CA 2476112 A1 28-08-2003
			CA 2476394 A1 28-08-2003
			CA 2477014 A1 28-08-2003
			EP 1432724 A1 30-06-2004
			EP 1463842 A1 06-10-2004
			EP 1472265 A2 03-11-2004
			EP 1465910 A2 13-10-2004
			EP 1423404 A2 02-06-2004
			EP 1442143 A2 04-08-2004
			EP 1448590 A2 25-08-2004
			EP 1432725 A1 30-06-2004
			EP 1478730 A2 24-11-2004
			EP 1476574 A2 17-11-2004
			EP 1476458 A2 17-11-2004
			EP 1472267 A2 03-11-2004
			EP 1448580 A2 25-08-2004
			EP 1430157 A2 23-06-2004
			EP 1476459 A2 17-11-2004
			EP 1458741 A2 22-09-2004
			EP 1476457 A2 17-11-2004
			EP 1474433 A2 10-11-2004
			EP 1472269 A1 03-11-2004
			EP 1470256 A2 27-10-2004
			EP 1470257 A2 27-10-2004
			EP 1436314 A2 14-07-2004
			EP 1423406 A2 02-06-2004
			GB 2396864 A 07-07-2004
			GB 2396155 A 16-06-2004
			GB 2396616 A 30-06-2004
			GB 2397062 A 14-07-2004
			GB 2397818 A 04-08-2004
			WO 03072590 A1 04-09-2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP2004/009599

74/25

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03070918 A		WO 03072704 A2	04-09-2003
		WO 03072705 A2	04-09-2003
		WO 03070983 A1	28-08-2003
		WO 03070742 A1	28-08-2003
		WO 03070881 A2	28-08-2003
		WO 03070884 A2	28-08-2003
		WO 03070885 A2	28-08-2003
		WO 03070886 A2	28-08-2003
		WO 03070743 A1	28-08-2003
		WO 03070887 A2	28-08-2003
WO 2004092383 A	28-10-2004	US 2004110296 A1	10-06-2004
		US 2004192626 A1	30-09-2004
		WO 2004092383 A2	28-10-2004
		WO 2004097020 A2	11-11-2004
		WO 03106476 A1	24-12-2003
		US 2004209831 A1	21-10-2004
WO 2004090105 A	21-10-2004	US 2004198640 A1	07-10-2004
		WO 2004090105 A2	21-10-2004

PATENT COOPERATION TREATY

26
75

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2004/009599

International filing date (day/month/year)
27.08.2004

Priority date (day/month/year)
28.08.2003

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
C12N15/11, A61K48/00

Applicant
NOVARTIS AG

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523858 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Fausti, S

Telephone No. +49 89 2399-7389



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2004/009599

77
76

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
☒ in written format
☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
☒ contained in the international application as filed.
☒ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2004/009599

3.6
77

Box No. II Priority

1. ☐ The following document has not been furnished:

☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis.1 and 66.7(a)).

☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis.1 and 66.7(b)).

Consequently it has not been possible to consider the validity of the priority claim. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.

2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. ☒ It has not been possible to consider the validity of the priority claim because a copy of the priority document was not available to the ISA at the time that the search was conducted (Rule 17.1). This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.

4. Additional observations, if necessary:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No. **PCT/EP2004/009599**

79
78

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, Inventive step and Industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
☒ claims Nos. 8, 9 and 13 (with respect to industrial applicability)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 8, 9 and 13 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
- | | |
|----------------------------|--|
| the written form | ☐ has not been furnished |
| | ☐ does not comply with the standard |
| the computer readable form | ☐ has not been furnished |
| | ☐ does not comply with the standard |
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No. **PCT/EP2004/009599**

8.0
29

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(I) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	-
	No: Claims	1-13
Inventive step (IS)	Yes: Claims	-
	No: Claims	1-13
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-7,10-12
	No: Claims	-

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

and /or

2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

N.1 Claims 8, 9, 12 and 13 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT, namely methods of treatments of the human/animal body. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. DOCUMENTS.

Reference is made to the following documents:

- D1: Czauderna F. et Al., *Nucleic Acids Research* (2003) Vol. 31, No. 11, Pages 2705-2716;
- D2: Hamada M. et Al., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* (2002) Vol. 12, No. 5, Pages 301-309;
- D3: WO 02/096927 A;
- D4: EP1389637 A;
- D5: WO 2004/015107 A;
- D6: WO 03/070918 A;
- D7: WO 2004/092383 A;
- D8: WO 2004/090105 A;

- 1.1 D1 teaches that overhangs are not essential for RNA interference in mammalian cells (see figure 2 and the paragraph of the left-hand column on page 2707).
- 1.1^a In addition, D1 discloses oligonucleotide chemical modifications, which are similar to the ones used to stabilize conventional antisense molecules and ribozymes, for the purpose of increasing siRNA stability and resistance to nuclease degradation (see the left-hand column of page 2710, figures 1 and 3). In particular, the oligonucleotide modifications proposed in D1 are the internal 2'-O-methylation and

42
81

terminal modifications of the 5'- and/or 3'-ends with inverted abasic nucleosides or aminoalkylphosphate moieties.

- ()
- 1.2 D2 discloses the effects on RNAi of the chemical modification of the 3'-end(s) in siRNAs (see the abstract and the paragraph joining pages 304 and 305). In particular, D2 discloses the replacement of at least one of the ribonucleosides on the 3' overhang of the siRNA with 2-hydroxyethylphosphate or locked nucleoside moieties (see figure 3). Moreover, D2 points out that RNA interference is prevented depending on the nature of the chemical modification at the 3'-ends of the RNA duplex.
- 1.3 D3 discloses nucleic acid molecules, e.g. ds RNA and siRNA, which comprise a 5' and/or 3'-cap structure for protecting the nucleic acid molecules from nuclease degradation (see abstract and page 44, lines 23-29). In particular, D3 discloses a list of preferred 3'-cap structures, among which phosphate derivatives, phosphorothioates, phosphoramidates and inverted abasic nucleosides (see page 45, lines 8-17).
- ()
- 1.4 D4-D8 disclose interfering RNA molecules in duplex forms with blunt end(s) and 3'-end modifications (see D4: abstract; page 6, lines 3-25; tables 1 and 2) (see D5: abstract; page 12; table 1 on page 14) (see D6: paragraph joining pages 65 and 66; table I, compounds 135, 137, 140 and 141; figure 22) (see D7: page 16, last paragraph; page 88, last paragraph; figure 10) (see D8, page 48, lines 22-26; page 97, second paragraph; claims 8, 9, 170, 171).
2. INDUSTRIAL APPLICABILITY (Art. 33(4) PCT).
- 2.1 For the assessment of the present claims 8, 9 and 13 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.
- 2.1^a Claims 8, 9, 12 and 13 relate to methods and uses for the inhibition of a target



453
32

gene, which can be carried out in vivo on the human/animal body (see also the description on page 7, last paragraph).

- 2.2 Claims 1-7, 10 and 11 relate to RNA duplex mediating RNA interference, kits and pharmaceutical compositions thereof, which can be made in the pharmaceutical industry, hence they are to be considered industrially applicable according to Article 33(4) PCT.

3. NOVELTY (Art. 33(2) PCT) and INVENTIVE STEP (Art. 33(3) PCT).

- 3.1 In view of the lack of clarity and the interpretation given to the claim definition (see point C.1 below), the subject-matter of claim 1 cannot be considered novel because it is anticipated, for example, by the interfering RNA duplex structures with 3'-overhangs (wherein the overhang eventually consists of modified nucleosides) and/or 3'-cap structures disclosed in D1, D2 and D3 (see points 1.1^a, 1.2 and 1.3 above).

- 3.2 Independently from the observation above, the subject-matter of claim 1 lacks also an inventive step over D1, taken alone or in combination with D2 or D3.

- 3.2^a D1 is considered to represent the relevant state of the art because it discloses that dsRNAs with blunt-ends effectively mediate RNA interference (see point 1.1 above).

- 3.2^b The problem to be solved can therefore be regarded as the provision of blunt-ended dsRNAs with improved stability towards nuclease degradation.

- 3.2^c The solution proposed in claim 1 consists in the 3'-end terminal modification of the RNA molecules, which comprises a phospho-ester linkage. This solution cannot be considered as involving any inventive step because the prior art suggests/discloses many of these 3'-end modifications for the purpose of improving the stability of interfering RNAs against nuclease degradation, irrespective of the presence of overhang moieties (see points 1.1^a, 1.2 and 1.3 above). The skilled person would therefore have attempted to solve the problem posed by introducing any of these stabilizing 3'-end terminal modifications in the new blunt-end siRNA forms of D1, thereby obtaining dsRNAs according to claim 1.

- 3.3 Dependent claims 2-7 do not contain any features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the requirements of the PCT in

84
83

respect of novelty and/or inventive step, given the disclosure of the prior art.

- 3.4 The subject-matter of claims 8-13 cannot be considered as being novel and/or involving an inventive step in so far as the dsRNA of independent claim 1 does not fulfil the same requirements because the prior art also concern medical and pharmaceutical uses of the disclosed interfering dsRNAs (see for example the abstracts of D1, D2 and D3).

Re Item VI

Certain documents cited

Certain published documents

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
EP 1389637	18.02.2004	05.08.2002	-
WO 2004/015107	19.02.2004	05.08.2003	05.08.2002
WO 03/070918	28.08.2003	20.02.2003	20.02.2002
WO 2004/092383	28.10.2004	13.04.2004	15.04.2003
WO 2004/090105	21.10.2004	01.04.2004	02.04.2003

Re Item VIII

Certain observations on the international application

C. CLARITY and CONCISENESS (Art. 6 PCT).

- C.1 The subject-matter of claim 1 is unclear with respect to the blunt end feature of the claimed dsRNA because of the broad possibilities of substitution at the 3'-capping moiety of formula I (see "...can be substituted by additional heteroatoms..." in claim 1). Moreover, the present application discloses 3'-end modified RNA molecules, which correspond to dsRNAs having overhangs of modified nucleosides (see table 1). The application does not clearly indicate if these unblunted dsRNAs are embodiments of the invention or part of the prior art.

C.1" Hence, the term "blunt end" is not clear in the claim context and cannot be

considered as limiting the claim scope with respect to the possibility of having overhang moieties of few oligonucleotides at the 3'-end.

- C.2 The expression "according to the present invention" used in claim 12 is vague and leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical features of the dsRNA molecule to which it refers, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claim unclear.
- C.3 Although claims 8 and 13 have been drafted as separate independent claims, they appear to relate effectively to the same subject-matter and to differ from each other only with regard to the definition of the subject-matter for which protection is sought or in respect of the terminology used. The aforementioned claims therefore lack conciseness and as such do not meet the requirements of Article 6 PCT.
- C.4 The aspect of the invention described on page 8 (see the third paragraph) does not fall within the scope of the claims. This inconsistency between the claims and the description leads to doubt concerning the matter for which protection is sought, thereby rendering the claims unclear.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación: 86827608 00000000

Fecha (AMD): 2006-03-21 14:16:28

Trámite: 011 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTA

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 87

35

Delegatura de Propiedad Industrial División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

PATENTE DE INVENCION ()	MODELO DE UTILIDAD ()	USUARIO ()	RADICADOR ()
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	✓	()	✓
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	✓	()	✓
-Descripción de la invención.	✓	()	✓
-Dibujos de ser estos pertinentes.	X	()	X
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	✓	()	✓
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()	()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

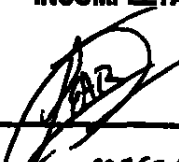
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable:

Fecha:


marzo 21 de 2006.

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 06 – 027688

Fecha: 21 DE MARZO DE 2.006

Se certifica que:

Desde fecha 16 de abril de 1997,
del folio 90.643 al folio 90.650 del libro de
Protocolo N° 311 , obra el poder N° 17.398
conferido por NOVARTIS AG (NOVARTISSA)
(NOVARTIS INC.) domiciliado(a) en Basilea - Suiza al
doctor JIMENA ESCOBAR URIBE y/o IGNACIO
ESCOBAR URIBE.

Representante en Bogotá D.C. : Los mismos.

Facultad para desistir y sustituir: SI.

Revisado iramos.

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Commutador: 534 12 21-2-3-4
Fax: 261 31 25 e-mail: info@ic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

87
Folio 96

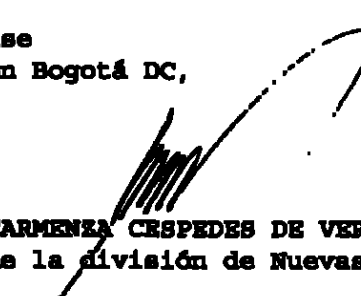
2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
ESCOBAR URIBE JIMENA
Apoderado(a) y/o Representante de
NOVARTIS AG

REFERENCIA	Radicación No.	06 27688
	Solicitud internacional	EP2004/009599
	Fecha inicio fase nacional	28/03/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	873
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,


ALIX CARMONA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

jramos