(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 280 826**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/11 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **03784183 .0**
(86) Fecha de presentación : **05.08.2003**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1527176**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **04.05.2005**

(54) Título: **Nuevas formas adicionales de moléculas de ARN interferentes.**

(30) Prioridad: **05.08.2002 EP 02017601**
12.08.2002 US 402541 P
10.04.2003 EP 03008383

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

(73) Titular/es: **atugen AG.**
Robert-Rössle-Strasse 10
13125 Berlin, DE

(72) Inventor/es: **Giese, Klaus;**
Kaufmann, Jörg y
Klippel-Giese, Anke

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 280 826 T3

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

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Nuevas formas adicionales de moléculas de ARN interferentes.

La presente invención se refiere a un ácido ribonucleico que comprende una estructura bicatenaria, en el que la estructura bicatenaria comprende una primera cadena y una segunda cadena, en la que la primera cadena comprende un primer segmento de nucleótidos contiguos y en la que dicho primer segmento es al menos parcialmente complementario del ácido nucleico objetivo, y la segunda cadena comprende un segundo segmento de nucleótidos contiguos en la que dicho segundo segmento es al menos parcialmente idéntico a un ácido nucleico objetivo, al uso de dicho ácido ribonucleico, a una célula y un organismo, que comprenden respectivamente, dicho ácido ribonucleico, a una composición que contiene dicho ácido ribonucleico, a una composición farmacéutica que contiene dicho ácido ribonucleico y a un procedimiento para inhibir la expresión de un gen identificado.

La interferencia mediada por ARN (iARN) es un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional iniciado por el ARN bicatenario (ARNbc) homólogo en secuencia con el gen silenciado (Fire (1999), *Trends Genet*. 15, 358-63, Tuschl, *et al*. (1999), *Genes Dev*. 13, 3191-7, Waterhouse, *et al*. (2001), *Nature* 411, 834-42, Elbashir, *et al*. (2001), *Nature* 411, 494-8, para una revisión véase Sharp (2041), *Genes Dev*. 15, 485-90, Barstead (2001), *Curr. Opin. Chem. Biol*. 5, 63-6). La iARN se ha usado mucho para determinar la función génica en una serie de organismos, incluidas plantas (Baulcombe (1999), *Curr. Opin. Plant. Biol*. 2, 109-13), nematodos (Montgomery, *et al*. (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 95,15502-7), *Drosophila* (Kennerdell, *et al*. (1998), *Cell* 95, 1017-26, Kennerdell, *et al*. (2000), *Nat. Biotechnol*. 18, 896-8). En el nematodo *C. elegans* aproximadamente una tercera parte del genoma ya se ha sometido a análisis funcional por iARN (Kim (2001), *Curr. Biol*. 11, R85-7, Maeda, *et al*. (2001), *Curr. Biol*. 11, 171-6).

Hasta hace poco, la iARN no se podía aplicar en general en células de mamíferos, con la excepción del desarrollo prematuro de ratón (Wianny, *et al*. (2000), *Nat. Cell. Biol*. 2, 70-5). El descubrimiento de que la transfección de dúplex de 21 nt en células de mamíferos interfería con la expresión de genes y no inducía una respuesta antivírica dirigida por interferón independiente de la secuencia obtenida normalmente con el ARNbc largo, ha conducido a nuevas aplicaciones potenciales en células de mamíferos diferenciadas (Elbashir *et al*. (2001), *Nature* 411, 494-8). Es interesante que estos ARN de interferencia pequeños (ARNip) se parecen a los productos de procesamiento a partir de ARNbc largos, lo que sugiere un potencial mecanismo de desviación en células diferenciadas de mamíferos. Se ha identificado el complejo Dicer, un miembro de la familia de la ARNasa III, necesario para el procesamiento inicial del ARNbc (Bernstein, *et al*. (2001), *Nature* 409,363-6, Billy, *et al*. (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 98,14428-33). Uno de los problemas que se han encontrado previamente cuando se han usado ribooligonucleótidos no modificados era la rápida degradación en células o incluso en el medio que contiene suero (Wickstrom (1986), *J. Biochem. Biophys. Methods* 13, 97-102, Cazenave, *et al*. (1987), *Nucleic Acids Res*. 15,10507-21). Dependerá de la función particular del gen y de los sistemas de ensayo usados si el respectivo bloqueo inducido por el ARNip operado se mantendrá suficiente tiempo para alcanzar un cambio fenotípico.

Parrish S. *et al*. (*Molecular Cell*, vol. 6, 1077-1087, noviembre, 2005) describe los requisitos de los ARNbc que se dirigen al gen unc-22 de *C. elegans*. Más específicamente, se investiga el impacto de la modificación química de diferentes nucleótidos, en el que si un nucleótido es modificado depende de la naturaleza química del nucleótido.

La solicitud de patente internacional publicada WO 02/055693 describe el uso de moléculas de ARNi que tienen una estructura bicatenaria, en la que dichas moléculas de ARNi tienen un extremo protuberante en uno de los extremos formado por 1-4 nucleótidos.

La solicitud de patente internacional publicada WO 02/044321 describe el uso de moléculas de ARNi que tienen una estructura bicatenaria, en la que dichas moléculas de ARNi tienen una longitud de 19-23 pares de nucleótidos.

La solicitud de patente internacional publicada WO 95/13834 describe compuestos oligonucleósidos quiméricos que son útiles para activar la escisión mediada por la ARNasa H de secuencias de ácidos nucleicos objetivo. Más específicamente, dichos compuestos oligonucleósidos quiméricos son oligonucleótidos monocatenarios que son complementarios de un ácido nucleico objetivo.

El problema subyacente de la presente invención era proporcionar moléculas de ARN de interferencia sintéticas que sean tanto estables como activas en el entorno bioquímico tal como una célula viva.

El problema subyacente de la presente invención se resuelve por el objeto de la solicitud de las reivindicaciones independientes adjuntas. Se pueden coger realizaciones preferidas de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que se pueden diseñar ARN de interferencia pequeños de modo que sean tanto altamente específicos como activos, así como estables en las condiciones de reacción que se encuentran típicamente en sistemas biológicos, tales como ensayos bioquímicos o entornos celulares. Los diferentes ARN de interferencia descritos en la técnica anterior, tal como por Tuschl *et al*. (solicitud de patente internacional WO 01/75164) tienen una longitud de 21 a 23 nucleótidos y una modificación en el extremo 3' del ARN bicatenario. Sorprendentemente, los autores de la presente invención han encontrado que el problema de estabilidad del ARN de interferencia, incluido el ARN de interferencia pequeño (ARNip) que en general en esta memoria se

denomina en lo sucesivo ARNi, reside realmente en el ataque de las endonucleasas más que de las exonucleasas como se pensaba antes. Basándose en este descubrimiento, los autores de la presente invención han considerado varias estrategias, que son el objetivo de la presente solicitud.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a nuevas formas de ARN de interferencia como se definen en la reivindicación 1. El ARNi consiste en un ácido ribonucleico que comprende una estructura bicatenaria. Dicha estructura bicatenaria está formada por una primera cadena y una segunda cadena. Dicha primera cadena comprende un segmento de nucleótidos contiguos, también denominados primer segmento de nucleótidos contiguos en esta memoria, y este primer segmento es al menos parcialmente complementario de un ácido nucleico objetivo. Dicha segunda cadena comprende también un segmento de nucleótidos contiguos, en el que dicho segundo segmento es al menos parcialmente idéntico a un ácido nucleico objetivo. La estructura básica de este ácido ribonucleico se muestra de forma esquemática en la figura 1. Dicha primera cadena y dicha segunda cadena se hibridan preferiblemente entre sí y forman la estructura bicatenaria. La hibridación se produce típicamente por apareamiento de bases de Watson y Crick. Sin embargo, el ácido ribonucleico de la invención no está necesariamente limitado en su longitud a dicha estructura bicatenaria. Se pueden añadir más nucleótidos a cada cadena y/o a cada extremo de cualquiera de las cadenas que forman el ARNi. Dependiendo de la secuencia particular de la primera cadena y de la segunda cadena, la hibridación o apareamiento de bases no es necesariamente completo o perfecto, lo cual significa que el primer y segundo segmentos no son 100% pares de bases debido a apareamientos erróneos. También puede haber uno o más apareamientos erróneos en el dúplex. Dichos apareamientos erróneos no tienen efecto en la actividad de ARNi si están situados fuera de un segmento de preferiblemente 15, 16 ó 17 nucleótidos apareados. Si los apareamientos erróneos están situados para dar sólo 15 o menos nucleótidos apareados contiguos, la molécula de ARNi típicamente muestra una menor actividad en la reducción de la expresión del ARNm para un objetivo dado, comparado con un dúplex de 17 nucleótidos apareados.

El primer segmento de nucleótidos contiguos de la primera cadena es esencialmente complementario a un ácido nucleico objetivo, más preferiblemente a una parte del ácido nucleico objetivo. Complementario, tal como se usa en esta memoria, preferiblemente significa que la secuencia de nucleótidos de la primera cadena hibrida con una secuencia de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico objetivo o una parte de la misma. Típicamente, la secuencia de ácido nucleico objetivo o el ácido nucleico objetivo, de acuerdo con el modo de acción de los ácidos ribonucleicos de interferencia, es un ARN monocatenario, más preferiblemente un ARNm. Lo más probable es que dicha hibridación se produzca por el apareamiento de bases de Watson y Crick, sin embargo, no está limitada a la misma. La medida en la que dicha primera cadena, y más en particular dicho primer segmento de nucleótidos contiguos de dicha primera cadena, es complementaria a una secuencia de ácido nucleico objetivo, puede ser tan grande como 100% y tan pequeña como 80%, preferiblemente 80-100%, más preferiblemente 85-100%, lo más preferiblemente 90-100%. Parece que la complementaridad óptima es 95-100%. La complementaridad en este sentido significa que el intervalo de nucleótidos mencionado, tal como, p. ej., 80-100%, dependiendo del intervalo particular, de los nucleótidos tienen un apareamiento de bases de Watson y Crick perfecto. En un aspecto de la presente invención se muestra que la complementaridad entre dicho primer segmento de nucleótidos y el ARN objetivo tiene que ser 18-19 nucleótidos, los segmentos tan cortos como 17 nucleótidos, incluso con dos extremos protuberantes de secuencia específica, no son funcionales en la mediación de la iARN. Por consiguiente, dado un dúplex que tiene una longitud de 19 nucleótidos o pares de bases, sería aceptable una complementaridad mínima de 17 nucleótidos o pares de bases de nucleótidos, permitiendo un apareamiento erróneo de dos nucleótidos. En el caso de un dúplex que consiste en 20 nucleótidos o pares de bases estaría permitido y sería funcionalmente activo una complementaridad de 17 nucleótidos o pares de bases de nucleótidos. Se aplica lo mismo a un dúplex de 21 nucleótidos o pares de bases con una complementaridad total de 17 nucleótidos o pares de base. Básicamente el grado de complementaridad requerida para una longitud de un dúplex, es decir de una estructura bicatenaria, también se puede basar en la temperatura de fusión del complejo formado por la estructura bicatenaria descrita en esta memoria o por el complejo del primer segmento de la primera cadena y el ácido nucleico objetivo.

Hay que entender que todos los ácidos ribonucleicos de la presente invención son adecuados para producir o para estar implicados en la interferencia mediada por ARN, tal como se describe, por ejemplo, en las solicitudes de patentes internacionales WO 99/32619, WO 00/44895 y WO 01/75164.

La primera estrategia de acuerdo con la cual se puede diseñar de acuerdo con la presente invención una molécula de ácido ribonucleico de interferencia según la reivindicación 1, es que tenga una longitud óptima de 18 ó 19 nucleótidos en el segmento que es complementario al ácido nucleico objetivo. También está dentro de la presente invención que dicha longitud óptima de 18 ó 19 nucleótidos es la longitud de la estructura bicatenaria en el ARNi usado. Este requisito de longitud es claramente diferente de la enseñanza técnica de la técnica anterior, tal como por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 01/75164. Está dentro de la presente invención que se puede realizar cualquier otro diseño, tanto de acuerdo con la presente invención como descrito en la técnica anterior, en relación con un ácido ribonucleico de interferencia que tenga dichas características de longitud, es decir una longitud de 18 ó 19 nucleótidos.

La segunda estrategia de acuerdo con la cual se puede diseñar una molécula de ácido ribonucleico de acuerdo con la reivindicación 1, es tener un grupo 5'-hidroxilo libre, también denominado en esta memoria grupo 5'-OH libre, en la primera cadena. Un grupo 5'-OH libre significa que el nucleótido más terminal que forma la primera cadena está presente y por lo tanto no está modificado, en particular no por una modificación en el extremo. Típicamente, el grupo 5'-hidroxi terminal de la segunda cadena, respectivamente, también está presente en una forma no modificada.

En una realización más preferida, el extremo 3' de la primera cadena y el primer segmento, respectivamente, no está modificado de modo que presente un grupo OH libre, que también se denomina en esta memoria grupo 3'-OH libre, de modo que el diseño del nucleótido terminal de 5' es uno de cualquiera de las realizaciones descritas antes. Preferiblemente dicho grupo OH libre también está presente en el extremo 3' de la segunda cadena y segundo segmento, respectivamente. En otras realizaciones de las moléculas de ácido ribonucleico descritas previamente de acuerdo con la presente invención, el extremo 3' de la primera cadena y primer segmento, respectivamente, y/o el extremo 3' de la segunda cadena y segundo segmento, respectivamente, pueden tener una modificación en el extremo, en el extremo 3'.

Tal como se usan en esta memoria, las expresiones grupo 5'-OH y grupo 3'-OH libres también indican que los respectivos nucleótidos más terminales en el extremo 5' y el extremo 3' del polinucleótido, respectivamente, presentan un grupo OH. Dicho grupo OH puede estar en el resto azúcar del nucleótido, más preferiblemente en la posición 5' en el caso del grupo 5'-OH y en la posición 3' en el caso del grupo 3'-OH, o en un grupo fosfato unido al resto azúcar de los respectivos nucleótidos terminales. En principio, el grupo fosfato puede estar unido a cualquier grupo OH del resto azúcar del nucleótido. Preferiblemente, el grupo fosfato está unido al grupo 5'-OH del resto azúcar en el caso del grupo 5'-OH libre y/o al grupo 3'OH del resto azúcar en el caso del grupo 3'-OH libre, proporcionando todavía lo que se denomina en esta memoria grupo 5' ó 3'-OH.

Tal como se usa en esta memoria, en cualquier estrategia para diseñar el ARNi o cualquier realización del ARNi descrita en esta memoria, la expresión modificación en el extremo significa una entidad química añadida al último nucleótido 5' ó 3' de la primera y/o segunda cadena. Los ejemplos de dichas modificaciones finales incluyen, pero no se limitan, (desoxi) abásico invertido, amino, flúor, cloro, bromo, CN, CF, metoxi, imidazol, caboxilato, tioato, alquilo inferior C_1 a C_{10}, alquilo inferior sustituido, alcarilo o aralquilo, OCF_3, OCN, O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alquenilo; $SOCH_3$; SO_2CH_3; ONO_2; NO_2, N_3; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino o sililo sustituido, como se describen, entre otros en las patentes europeas EP 0586520 B1 o EP 0618925 B1.

Tal como se usa en esta memoria, alquilo o cualquier expresión que comprenda "alquilo" significa cualquier cadena de átomos de carbono que comprende 1 a 12, preferiblemente 1 a 6 y más preferiblemente 1 a 2 átomos de C.

Otra modificación en el extremo es un grupo biotina. Dicho grupo biotina se puede unir preferiblemente al nucleótido final 5' o final 3' de la primera y/o segunda cadena o a ambos extremos. En una realización más preferida el grupo biotina se acopla a un polipéptido o proteína. También está dentro del alcance de la presente invención que el polipéptido o proteína se una por cualquiera de las modificaciones de los extremos mencionadas. El polipéptido o proteína puede conferir características adicionales a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Entre otros, el polipéptido o proteína puede actuar como un ligando a otra molécula. Si dicha otra molécula es un receptor, la función y actividad del receptor se pueden activar mediante el ligando de unión. El receptor puede mostrar una actividad de internalización que permite una transfección eficaz de las moléculas de ácido nucleico de la invención unidas al ligando. Un ejemplo del ligando que se va a acoplar a la molécula de ácido nucleico de la invención es el VEGF y el correspondiente receptor es el receptor VEGF.

En la siguiente tabla 1 se presentan diferentes posibles realizaciones del ARNi de la presente invención que tienen diferentes tipos de modificaciones en el extremo.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Diferentes realizaciones del ácido ribonucleico de interferencia de acuerdo con la presente invención

	1ª cadena/1er segmento	2ª cadena/ 2º segmento
1.) extremo 5'	OH libre	OH libre
extremo 3'	OH libre	OH libre
2.) extremo 5'	OH libre	OH libre
extremo 3'	modificación del extremo	modificación del extremo
3.) extremo 5'	OH libre	OH libre
extremo 3'	OH libre	modificación del extremo
4.) extremo 5'	OH libre	OH libre
extremo 3'	modificación del extremo	OH libre
5.) extremo 5'	OH libre	modificación del extremo
extremo 3'	OH libre	OH libre
6.) extremo 5'	OH libre	modificación del extremo
extremo 3'	modificación del extremo	OH libre
7.) extremo 5'	OH libre	modificación del extremo
extremo 3'	OH libre	modificación del extremo
8.) extremo 5'	OH libre	modificación del extremo
extremo 3'	modificación del extremo	modificación del extremo

Las diferentes modificaciones de los extremos como se describe en esta memoria, se sitúan preferiblemente en el resto ribosa de un nucleótido del ácido ribonucleico. Más en particular, la modificación del extremo se puede unir o puede sustituir a cualquiera de los grupos OH del resto ribosa, incluidas, pero no limitado, las posiciones 2'OH, 3'OH y 5'OH, con la condición de que el nucleótido así modificado sea un nucleótido terminal. Los abásicos invertidos son nucleótidos, sea desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, que no tienen un resto de nucleobase. Este tipo de compuestos, los describen, entre otros Sternberger *et al.* (2002), Antisense. *Nucl. Ac. Drug Dev.*, pendiente de publicación.

Se puede usar cualquiera de las modificaciones de los extremos mencionadas en relación con las diferentes realizaciones del ARNi presentadas en la tabla 1. En relación con esto, hay que indicar que cualquiera de las formas o realizaciones de ARNi descritas en esta memoria, estando la cadena homosentido inactivada, y preferiblemente con una modificación en el extremo, más preferiblemente en el extremo 5', son particularmente ventajosas. Esto viene de la inactivación de la cadena homosentido que corresponde a la segunda cadena de los ácidos ribonucleicos descritos en esta memoria, que de lo contrario podría interferir con un ARN monocatenario no relacionado en la célula. Por lo tanto, se influye de forma más específica en la expresión y más en particular en el patrón de traducción del transcriptoma de una célula. Este efecto también se denomina efecto fuera del objetivo. En relación con la tabla 1, las realizaciones presentadas como realizaciones 7 y 8 son particularmente ventajosas en el sentido anterior, puesto que la modificación da como resultado una inactivación de la parte -no específica del objetivo- del ARNi (que es la segunda cadena) reduciendo así cualquier interacción no específica de la segunda cadena con ARN monocatenario en un sistema celular o similar, en el que el ARNi de acuerdo con la presente invención se va a usar para bloquear ácidos ribonucleicos y proteínas específicos, respectivamente.

Una tercera estrategia objeto de la presente invención es realizar un ácido ribonucleico de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una estructura bicatenaria en el que la estructura bicatenaria comprende una primera cadena y una segunda cadena, en el que la primera cadena comprende un primer segmento de nucleótidos contiguos y en el que dicho primer segmento es al menos parcialmente complementaria a un ácido nucleico objetivo, y la segunda cadena comprende un segundo segmento de nucleótidos contiguos en el que dicho segundo segmento es al menos

parcialmente idéntico a un ácido nucleico objetivo, en el que la estructura bicatenaria tiene extremos romos. Cuando se usa en relación con la presente descripción, la expresión estructura bicatenaria también se denomina dúplex. Por lo tanto, este diseño de ARNi es claramente diferente, por ejemplo, del de Tuschl *et al*., especificado en la solicitud de patente WO 01/75164 que describe un extremo 3' protuberante. Tal como se usa en este documento extremo protuberante se refiere a una estructura bicatenaria en la que al menos un extremo de una cadena es más largo que el correspondiente extremo de la otra cadena que forma la estructura bicatenaria, la cual en esta memoria también se denomina contracadena. Preferiblemente, el primer segmento es idéntico a la primera cadena y el segundo segmento es idéntico a la segunda cadena.

Considerando la eficacia del ARNi de extremo romo y las ventajas de una modificación en el extremo sea de la primera o de la segunda cadena o de ambas, respectivamente, de los respectivos ácidos ribonucleicos, es preferible tener una combinación de ambos principios en el diseño. En otras palabras, está dentro de la presente invención tener un ARNi de extremo romo que lleve cualquier esquema de modificación en el extremo como se presenta en la tabla 1.

La cuarta estrategia objeto de la presente invención es tener un extremo protuberante en el extremo 5' del ácido ribonucleico de acuerdo con la reivindicación 1. Más en particular, dicho extremo protuberante en principio puede estar presente en cualquiera o tanto en la primera cadena como en la segunda cadena del ácido ribonucleico de acuerdo con la presente invención. La longitud de dicho extremo protuberante puede ser tan corta como un nucleótido y tan larga como de 2 a 8 nucleótidos, preferiblemente 2, 4, 6 u 8 nucleótidos. Está dentro de la presente invención que el extremo 5' protuberante puede estar situado en la primera cadena y/o la segunda cadena del ácido ribonucleico de acuerdo con la presente solicitud. El nucleótido o los nucleótidos que forman el extremo protuberante pueden ser desoxirribonucleótido(s), ribonucleótido(s) o una continuación de los mismos.

El extremo protuberante preferiblemente comprende al menos un desoxirribonucleótido, en el que dicho un desoxirribonucleótido preferiblemente es el 5' más terminal. Está dentro de la presente invención que el extremo 3' de la respectiva contracadena del ácido ribonucleico de la invención no tenga un extremo protuberante, más preferiblemente no un extremo protuberante de desoxirribonucleótido. Otra vez aquí, cualquiera de los ácido ribonucleicos de la invención puede comprenden un esquema de modificación en el extremo como se señala en relación con la tabla 1 y/o una modificación en el extremo como se señala en esta memoria.

La estrategia en el diseño de los ácidos ribonucleicos de interferencia de acuerdo con la reivindicación 1, reside en la formación de un determinado patrón de nucleótidos modificados tanto en el primer como en el segundo y más particularmente tanto en el primer como en el segundo segmento de nucleótidos contiguos del ácido o ácidos ribonucleicos de acuerdo con la presente invención. El tipo de modificación de dichos nucleótidos puede ser la misma discutida en relación con las otras estrategias de diseño de ARN de interferencia descritas en esta memoria, y más en particular el tipo de modificación descrita en esta memoria para o como una modificación del extremo, tales como, por ejemplo, abásicos invertidos, metoxi o amino y similares en el resto ribosa de al menos un nucleótido que forma los ácidos ribonucleótidos de acuerdo con la presente solicitud. Hay que indicar que la modificación de dichos nucleótidos puede ser cualquier forma de modificación descrita en esta memoria, más en particular el tipo de modificación descrita en esta memoria como modificación del extremo, y la llamada modificación en el extremo no está situada necesariamente en los nucleótidos terminales. Más bien la modificación se encuentra en un nucleótido no terminal. En dichas condiciones preferiblemente la modificación se une al resto ribosa del nucleótido que se va a modificar, e incluso más preferiblemente a la posición 2' del resto ribosa.

También está dentro de la presente invención que cualquier ácido ribonucleico de acuerdo con la reivindicación 1, también puede tener las características conferidas a un ácido ribonucleico de acuerdo con la reivindicación 1, por cualquiera de las estrategias de diseño descritas en esta memoria. Por consiguiente, el ácido ribonucleico de interferencia que tiene un patrón de nucleótidos modificado puede tener una modificación en el extremo, un esquema de modificación en el extremo, puede tener el extremo romo o puede tener un extremo 5' protuberante o cualquier combinación de dos o más de estos elementos o características.

A parte de las modificaciones mencionadas que se pueden presentar como modificaciones del extremo o como patrón de modificación, la cadena principal de ácido ribonucleico se puede modificar más formando diferentes uniones entre los nucleótidos. Dichas diferentes uniones, se describen, entre otros, en la patente europea EP 0586520 B1 y patente europea EP 0618925 B1. Tienen un interés particular aquí la modificación o modificaciones internas de la cadena principal de ácido ribonucleico que se ha visto que confieren mayor resistencia de los ribooligonucleótidos a las nucleasas. En una realización preferida la modificación del nucleótido modificado es una metoxilación del grupo 2'-OH del resto ribosa del nucleótido.

De acuerdo con la reivindicación 1, ambas cadenas, y más en particular tanto el primer segmento como el segundo segmento, muestran este tipo de modificación de los nucleótidos que forman dichas cadenas y segmentos, respectivamente. Tal como se usa en esta memoria, la expresión grupo de nucleótido modificado o grupo flanqueador del nucleótido puede comprender o representar tan pocos nucleótidos como un nucleótido, es decir, uno o más nucleótidos.

Considerando el segmento de nucleótidos contiguos, se puede llevar a cabo un patrón de modificación de los nucleótidos que forman el segmento, de modo que un solo nucleótido o un grupo de nucleótidos que están unidos covalentemente entre sí por los enlaces fosforodiéster convencionales, o al menos parcialmente por enlaces fosforotioato, muestren dicho tipo de modificación. En el caso de que dicho nucleótido o grupo de nucleótidos que también se deno-

minan en esta memoria grupo de nucleótidos modificados, no formen el extremo 5' o extremo 3' de este segmento, le sigue un nucleótido o grupo de nucleótidos a ambos lados del nucleótido que no tienen la modificación del nucleótido o grupo de nucleótidos precedente. Sin embargo, hay que indicar que este tipo de nucleótido o grupo de nucleótidos, pueden tener una modificación diferente. Este tipo de nucleótido o grupo de nucleótidos también se denominan en esta memoria grupo de nucleótidos flanqueadores. Esta secuencia de nucleótido modificado y grupo de nucleótidos modificados, respectivamente, y nucleótido no modificado o modificado de forma diferente o grupo de nucleótidos no modificados o modificados de forma diferente, se puede repetir una o varias veces. Preferiblemente, la secuencia se repite más de una vez. Por motivos de claridad, el patrón se discute con más detalle a continuación, en general en relación a un grupo de nucleótidos modificados o un grupo de nucleótidos no modificados en el que cada uno de dichos grupos puede comprender realmente tan poco como un solo nucleótido. Nucleótido no modificado, tal como se usa en esta memoria significa que no tienen ninguna de las modificaciones mencionadas en el nucleótido que forma el respectivo nucleótido o grupo de nucleótidos, o que tiene una modificación que es diferente de la del nucleótido y grupo de nucleótidos modificados, respectivamente.

También está dentro de la presente invención, que la modificación del nucleótido o nucleótidos no modificados en el que dicho nucleótido o nucleótidos no modificados están realmente modificados de una forma diferente de la modificación del nucleótido o nucleótidos modificados, puede ser igual o incluso diferente para los diferentes nucleótidos que forman dichos nucleótidos no modificados o para los diferentes grupos de nucleótidos flanqueadores.

El patrón de los nucleótidos modificados y no modificados puede ser tal que el nucleótido 5'-terminal de la cadena o segmento empiece con un grupo de nucleótidos modificados o empiece con un grupo de nucleótidos no modificados. Sin embargo, en una realización alternativa también es posible que el nucleótido 5'-terminal esté formado por un grupo de nucleótidos no modificados.

Este tipo de patrón se puede realizar en el primer segmento o en el segundo segmento del ARN de interferencia o en ambos. Hay que indicar que es necesario un 5'-fosfato en la cadena de dúplex de ARNip complementaria del objetivo para la función de ARNip, lo que sugiere que las células comprueban la autenticidad de los ARNip por un 5'-OH libre (que puede estar fosforilado) y sólo permite que dicho ARNip dirija la destrucción del ARN objetivo (Nykanen, *et al*. (2001), *Cell* 107, 309-21).

Está dentro de la presente invención que tanto el primer segmento como el segundo segmento tengan este tipo de patrón. Preferiblemente, el patrón de la modificación y no modificación es el mismo para tanto para el primer segmento como para el segundo segmento.

En una realización preferida el grupo de nucleótidos que forman el segundo segmento y correspondiente al grupo de nucleótidos modificados del primer segmento también se modifican, mientras que el grupo no modificado de nucleótidos de o que forma el segundo segmento corresponde al grupo de nucleótidos no modificados de o que forma el primer segmento. Esta posibilidad se representa esquemáticamente en la figura 2A. Otra alternativa es que haya un desplazamiento de fase del patrón de modificación del primer segmento y primera cadena, respectivamente, respecto al patrón de modificación del segundo segmento y segunda cadena, respectivamente. Preferiblemente, el desplazamiento es tal que el grupo de nucleótidos modificados de la primera cadena corresponde al grupo de nucleótidos no modificados de la segunda cadena y viceversa. Esta posibilidad se muestra en la figura 2B. También está dentro de la presente invención que el desplazamiento de fase del patrón de modificación no sea completo sino que se superponga como se ilustra en la figura 2C.

En una realización preferida el segundo nucleótido en el extremo del segmento y cadena, respectivamente es un nucleótido no modificado o el principio del grupo de nucleótidos no modificados. Preferiblemente, este nucleótidos no modificado o grupo de nucleótidos no modificados está situado en el extremo 5' de la primera y segunda cadena, respectivamente, e incluso más preferiblemente de la primera cadena. En otra realización preferida, el nucleótido no modificado o grupo de nucleótidos no modificados se sitúa en el extremo 5' de la primera cadena y primer segmento, respectivamente. En una realización preferida, el patrón consiste en nucleótidos individuales modificados y no modificados que alternan.

En otra realización preferida de este aspecto de la presente invención, el presente ácido ribonucleico de interferencia objetivo comprende dos cadenas, en el que se incorpora un nucleótido modificado con 2'-O-metilo y un nucleótido no modificado, preferiblemente un nucleótido que no está modificado con 2'-O-metilo, en ambas cadenas de una forma alternada, lo cual significa que cada dos nucleótidos hay un nucleótido modificado con 2'-O-metilo y uno no modificado, respectivamente. Esto significa que en la primera cadena un nucleótido modificado con 2'-O-metilo es seguido por un nucleótido no modificado que a su vez es seguido por un nucleótido modificado con 2'-O-metilo etc. Existe la misma secuencia de modificación con 2'-O-metilo y no modificación en la segunda cadena, de modo que preferiblemente hay un desplazamiento de fase de modo que el nucleótido modificado con 2'-O-metilo en la primera cadena forma apareamiento de bases con un nucleótido(s) no modificado(s) en la segunda cadena y viceversa. Esta particular disposición, es decir, el apareamiento de bases de nucleótido(s) modificado(s) con 2'-O-metilo y nucleótido(s) no modificado(s) en ambas cadenas es particularmente preferida en el caso de ácidos ribonucleicos cortos de interferencia, es decir ácidos ribonucleicos bicatenarios de bases apareadas cortos porque, aunque los autores de la presente invención no pretenden estar ligados por esta teoría, se supone que existe una cierta repulsión entre el apareamiento de dos bases de nucleótidos modificados con 2'-O-metilo que desestabilizaría dicho dúplex, preferiblemente dúplex cortos. Respecto a la particular disposición, se prefiere que la cadena antisentido empiece con un nucleótido modificado con 2'-

O-metilo en el extremo 5' de modo que por lo tanto el segundo nucleótido no está modificado, y así el tercero, quinto, séptimo etc. nucleótidos están otra vez modificados con 2'-O-metilo, mientras que el segundo, cuarto, sexto, octavo y similares nucleótidos son nucleótidos no modificados. Otra vez sin querer estar ligado por ninguna teoría, parece que se le puede atribuir una importancia particular a la segunda, y opcionalmente cuarta, sexta, octava y/o posiciones similares en el extremo 5'-terminal de la cadena antisentido que no debería comprender ninguna modificación, mientras que el nucleótido 5' más terminal, es decir el primer nucleótido 5'-terminal de la cadena antisentido puede presentar dicha modificación, sin que ninguna de las posiciones impares tales como la primera, opcionalmente tercera, quinta y posiciones similares de la cadena antisentido pueda estar modificada. En realizaciones adicionales la modificación y no modificación, respectivamente, del nucleótido o nucleótidos modificados y no modificados, respectivamente, puede ser cualquiera como se describe en esta memoria.

Aunque no está limitado, la estructura bicatenaria del ácido ribonucleico de la invención, que también se denomina dúplex, está formada por la primera cadena y la segunda cadena respectivamente, o por el primer y segundo segmento de nucleótidos contiguos. La longitud del primer segmento y segundo segmento, respectivamente, típicamente es de aproximadamente 15 a aproximadamente 23, preferiblemente 17 a 21, y más preferiblemente 18 ó 19 bases. En relación con esto hay que indicar que una longitud menor que 30 nucleótidos, preferiblemente menor que 21 nucleótidos no hace que ningún sistema biológico que sea básicamente capaz de mostrar interferencia por ARN y también respuesta de interferón, desarrolle una respuesta de interferón. La razón de esto reside en la observación de que una célula dada experimenta cambios fisiológicos profundos cuando un ARN bicatenario más largo de 30 pares de bases se une y activa la proteína quinasa PKR y la 2',5'-oligoadenilato-sintasa. La PKR activada para la traducción por fosforilación de elF2a, y 2',5'-AS activada produce la degradación del ARNm. Estos efectos no se desean en la validación de objetivos y modelos animales porque anulan el efecto del bloqueo específico del objetivo en el fenotipo.

De acuerdo con una sexta estrategia en el diseño de ácidos ribonucleicos de interferencia de acuerdo con la reivindicación 1, el ácido ribonucleico comprende una estructura bicatenaria, en el que la estructura bicatenaria comprende una primera cadena y una segunda cadena, en el que la primera cadena comprende un primer segmento de nucleótidos contiguos y en el que dicho primer segmento es al menos parcialmente complementario a un ácido nucleico objetivo, y la segunda cadena comprende un segundo segmento de nucleótidos contiguos en el que dicho segundo segmento es al menos parcialmente idéntico a un ácido nucleico objetivo y en el que un extremo de la primera cadena y un extremo de la segunda cadena están unidos por una estructura de bucle.

En una realización, la estructura de bucle está compuesta de un polímero de ácido no nucleico. Dicho polímero de ácido no nucleico puede ser polietilenglicol o polímeros similares. Los polímeros de ácido no nucleico en principio se pueden elegir del grupo que comprende polímeros que no comprenden un polinucleótido y permiten que las dos cadenas que se van a unir puedan realmente hibridar entre sí. Para permitir dicha hibridación la molécula o resto de la molécula que une los dos segmentos que hibridan entre sí, tiene que tener una determinada estructura molecular o flexibilidad molecular para permitir la flexión de la molécula para así permitir que ambos segmentos se pongan en contacto y se pongan en una orientación tridimensional que permita la hibridación. Dicha molécula o resto actúa realmente como una bisagra. En principio se puede usar cualquier molécula que cumpla dichos requisitos en relación con la presente invención. Además de polietilenglicol, se pueden usar moléculas basadas en aminoácidos. Dichas moléculas basadas en aminoácidos pueden ser homopolímeros o heteropolímeros. Un ejemplo útil es un homopolímero que consiste en siete restos glicina que permiten generar una bisagra como se requiere para acercar los dos segmentos cuanto sea necesario para hibridar. Describen esta bisagra basada en glicina, por ejemplo Guan K. L y Dixon J. E. (1991), *Anal. Biochem*. 192, 262. En otra realización la bisagra se puede formar con éteres corona conocidos en la técnica.

En una realización alternativa el bucle está compuesto de un ácido nucleico. Tal como se usa en esta memoria, LNA como describen Elayadi y Corey (2001) *Curr. Opin. Investig. Drugs*. 2(4):558-61, Revisión; Orum y Wengel (2001) *Curr. Opin. Mol. Ther*. 3(3): 239-43; y PNA se consideran ácidos nucleicos y también se pueden usar como polímeros que forman bucle. Básicamente, el extremo 5' de la primera cadena se puede unir al extremo 3' de la segunda cadena. Como alternativa, el extremo 3' de la primera cadena se puede unir al extremo 5' de la segunda cadena. La secuencia de nucleótidos que forma dicha estructura de bucle en general se considera que no es crítica. Sin embargo, la longitud de la secuencia de nucleótidos que forma dicho bucle parece que es crítica por razones estéricas. Por consiguiente, parece que es adecuada una longitud mínima de cuatro nucleótidos para formar la estructura de bucle requerida. En principio, el número máximo de nucleótidos que forman la bisagra o la unión entre ambos segmentos que van a hibridar no está limitado. Sin embargo, cuanto más largo es un polinucleótido, más probable es que se formen estructuras secundarias y terciarias y por lo tanto que afecten a la orientación requerida de los segmentos. Preferiblemente, un número máximo de nucleótidos que forman la bisagra es aproximadamente 12 nucleótidos. Está dentro de la descripción de esta solicitud que cualquiera de los diseños descritos antes se puede combinar con la presente estrategia sexta, es decir, uniendo las dos cadenas covalentemente de una forma que el doblado sobre sí mismo (bucle) se pueda producir por una estructura de bucle o estructura similar.

Los autores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que si el bucle está situado en 3' de la cadena antisentido, es decir, la primera cadena del ácido o ácidos ribonucleicos de acuerdo con la presente invención, las actividades de este tipo de ARNi son mayores comparado con la situación del bucle en 5' de la cadena antisentido. Por consiguiente, la disposición particular del bucle respecto a la cadena antisentido y la cadena homosentido, es decir, la primera cadena y segunda cadena, respectivamente, es crucial y por lo tanto contrasta con la opinión expresada en la técnica anterior, donde se decía que la orientación no era importante. Sin embargo, parece que esto no es cierto

dados los resultados experimentales presentados en esta memoria. La opinión expresada en la técnica anterior se basa en la suposición de que cualquier ARNi está sometido a un proceso durante el cual no se genera ARNi unido al bucle. Sin embargo, si este fuera el caso, no se podría explicar la mayor actividad claramente observada de las estructuras que tienen el bucle situado en 3' de la cadena antisentido. Por lo tanto una disposición preferida en la dirección 5' → 3' de esta clase de ARNi pequeño de interferencia es segunda cadena - bucle - primera cadena. Las respectivas construcciones se pueden incorporar en sistemas de vectores adecuados. Preferiblemente, el vector comprende un promotor para la expresión del ARNi. Preferiblemente, el respectivo promotor es pol III y más preferiblemente los promotores son los promotores U6, H1, 7SK descritos por Good y col. (1997) *Gene Ther.*, 4, 45-54.

Debido a la aplicabilidad general del concepto de ARN de interferencia y por lo tanto del bloqueo o desactivación de nucleótidos codificadores tal como un ARNm, se puede modificar la expresión de cualquier gen que produzca dicho ARN usando cualquier molécula de ácido ribonucleico de acuerdo con la presente invención. Debido a este mecanismo básico y de aplicación general, se puede realizar cualquier aplicación basada en el mismo que implique el bloqueo o desactivación de un gen. Una aplicación preferida es el uso del ácido ribonucleico de la invención para la validación de objetivos. Tal como se usa en esta memoria, por validación de objetivo se entenderá un procedimiento que implica considerar etapas para probar que un ADN, ARN o molécula de proteína está directamente implicada en un procedimiento biológico, preferiblemente en un procedimiento implicado causalmente en una enfermedad o afección no convencional y por lo tanto es un objetivo adecuado para el desarrollo de un nuevo compuesto terapéutico. Los estudios de homología de secuencias han clasificado satisfactoriamente los genes en familias de objetivos. El enorme trabajo de descifrar cuales de estos objetivos son jugadores clave en enfermedades y cuales habría que usar para el posterior desarrollo de fármacos debe abordarse de una forma eficaz. Por lo tanto, el bloqueo de la expresión génica debería reducirse en 50-100%, preferiblemente 90% para ver efectos significativos en el fenotipo. En otros casos dependiendo del gen, un bloqueo tan pequeño como 20% podría ser suficiente para dar un fenotipo. Un fenotipo se definirá comparando células que contienen moléculas de ARNi funcionales con células que contienen moléculas de ARNi no funcionales. Esto asegurará una lectura significativa incluso en condiciones en las que la función de la proteína es inhibida sólo parcialmente. En general, no hay una correlación lineal entre el grado de reducción de ARNm y el nivel del cambio en el fenotipo. Hay que admitir que para algunas proteínas una reducción de aproximadamente 20% de la proteína es suficiente para crear un cambio en el fenotipo, mientras que en el caso de otros genes y ARNm, respectivamente, tan poco como un 5% a 10% de proteína restante es suficiente para mantener el fenotipo observado.

Un uso adicional de las moléculas de ácido ribonucleico de acuerdo con la presente invención, es su uso en la fabricación de un medicamento o su uso como medicamento. Dicho medicamento se podría usar para el tratamiento y/o prevención de enfermedades o afecciones tales como cualquier tipo de cáncer en el que se ha ligado un gen o su producto con el inicio, causa o avance de esta enfermedad. Además, dicho medicamento se podría usar para tratar enfermedades en las que la presencia o la sobrexpresión de un producto génico produce un fenotipo patológico. En una realización preferida la enfermedad se caracteriza por una ganancia de la función y se puede remediar por aplicación o administración del correspondiente ARNi biológicamente activo. Las enfermedades o afecciones que se pueden tratar con el medicamento que comprende un ácido ribonucleico como se describe en esta memoria, se pueden seleccionar del grupo que comprende cáncer, enfermedades cardiacas, enfermedades metabólicas, enfermedades dermatológicas, enfermedades inflamatorias, trastornos del sistema inmunitario y trastornos autoinmunes. Las diferentes formas de cáncer incluyen, pero no se limitan, tumores sólidos y tumores del sistema hematopoyético, tales como glioblastoma, cáncer de próstata, cáncer de pecho, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer pancreático y leucemia. Las enfermedades metabólicas incluyen, pero no se limitan, obesidad y diabetes. Las enfermedades dermatológicas incluyen, pero no se limitan, psoriasis.

En otro aspecto las moléculas de ácido ribonucleico de acuerdo con la presente invención, se pueden usar como diagnósticos, preferiblemente para las enfermedades especificadas en relación con las enfermedades y afecciones mencionadas antes. Dichos diagnósticos se podrían basar en la observación de que tras aplicar las moléculas de ácido ribonucleico de acuerdo con la presente invención, a una muestra que preferiblemente contiene células, se produce un cambio en el patrón de expresión de la muestra. Preferiblemente, dicha muestra comprende células de un sujeto que se supone que puede presentar dicha enfermedad o afección para ser tratada o tiene una predisposición a la misma.

Una aplicación adicional de los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención, reside en su uso en la selección de compuestos farmacéuticamente activos y/o para la optimización. Esto último se hace comprobando o determinando el efecto de fármacos candidatos tales como moléculas pequeñas y comparando el efecto creado por dichos fármacos candidatos con el efecto observado tras administrar ARNi específico diseñado basándose en los principios descritos en esta memoria. Haciendo esto, se pueden eliminar los fármacos candidatos que tienen efectos fuera del objetivo del procedimiento de selección, mientras que los fármacos candidatos que crean un fenotipo similar o idéntico se consideran compuestos candidatos muy importantes o incluso pueden ser ellos mismos compuestos farmacéuticamente activos. En este enfoque las moléculas de ARNi altamente específicas actúan como patrón referencial frente a los fármacos candidatos que se miden.

En un aspecto adicional la invención se refiere a una célula, preferiblemente a una célula bloqueada, que contiene un ácido ribonucleico como se describe en esta memoria. Preferiblemente, dicha célula es una célula que se aisla o está contenida en un tejido o incluso un órgano que, otra vez, preferiblemente no está contenido en un organismo. Sin embargo, la célula también puede estar contenida en un organismo. Preferiblemente, la célula es una célula que está implicada en la enfermedad o afección que se va a tratar mediante los ácidos ribonucleicos de la invención. Este tipo de células bloqueadas se pueden usar para generar un perfil de expresión basado, por ejemplo, en el ARNm o proteína,

con el fin de elucidar la relación funcional y determinar objetivos secuencia abajo. En el caso de que la célula sea una célula humana, dicha célula humana es una célula humana aislada.

En un aspecto adicional la invención se refiere a un organismo que contiene un ácido ribonucleico como se describe en esta memoria. Preferiblemente, dicho organismo es un organismo vertebrado y más preferiblemente el organismo vertebrado es un mamífero. Tal como se usa en esta memoria, un mamífero es, entre otros y no se limita, un mono, un perro, un gato, una cabra, una oveja, un cerdo, una cobaya, un conejo, un ratón y una rata. El organismo es diferente de un ser humano.

Todavía en otro aspecto la presente invención se refiere a una composición que contiene un ácido ribonucleico de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente dicha composición comprende testigos negativos y positivos combinados con el ácido ribonucleico eficaz o separados del mismo. Dichas composiciones pueden comprender además un disolvente, preferiblemente un tampón.

En un aspecto adicional la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene un ácido ribonucleico de acuerdo con la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El experto en la técnica conoce los vehículos farmacéuticamente aceptables, y comprenden, entre otros, diluyentes, tampones y similares. La composición farmacéutica puede comprender otros compuestos farmacéuticamente activos. En este caso, la enfermedad o afección que se va a tratar usando las moléculas de ácido ribonucleico de acuerdo con la presente invención, son preferiblemente aquellas que ahora ya se usan en relación con el tratamiento de dichas enfermedades o afecciones. Debido al diferente modo de acción de las moléculas de ácido ribonucleico de acuerdo con la presente invención y de los medicamentos usados para el tratamiento de dichas enfermedades y afecciones de acuerdo con la técnica anterior, se producirán efectos sinérgicos.

La invención ahora se ilustra con más detalle con referencia a las figuras y ejemplos de los cuales se pueden tomar más características, realizaciones y ventajas de la presente invención.

La figura 1 muestra una ilustración esquemática que define la terminología usada en esta memoria. La superior de las dos cadenas es la primera cadena y la cadena antisentido del ácido nucleico identificado tal como ARNm. La segunda cadena es la que su secuencia corresponde esencialmente a la del ácido nucleico identificado y por lo tanto forma la cadena homosentido. Tanto la primera como la segunda cadena forman una estructura bicatenaria, típicamente por apareamiento de bases de Watson y Crick.

La figura 2 ilustra algunas realizaciones de las moléculas de ácido ribonucleico de la presente invención con patrones de grupos de nucleótidos modificados y no modificados, que también se denominan en esta memoria patrón de modificación. Los grupos de nucleótidos modificados también se denominan en esta memoria grupo de nucleótidos modificados. Los nucleótidos no modificados o grupos de nucleótidos no modificados denominados grupo(s) flanqueadore(s) de nucleótidos en esta memoria, tal como se usa en esta memoria también pueden tener una o varias de las modificaciones descritas en esta memoria, que, sin embargo, son diferentes de las modificaciones de los nucleótidos que forman el grupo o grupos de nucleótidos modificados. En la figura 2A los grupos de nucleótidos modificados y no modificados, es decir, los grupos de nucleótidos modificados y los grupos de nucleótidos flanqueadores tanto en el primer segmento como en el segundo segmento están situados en las correspondientes partes de los segmentos y por lo tanto están alineados entre sí (grupos de nucleótidos modificados en la primera cadena alineados con grupos de nucleótidos modificados en la segunda cadena y los grupos de nucleótidos flanqueadores en la primera cadena alineados con el grupo de nucleótidos flanqueadores en la segunda cadena), mientras que en la figura 2B el patrón producido en la primera cadena también se produce en la segunda cadena, sin embargo con un desplazamiento de fase de modo que el grupo de nucleótidos modificados del primer segmento forma apareamiento de bases con un grupo de nucleótidos no modificados del segundo segmento y viceversa, de modo que un grupo de nucleótidos modificados de la primera cadena se alinea con un grupo de nucleótidos flanqueadores en la segunda cadena. En la figura 2C se produce otra posibilidad de disposición de los grupos de nucleótidos modificados y no modificados. También está dentro de la presente invención que el patrón del primer segmento sea independiente del patrón del segundo segmento y que ambos patrones solapen parcialmente en términos de posiciones relativas entre sí en la estructura bicatenaria definida por el apareamiento de bases. En una realización adicional la extensión de esta superposición puede variar a lo largo de la longitud del(los) segmento(s) y cadena(s), respectivamente.

La figura 3 muestra el resultado de un experimento de bloqueo usando moléculas de ARNi con diferentes grupos de protección en el extremo. Más en particular, la figura 3A muestra que las diferentes formas de las moléculas de ARNi protegidas en el extremo son funcionales en el bloqueo del ARNm de PTEN

La figura 3B muestra la secuencia de las diferentes moléculas de ARNi usadas en el experimento cuyo resultado se representa en la figura 3A. La figura 3C muestra el resultado de un análisis de inmunotransferencia de la proteína PTEN después de tratamiento con moléculas de ARNi modificadas comparado con construcciones antisentido específicas para PTEN.

La figura 4 muestra que el extremo 3' protuberante de las moléculas de ARNi no son importantes para la interferencia por ARN. Más en particular, la figura 4A muestra una curva de respuesta a la dosis de diferentes moléculas de ARNi y la figura 4B muestra la secuencia de las moléculas de ARNi usada en el experimento cuyo resultado se muestra en la figura 4A.

La figura 5 muestra que la longitud del dúplex de las moléculas de ARNi tiene que ser al menos 18-19 nucleótidos. Más en particular, la figura 5B muestra la secuencia de las moléculas de ARNi específicas para PTEN usadas en el experimento cuyo resultado se representa en la figura 5A como una curva de respuesta a la dosis.

La figura 6 muestra que cuatro apareamientos terminales erróneos de nucleótidos en las moléculas de ARNi con una longitud de 19 nucleótidos todavía son funcionales para mediar el bloqueo de Akt1. Más en particular, la figura 6B muestra la secuencia de las moléculas de ARNi usadas en el experimento cuyo resultado se muestra en la figura 6A.

La figura 7 muestra resultados adicionales de los requisitos y tolerancia de la longitud del dúplex para la mutación en los ARNip. Más en particular, la figura 7A muestra las diferentes construcciones usadas (panel izquierdo) y el respectivo impacto en la inhibición de la expresión del ARNm de Akt1 en células HeLa respecto a la expresión de p110α usado en las cantidades indicadas de moléculas de ARNip (panel derecho). Los cambios de nucleótidos en las moléculas de ARNip con apareamientos erróneos se indican con flechas; los 3'-desoxinucleótidos, si los hay, se indican con letras mayúsculas. La figura 7B muestra los diferentes ARNip específicos para PTEN (panel izquierdo), la inhibición de la expresión del ARNm de PTEN en células HeLa expresada como la relación PTEN/p100α, con diferentes cantidades de ARNip (panel central) y la figura 7C es un análisis de transferencia Western que representa la inhibición de la expresión de la proteína PTEN usando ARNip específico de PTEN (30 mM) y los respectivos ARNip con apareamientos erróneos después de 48 y 96 horas, respectivamente, usando p100α como control de carga.

La figura 8 muestra el resultado de estudios de la estabilidad en el suero que confieren a las moléculas de ARNi la 2'-O-metilación y que las modificaciones en los extremos no tienen efectos beneficiosos en la estabilidad del ARNi. Más en particular, la figura 8A muestra el resultado de una electroforesis en gel de diferentes moléculas de ARNi representadas en la figura 8B que se someten a incubación con suero de ternero fetal.

La figura 9 muestra que una modificación amino en el extremo da como resultado la pérdida de actividad. La figura 9B muestra las moléculas de ARNi particulares usadas en los experimentos cuyos resultados se muestran en la figura 9A expresados como relación del nivel de expresión de PTEN/p100α. La figura 9C muestra los principios de diseño que se pueden deducir de los resultados representados en la figura 9A. Como se usa en la figura 9C el término funcional significa funcionalmente activo en el sistema de ensayo particular descrito en el ejemplo y "no funcional" significa que no es funcionalmente activo en dicho sistema.

La figura 10 muestra que las modificaciones 2'-O-alquilo (metilo) estabilizan las moléculas de ARNi pero también dan como resultado la reducción de su actividad. Más en particular, la figura 10C muestra la secuencia de las moléculas de ARNi usadas en el experimento cuyo resultado se representa como curva de respuesta a la dosis en la figura 10A. La figura 10B muestra el resultado de una electroforesis en gel de las diferentes moléculas de ARNi representadas en la figura 10C que se someten a una incubación de dos horas en suero de ternero fetal.

La figura 11 muestra el resultado de un experimento en la eficacia de las moléculas de ARNi con bloques de modificaciones 2'-O-metilo y la figura 11A representa gráficamente los resultados de dichos experimentos como una curva de respuesta a la dosis y la figura 11C muestra las secuencias de las moléculas de ARNi particulares usadas en dichos experimentos, la figura 11B muestra el resultado de una electroforesis en gel de las diferentes moléculas de ARNi representadas en la figura 11C, que se someten a una incubación de dos horas en suero de ternero fetal.

La figura 12 muestra que la alternancia de la modificación 2'-O-metilo da como resultado la actividad de las moléculas de ARNi modificadas comparado con las formas no modificadas. Más en particular, la figura 12B muestra la secuencia de las moléculas de ARNi usadas en este experimento cuyo resultado se representa en la figura 12A. La figura 12C muestra la estabilidad de dichas moléculas de ARNi después de incubación en suero durante dos horas, mientras que la figura 12D muestra una inmunotransferencia para la proteína PTEN tras aplicar diferentes moléculas de ARNi a células HeLa. Como puede verse a partir de esto, las moléculas de ARNi con modificaciones alternantes están estabilizadas frente a la degradación por endonucleasa y son activas en la mediación de un bloqueo de la proteína PTEN.

La figura 13 muestra el resultado de un análisis de transferencia Western para determinar el transcurso del tiempo del bloqueo de la proteína PTEN. Las células se transfectaron continuamente con moléculas de ARNi modificadas con 2'-O-metilo frente a no modificadas usando lípidos catiónicos, durante 72 h. Se prepararon los lisatos de proteínas y se analizaron por inmunotransferencia después de 48 y 120 h. Para los puntos de tiempo de 96 h y 120 h las células se dividieron, se volvieron a poner en placa y se incubaron en ausencia de moléculas de ARNi durante 24 y 48 h adicionales.

La figura 14 muestra una transferencia Western que representa el bloqueo persistente de proteína de PTEN usando moléculas de ARNi modificadas frente a las moléculas de ARNi no modificadas de forma alternante. La transfección se llevó a cabo sólo durante 5 h y se añadió medio nuevo sin reactivos de transfección. Los lisatos se analizaron por inmunotransferencia 72 h y 96 h después de la transfección con las moléculas de ARNi indicadas.

La figura 15 muestra que las moléculas de ARNip con diferentes modificaciones de ribonucleótidos con 2'-O-metilo muestran una mayor estabilidad en el suero y median el bloqueo de proteínas en células HeLa. Más en particular, la figura 15A indica las diferentes construcciones de moléculas de ARNip usadas (panel izquierdo), en las que las

modificaciones de ribonucleótidos con 2'-O-metilo están subrayadas e indicadas con letras en negrilla en la secuencia. La inhibición de la expresión del ARNm de PTEN en células HeLa transfectadas con las cantidades indicadas de las moléculas de ARNip modificadas se expresa como la relación de PTEN/p110α y se indican en el panel derecho. La figura 15B muestra en el panel izquierdo las diferentes construcciones de ARNip usadas y en el panel derecho una electroforesis en gel de PAA de moléculas de ARNip modificadas y no modificadas después de incubación en suero; las diferentes construcciones con ribonucleótidos con 2'-O-metilo se indican con subrayado y negrilla. La figura 15C muestra un SDS-PAGE basado en inmunotransferencia que ilustra la inhibición de la expresión de la proteína PTEN usando varias de las construcciones de ARNip (30 nM), representado en la figura 15A y 15B, respectivamente. Otra vez, se usa p100α como control de carga. Finalmente, la figura 15D es una inmunotransferencia que indica un bloqueo prolongado de proteína, es decir, la inhibición de la expresión de la proteína PTEN, tras administrar moléculas de ARNip (30 nM) con diferentes modificaciones de ribonucleótidos con 2'-O-metilo después de 48 y 128 horas. Como se muestra en la figura 15C, p110α se usa como control de carga.

La figura 16 muestra que las moléculas de ARNip con diferentes modificaciones de 2'-O-metil-ribonucleótidos que son específicos para el ARNm de Akt1 y p110β, muestran mayor estabilidad en el suero y median el bloqueo de proteína en células HeLa. Más en particular, la figura 16A indica en el panel izquierdo las diferentes construcciones usadas en las que otra vez los 2'-O-metil-ribonucleótidos están subrayados e impresos en negrilla. La integridad de las moléculas de ARNip indicadas después de incubación en suero se muestra en el panel derecho. La figura 16B muestra una inmunotransferencia de Akt1, Akt2 y fosforilación de Akt, y p110 se usa como control de carga tras la transfección de las células con los ARNip indicados (30 mM). La figura 16C muestra diferentes construcciones de ARNip específicos de p110β (panel izquierdo) con las modificaciones 2'-O-metilo subrayadas e impresas en negrilla, y el resultado de un análisis de inmunotransferencia (panel derecho) de la inhibición de la fosforilación de la quinasa secuencia abajo de Akt1 por dichas construcciones de ARNip. Se ha usado p110α como un control de carga.

La figura 17 muestra la eficacia de diferentes moléculas de ARNi con estructuras de horquilla como curva de respuesta a la dosis, mientras que la figura 17B muestra la estructura de dichas moléculas de ARNi cuyo resultado se representa en la figura 17A. Los ARNip sintéticos con diferentes bucles son funcionales en la reducción de la expresión de p110β, Akt1 y Akt2. (14A) Inhibición de la expresión del ARNm de p110β en células HeLa transfectadas con ARNip. Se analizó en paralelo en las muestras el nivel de expresión del ARNm de p110β 24 horas después de la transfección de los ARNip indicados. Los ARNip bimoleculares transfectados (21 nucleótidos de longitud con extremos protuberantes 3'TT, molécula 1AB) o los ARNip monomoleculares con estructuras de bucle se muestran de forma esquemática. Obsérvese que la posición de los bucles (bucle pA derivado de VIH); bucle $(A)_{12}$) respecto a la secuencia antisentido se invierte en 3A, 4A respecto a 3B, 4B. La moléculas de ARNip 2AB contiene 6 apareamientos erróneos en el dúplex de 21 nucleótidos de longitud y sirve como un testigo negativo junto con la muestra sin tratar. Se preparó ARN y se sometió al análisis de RT-PCR en tiempo real (Taqman). Se muestran los niveles de ARNm de p110β respecto a los niveles de ARNm de p110α, que sirven como referencia interna. Cada barra representa transfecciones por triplicado (± desviación típica). Las células HeLa se transfectaron hasta 50% de confluencia (2500 células por 96 pocillos) con ARNip en las concentraciones indicadas en el medio de crecimiento).

La figura 18 muestra la eficacia de diferentes moléculas de ARNi con estructuras de bucle intermolecular e intramolecular como curvas de respuesta a la dosis. (18A) Inhibición de la expresión del ARNm de Akt1 en células HeLa transfectadas con ARNip. Se analizó en las muestras en paralelo el nivel de expresión del ARNm de Akt1 y Akt2 24 horas después de la transfección del ARNip indicado. Se muestran de forma esquemática los diferentes bucles (bucle de A, bucle de GAGA y un conector de polietilenglicol (PEG)) y su estructura secundaria putativa. La molécula de ARNip 9A es específica para Akt2 y sirve como testigo negativo. Obsérvese que 10A y 10B no contienen las secuencias autocomplementarias y se transfectan combinadas. Se muestran los niveles de ARNm de Akt1 respecto a los niveles de ARNm de p110β, que sirve como testigo interno. (18B) Inhibición de la expresión de ARNm de Akt2 en células HeLa transfectadas con las moléculas de ARNip indicadas. Se muestran los niveles de ARNm de Akt2 respecto a los niveles de ARNm de p110β. La molécula específica de Akt1 7A sirve como testigo negativo.

La figura 18C muestra un análisis de transferencia Western en la proteína Akt que representa la funcionalidad de los ARNip sintéticos con diferentes bucles en la reducción específica de la expresión de Akt1 y Akt2. La inhibición de la expresión de las proteínas Akt1 y Akt2 se analizó por inmunotransferencia. Las células se recogieron 48 horas después de transfección del ARNip de horquilla indicado (20 mM). Los extractos de células se separaron por SDS-PAGE y se analizaron por inmunotransferencia usando anticuerpo anti-p110, anti Akt 1/2. Se obtuvieron resultados similares con un anticuerpo específico para la forma fosforilada de Akt1. A la izquierda se indican las posiciones de p110α, otra subunidad catalítica de la quinasa PI 3, que se usó como control de carga, y de Akt1, Akt2 y Akt fosforilada (P*-Akt).

La figura 19 muestra una modificación NH_2, también denominada en esta memoria modificación amino, que puede estar presente en el nucleótido 3'-OH terminal o el nucleótido 5' terminal. El grupo amino está unido al fosfato que a su vez está unido al grupo OH del resto azúcar por un grupo alquilo que comprende una cadena de alquilo de 1 a 8, preferiblemente 6 átomos de C, en el que el segundo átomo de C cercano al grupo fosfato tiene un grupo CH_2OH unido al mismo. Como alternativa, el conector puede estar formado por un éter en el que el éter está compuesto de dos alcoholes en el que un alcohol es un aminoalcohol y el otro es un dialcohol con un grupo alcohol implicado en la formación del grupo éter y el otro es un grupo OH situado en cualquiera de los átomos de C, preferiblemente en el segundo átomo de C respecto al grupo fosfato.

Ejemplo 1

Respuesta a la dosis de las moléculas de ARNi dúplex sintéticas

En este ejemplo se investigó el impacto de los grupos de protección del extremo NH_2 en la actividad de las moléculas de ARNi dúplex. Se adquirieron ARNip sintéticos de Biospring (Frankfurt, Alemania). Los ribooligonucleótidos se volvieron a suspender en RNasa sin TE con una concentración final de 50 μM. En el caso de las moléculas de ARNip bimoleculares se combinaron partes alícuotas (100 μM) hasta una concentración final de 50 μM. Para la formación de los dúplex intramoleculares los ARNip se incubaron a 50ºC durante 2 min en tampón de reasociación (NaCl 25 mM; $MgCl_2$ 5 mM) y se enfriaron a T.a. Las transfecciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos o 10 cm (de 30% a 50%) de confluencia usando diferentes lípidos catiónicos tales como oligofectamina, lipofectamina (LifeTechnologies), NC388 (Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., Boulder, CO), o FuGene 6 (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las moléculas de ARNi se transfectaron por adición de complejo concentrado 5x previamente formado de RNAi reasociado y lípido en medio sin suero, a células en medio completo. Antes de la transfección se cultivaron en placa 2500 células HeLa por pocillo 15-18 horas antes de la transfección para el formato de 96 pocillos.

El volumen total de transfección eran 100 μl para las células en placas de 96 pocillos y 10 ml para células en placas de 10 cm. La concentración final de lípidos era 0,8 a 1,2 μg/ml dependiendo de la densidad celular; la concentración de ARNi se indica en cada experimento.

La formación de complejo se dejó que procediera durante 30 min a 37ºC. Los complejos se añadieron a las células para dar una concentración final 1x tanto de lípido como de ARNi. Dependiendo del análisis realizado después de la transfección, las células se lisaron usando un tampón de lisis celular estándar para la extracción de proteínas (Klippel, A., Escobedo, J. A., Hirano, M. and Williams, L. T. (1994). *Mol. Cell Biol*. 14, 2675-2685) o un tampón de desnaturalización para aislar el ARN de acuerdo con el kit de aislamiento de ARN (Invitek, Berlín, Alemania) 24 a 48 horas después de la transfección para el análisis del ARN y 48 a 72 horas después de la transfección para el análisis de proteínas por transferencia Western.

Determinación de las cantidades relativas de niveles de ARN por análisis Taqman

24 horas después de la transfección, se aisló el ARN de las células transfectadas en 96 pocillos y se purificaron usando el kit RNA HTS 96 (InVitek GmbH, Berlín). La inhibición de la expresión del ARNm de PTEN se detectó por análisis de RT-PCR en tiempo real (Taqman) usando cebador 5' de PTEN 300 nM CACCGCCAAATTTAACTGCA GA, cebador 3' de PTEN 300 nM AAGGGTTTGA-TAAGTTCTAGCTGT y 100 nM de la sonda de PTEN Taqman Fam-TGCACAGTATCCTTTTGAAGACCATAACCCA-Tamra combinado con cebador 5' de β-actina 40 nM GTTT GAGACCTTCAACACCCCA, cebador 3' de β-actina 40 nM GACCA-GAGGCATACAGGGACA y 100 nM de la sonda de β-actina Taqman Vic-CCATGTACGTAGCCATCCAGGCTGTG-Tamra. Los cebadores y sondas de Akt las han determinado Sternberger *et al*. (Sternberger, a.a.O.) y se usan de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystem; uso de Amplicon Set). Dichos cebadores y sondas también se pueden diseñar usando el programa de software Primer Express (Applied Biosystem). La reacción se llevó cabo en 50 μl y se ensayó en el detector de secuencia ABI PRISM 7700 (Applied Biosystem) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en las siguientes condiciones: 48ºC durante 30 min, 95ºC durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95ºC y 1 min a 60ºC.

El bloqueo del ARN se muestra por el análisis de RT-PCR en tiempo real de las células HeLa transfectadas con moléculas dúplex de ARNip de 21 nt de longitud no modificadas y modificadas con NH_2 o grupos abásicos invertidos en el extremo 5' con una concentración de vehículo lipídico de 1,0 μg/ml. La densidad celular era 2000 células/pocillo. Las modificaciones en el extremo 3' son extremos protuberantes de ARN, extremos protuberantes de ARN con grupos amino o extremos protuberantes de ADN.

Preparación de extractos celulares e inmunotransferencia. Las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato fría y se lisaron a 4ºC con tampón de lisis que contenía Tris 20 mM (pH 7,5), NaCl 137 mM, glicerol al 15% (vol/vol), Nonidet P-40 (NP-40) al 1% (vol/vol), fluoruro de fenilmetilsulfonilo 2 mM, aprotinina 10 mg por ml, leupeptina 20 mM, benzamidina 2 mM, vanadato de sodio 1 mM, fosfato de β-glicerol 25 mM, NaF 50 mM y NaPPi 10 mM. Los lisatos se depuraron por centrifugación a 14.000 x g durante 5 minutos y se analizaron partes alícuotas de los extractos celulares que contenían cantidades iguales de proteína, para la expresión de proteínas por transferencia Western: las muestras se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell). Los filtros se bloquearon en tampón TBST (Tris-HCI 10 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05% (vol/vol), azida sódica al 0,5% (p/vol)) que contenía leche en polvo al 5% (p/v). Se añadieron los respectivos anticuerpos en TBST con las diluciones adecuadas. Se detectó el anticuerpo unido usando peroxidasa de rábano picante anti-ratón o anti-conejo conjugada (Transduction Laboratories) en TBST, se lavaron y se revelaron usando los sustratos de quimioluminiscencia SuperSignal West Dura (Pierce) o ECL (Amersham) (véase Sternberger *et al*. (2002). *Antisense. Nucl. Ac. DrugDev. pendiente de publicación*).

Anticuerpos. Se han descrito el anticuerpo monoclonal murino anti-p110 U3A y el anticuerpo monoclonal murino anti-p85 N7B (Klippel *et al*., 1994, aaO). Los anticuerpos policlonales de conejo anti-Akt y anti-fosfo Akt (S473) se obtuvieron de Cell Signaling Technology. El anticuerpo monoclonal murino anti-PTEN era de Santa Cruz Biotechnology. La molécula antisentido específica de PTEN 53, es decir, geneBloc, la describen Sternberg *et al*. [Sternberger, véase antes] y tiene la siguiente secuencia (ucuccuuTTGTTTCTGcuaacga), en la que los nucleótidos representados

por letras minúsculas son ribonucleótidos mientras que los nucleótidos en letras mayúsculas son desoxirribonucleótidos. Esta molécula antisentido también es idéntica al ARNi 1A sin TT.

Los resultados se muestran en la figura 3A y las respectivas moléculas de ARNi en la figura 3B que se dirigen al ARNm de PTEN. Los nucleótidos escritos en letras minúsculas representan ribonucleótidos mientras que los nucleótidos en letras mayúsculas representan desoxirribonucleótidos. El término NH_2 indica que la posición 3' del ribonucleótido se modificó con un grupo amino. Las moléculas de ARNi usadas en este y en otros ejemplos descritos en esta memoria también se denominan moléculas de ARN de interferencia pequeño, ARNip. Hay que indicar que en cualquiera de las figuras contenidas en esta memoria la cadena superior es la cadena antisentido o primera, mientras que la cadena inferior es la cadena homosentido o segunda de la molécula de ARN de interferencia.

Como puede verse en la figura 3A las modificaciones en el extremo amino tales como la modificación amino y la modificación abásico invertido del grupo OH terminal del ácido nucleico son tan potentes como los extremos no modificados cuando la modificación está situada en el extremo 3' de la cadena antisentido (véase también la figura 8A, 8B). Por lo tanto, la modificación química para estabilizar o con otras propiedades benéficas (suministro) será tolerada sin pérdida de actividad cuando se sitúa en 3'-OH, en especial cuando el 3'-OH se sitúa en un nucleótido en el extremo protuberante.

Para el experimento mostrado en la figura 3C se usaron condiciones similares a las señaladas antes. La primera cadena y la segunda cadena del ARNi se modificaron por un grupo NH_2 en la posición 3' del resto ribosa o por un abásico invertido en dichas posiciones. La primera construcción se designa como ARNip-NH_2 (3A3B) y la segunda como ARNip-iB (4A4B). La secuencia de ambas moléculas se representa en la figura 3B. El término 3A3B indica que el ácido ribonucleico de interferencia consiste en la cadena 3A como cadena antisentido y la cadena 3B como la cadena homosentido. Por razones de comparación se generó un oligonucleótido antisentido designado GB53 (Steinberger *et al.*, véase antes) que se dirigió también contra el ARNm de PTEN. Las particularidades de este último experimento fueron las siguientes.

Como puede verse en la figura 3C las moléculas de ARNi protegidas en el extremo representadas en la figura 3B son funcionales y dan un bloqueo de la proteína PTEN.

A partir de este ejemplo, se puede ver que ambos grupos de protección del extremo convierten a las moléculas de ARNi activas en el bloqueo de la proteína PTEN. Esta inhibición es tan eficaz como la inhibición con construcciones antisentido, pero se usan concentraciones menores lo cual es una ventaja clara frente a la tecnología antisentido que ya es muy poderosa.

Ejemplo 2

Requisitos del extremo protuberante para la actividad del ARNi dúplex <u>in vivo</u>

Los procedimientos experimentales fueron los mismos que los descritos en relación con el ejemplo 1, excepto que las moléculas de ARNi de interferencia dirigidas al ARNm de PTEN se diseñaron de forma diferente. Los resultados se muestran en la figura 4A como curvas de respuesta a la dosis, y la figura 4B muestra la secuencia y modificaciones particulares de las moléculas de ARNi de interferencia usadas para generar los datos representados en la figura 4A. La nomenclatura es tal que, por ejemplo ARNi 18 está compuesto de la cadena 18A como cadena antisentido y la cadena 18B como cadena homosentido.

Se compara la actividad en el bloqueo del ARNm de PTEN de las moléculas con extremos romos con moléculas con extremos protuberantes en 3' (ARNi 18) y extremos protuberantes en 5' (ARNi 30 y ARNi 31) en células HeLa. La actividad de las moléculas con extremos romos (ARNi 28) y moléculas con extremos protuberantes en 5' es comparable a la actividad de moléculas con extremos protuberantes en 3'. Esto muestra que los extremos protuberantes en 3' no son esenciales para la actividad del ARNi.

Ejemplo 3

Requisitos de la longitud del dúplex de las moléculas de ARN de interferencia para la actividad del ARNi <u>in vivo</u>

El enfoque experimental era similar al señalado en relación con el ejemplo 1, excepto que las moléculas de ARN de interferencia se dirigieron contra el ARNm de Akt1. El testigo negativo para mostrar la especificidad de las moléculas de ARNi de interferencia era otra vez el ARNm de p110. Los resultados experimentales se muestran en la figura 5A y las particularidades de las moléculas de ARNi de interferencia usadas se representan en la figura 5B. Se llevaron a cabo experimentos similares con otras construcciones de ARNip que se representan en la figura 7A, panel izquierdo, en el que las flechas indican los apareamientos erróneos y los desoxirribonucleótidos se expresan en letras mayúsculas. La inhibición de la expresión del ARNm de Akt1 en células HeLa transfectadas con las cantidades indicadas de moléculas de ARNip se representa en el panel derecho de la figura 7A.

El análisis con Taqman en el ARN de Akt de células HeLa transfectadas con diferentes moléculas de ARNi muestra que el dúplex bicatenario de las moléculas de ARNip debe ser más largo que 17 pares de bases para mostrar actividad, mientras que las moléculas con dúplex de 17 pares de bases de longitud o más cortas no son funcionales incluso

aunque se añadan extremos protuberantes específicos de la secuencia. Las moléculas de ARNi más cortas que se ensayaron con éxito tenían de 18 a 19 nucleótidos o pares de bases de longitud. Hay que indicar que el diseño de la molécula de ARN de interferencia 51A/51B denominada ARNi 51 corresponde a la descrita en la solicitud de patente internacional WO 01/75164. La molécula de ARNi 55A/55B comprende un segmento de 17 nucleótidos y tiene una actividad claramente menor en términos de degradación del ARNm de Akt1.

Como puede verse en la figura 7A los dúplex de 19 nt de longitud son muy eficaces en la reducción de los niveles de ARNm de Akt1 independientemente de la naturaleza (desoxi o ribonucleótidos) del extremo protuberante de 3' (compárense las moléculas 1AB, 2AB, 3AB, 4AB). El ARNip de 17 nucleótidos de longitud (molécula 5AB) mostró una espectacular reducción de la actividad de silenciamiento que confirmaba la interpretación expresada antes de que los dúplex de ARNip activos deben tener al menos 18 nt o más largos. Sin querer ligarse por ninguna teoría, este resultado se puede explicar desde el punto de vista del mecanismo por dos requisitos diferentes. Primero, puede ser obligatorio un mínimo de apareamiento de bases de 18 nt entre la cadena antisentido del ARNip y el ARNm objetivo, o segundo la incorporación en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés *RNA-induced silencing complex*) requiere una longitud mínima del dúplex de ARNip. Para abordar esta cuestión se sintetizó una molécula de ARNip dúplex de 19 nt de longitud con una y dos mutaciones terminales (inversión CG y UA) respecto a la secuencia natural (moléculas 6AB y 7AB). Ambas moléculas, incluso la molécula con un segmento de apareamiento de bases de solo 15 nt con el ARNm objetivo, eran funcionales en la inducción del nivel de ARNm de Akt1. Por lo tanto, se puede concluir que parece que la propia longitud del dúplex, pero no el apareamiento de bases del ARNip antisentido con el ARNm objetivo, determina la longitud mínima del ARNip funcional. Esto sugiere que la longitud de la hélice bicatenaria es un determinante importante para la incorporación en el complejo RISC. Los apareamientos erróneos introducidos en los extremos terminales de los dúplex de ARNip tenían poco efecto en el ARN de interferencia.

Dados los resultados experimentales, el requisito mínimo para la interferencia mediada por ARNi óptima es una longitud del dúplex de 18 ó 19 nucleótidos, independientemente del resto del diseño de las moléculas de ARNi tal como el extremo romo o el extremo protuberante 5' o cualquier otra forma como se describe en esta memoria, pero que se puede aplicar en general a las moléculas de ARNi. Sin embargo, hay que reconocer que el diseño particular de las moléculas de ARNi puede conferir más ventajas a dichas moléculas, tales como, p. ej., mayor eficacia y mayor estabilidad, respectivamente.

Ejemplo 4

Requisitos de homología objetivo-antisentido para el ARNi <u>*in vivo*</u>

El montaje experimental era similar al descrito en el ejemplo 1, en el que el ARNi es específico para Akt1. Además, se diseñó una molécula de ARN de interferencia específica para PTEN y se usó como testigo negativo. Los resultados se muestran en la figura 6A y figura 6B. Básicamente se llevó a cabo el mismo experimento usando otras moléculas de ARNip representadas en la figura 7B y los resultados se indican en la figura 7B (panel derecho) y figura 7C, respectivamente.

Habiendo establecido la longitud mínima del dúplex de 18 o más de 18 nucleótidos para las moléculas de ARNip funcionales, se plantea la pregunta de cuantos nucleótidos apareados entre el ARNm objetivo y el ARNip son necesarios para la actividad de silenciamiento. Como muestra el análisis de Taqman del ARN de Akt1, es suficiente un segmento de 19 a 15 nucleótidos que se apareen perfectamente con el ARN objetivo para mediar la actividad de ARNi, en el caso presente del Akt1. Una molécula de ARNi específica para PTEN no reduce cantidades de ARN de Akt1, confirmando la especificidad de este enfoque. Los apareamientos erróneos de uno o dos nucleótidos en cualquiera de los extremos o en ambos de una cadena son funcionales, lo que sugiere que un segmento homólogo de 15 nt entre un ARNm objetivo y el ARNi es suficiente para el silenciamiento de genes. A partir de estos datos se puede concluir que se puede producir el silenciamiento inespecífico de genes al azar por la unión inespecífica de objetivos no relacionados. Esto se basa en el entendimiento de que un segmento de 15 a 17 pares de bases que se aparean no es específico para un solo gen y ocurrirán al azar considerando la complejidad y tamaño del genoma o transcriptosoma de los vertebrados. Aparte de los experimentos descritos, después también se analizó la situación de los apareamientos erróneos. Para este propósito se usó un ARNip de extremo romo de 19 nt de longitud dirigido contra el ARNm de PTEN. Los cambios de secuencia en una cadena de ARNip se compensaron por cambios complementarios en la otra cadena para evitar la alteración de la formación del dúplex. Como puede verse en las figuras 7B y C respectivamente, un ARNip con sólo una mutación puntual en el centro de la molécula comprometía gravemente su capacidad para usar el ARNm y los niveles de expresión de proteínas. Este resultado indica que la maquinaria del ARN es muy discriminante entre apareamiento de bases perfecto e imperfecto entre ARNm objetivo y ARNip en el centro del dúplex. Esta dependencia extrema de una complementaridad perfecta entre el objetivo y el ARNip ya se ha descrito para la interferencia de ARNi en el sistema de Drosophila, sin embargo, todavía no se ha descrito en relación con sistemas mamíferos tales como HeLa.

Basándose en esta observación, la presente invención reduce este problema fuera del objetivo del ARNip mediante dos enfoques. Primero reduciendo la longitud de molécula de las moléculas de ARNip a los requisitos mínimos (18-19 nt) y por lo tanto reduciendo la posibilidad de homología fuera de los objetivos. Segundo, por inactivación de la cadena homosentido para prevenir un silenciamiento de ARN no deseado producido por complementaridad accidental de la cadena homosentido con un ARN no relacionado con el objetivo (véase también el Ejemplo 6).

Ejemplo 5

Estabilidad de las moléculas de ARNi modificadas en el suero

Se incubaron oligonucleótidos en suero humano durante 15 min y 2 horas y se cargaron en gel de poliacrilamida al 10% con testigos sin tratar. Los resultados se muestran en la figura 8A. Las diferentes moléculas de ARNi usadas se muestran y se describen con más detalle en la figura 8B.

A partir de este ejemplo se puede considerar que el dúplex de ARNi de las moléculas de ARN con todos los nucleótidos modificados con grupos 2'-O-metilo (moléculas de ARNi 79A79B y 28A28B) tiene mayor estabilidad en el suero. También se muestra que un dúplex romo es más estable que la molécula de dúplex con extremos protuberantes. A partir de esto, se puede extraer la conclusión de que la protección del extremo (p. ej., iB o amino) no aumenta la estabilidad en el suero.

Además, también se puede concluir que a diferencia de lo expresado en la técnica anterior antes de la presentación de esta solicitud, las endonucleasas más que las exonucleasas son más importantes en la protección de las moléculas de ARNi.

En vista de esto, además de que las diferentes modificaciones o diseños de las moléculas de ARNi de la invención como se describen en esta solicitud, una modificación diferente o adicional de los nucleótidos puede ser el uso de una cadena principal de fosforotioato de las moléculas de ARNi que puede ser completa o parcial con el fin de inhibir la función de endonucleasa. Una cadena principal de fosforotioato completa significa que cualquiera de los nucleótidos presenta un grupo fosforotioato, mientras que una cadena principal de fosforotioato parcial significa que no todos los nucleótidos que forman la molécula de ARNi tienen una modificación de fosforotioato. Esta modificación es adecuada para aumentar el tiempo de vida de las moléculas de ARNi independientemente del resto del diseño de las moléculas de ARNi. En relación con esto, un ARNi modificado con fosforotioato parcial o completamente es objetivo de la presente invención que se puede materializar en relación con las diferentes estrategias para el diseño de moléculas de ARN de interferencia como se describe en esta memoria, o con cualesquiera otros diseños conocidos en la técnica.

Ejemplo 6

Inactivación de la cadena homosentido por grupos de protección del extremo NH_2 en los extremos 5' y 3'

El montaje experimental era similar al descrito en relación con el ejemplo 1, siendo la secuencia de ácido nucleico objetivo el ARNm de PTEN. La concentración de células HeLa era 2.000 células por pocillo. Se analizó el ARN de PTEN en ensayos Taqman después de transfección de moléculas de ARNi modificadas de forma diferente. Las diferentes moléculas de ARN de interferencia usadas se representan en la figura 9B, mientras que los resultados experimentales se muestran en la figura 9A.

Como puede verse en las curvas de respuesta a la dosis de diferentes moléculas de ARNi representadas en la figura 8A, las moléculas de ARNi son funcionales cuando la cadena homosentido, es decir la segunda cadena, se modifica en ambos extremos con grupos amino. Son particularmente eficaces las moléculas de ARNi 20A26B, 18A26B, y 28A26B. La actividad más baja la muestra la molécula de ARNi 26A26B que corresponde a la modificación en los 4 extremos del dúplex (Tuschl es 18AB).

Sin embargo, la actividad de ARNi también se logra cuando la cadena antisentido, es decir la primera cadena, se modifica sólo en el extremo 3' dejando un grupo OH libre en el extremo 5' (construcciones de ARNi 22A26B; 20A26B). No hay actividad cuando la cadena antisentido se modifica con grupos amino tanto en el extremo 5' como el 3' (26A26B). Esto conduce a la conclusión de que cualquier extremo de la cadena antisentido y más en particular el extremo 5' de la cadena antisentido debe mantenerse sin modificaciones. Además, merece la pena exponer que la modificación NH_2 en el extremo se puede usar para inactivar la cadena homosentido en el extremo 5' y 3' y por lo tanto reducir los efectos fuera del objetivo mediados por otra cadena homosentido funcional que de como resultado un aumento significativo de la especificidad de la molécula de ARNi, lo cual es ventajoso para la validación del objetivo así como para cualquier uso médico de la molécula de ARNi.

La otra generalización de los resultados de este experimento se representa en la figura 9C. Por consiguiente los ARNi funcionalmente activos son los que no tienen modificación amino en la cadena antisentido o que tienen una modificación amino sólo en el extremo 3' de la cadena antisentido, mientras que una modificación amino en ambos extremos de la cadena antisentido no es funcional, es decir, no da como resultado un bloqueo del ARNm objetivo.

Ejemplo 7

Impacto de la modificación 2'-O-metilo de las moléculas de ARNi para la protección frente a endonucleasa

El bloqueo del ARN se muestra otra vez usando el análisis de RT-PCR en tiempo real en células HeLa transfectadas con moléculas dúplex de ARNi dirigidas contra el ARNm de PTEN como se representa en la figura 10A. Los procedimientos experimentales fueron básicamente los mismos especificados en el ejemplo 1. La estructura de las

moléculas de ARNi investigadas y sus respuestas a la dosis, que se representan en la figura 10A, se muestran en la figura 10C. Los nucleótidos impresos en negrilla son los que tienen una modificación 2'-O-metilo.

Mediante las curvas de respuesta a la dosis mostradas para diferentes moléculas de ARNi en la figura 10A, se ilustra que los grupos 2'-O-alquilo internos reducen la actividad del ARNi. Preferiblemente dichos grupos 2'-O-alquilo son grupos 2'-O-metilo o 2'-O-etilo. Sin embargo, las moléculas con nucleótidos no modificados combinados con la modificación 2'-O-alquilo, muestran una actividad significativa. Como se representa también en la figura 10A no hay actividad cuando la cadena antisentido se modifica toda con grupos 2'-O-metilo y la cadena homosentido no se modifica (véase, p. ej, la molécula de ARNi 79A28B). Los resultados de un ensayo de estabilidad tal como la incubación de las diferentes moléculas de ARNi en suero, como se representa en la figura 10B, muestran que las modificaciones 2'-O-alquilo estabilizan las moléculas de ARNi frente a la degradación. Sin embargo, este efecto claramente beneficioso, al menos en cierto grano es contrarrestado por el efecto de que las modificaciones 2'-O-alquilo en general dan como resultado en una menor actividad de bloqueo. Por consiguiente, el diseño de moléculas de ARNi debe establecer un equilibrio entre la estabilidad y la actividad, lo cual hace que sea importante ser consciente de los diferentes principios de diseño descritos en la presente solicitud.

Ejemplo 8

Impacto de bloques de modificaciones 2'-O-metilo internas en la estabilidad de moléculas de ARNi en el suero

El enfoque experimental en relación con este estudio era realmente el mismo descrito en el ejemplo 1. Otra vez, el ARN de PTEN se analiza por RT-PCR en tiempo real en células HeLa con una densidad de 2000 células/pocillo que se transfectaron con diferentes dosis de moléculas de ARNi. Las moléculas de ARNi se incubaron en el suero durante dos horas y se analizaron en un gel de poliacrilamida al 10%. Los resultados de este estudio se ilustran en las figuras 11A a 11C, en las que la figura 11A muestra la respuesta a la dosis de las diferentes moléculas de ARNi representadas en la figura 11C, y la figura 11B muestra el resultado de un ensayo de estabilidad usando algunas de las moléculas de ARNi representadas en la figura 11C. Hay que entender que los nucleótidos escritos en negrilla en la figura 11C son los que llevan una modificación que en este caso es una modificación 2'-O-metilo en el resto ribosa de los nucleótidos.

Hay una inhibición dependiente de la dosis de las moléculas de ARNi no modificadas. También se muestra que la modificación 2'-O-metilo de los 9 nucleótidos centrales hace que el ARNi sea estable en el suero y permite la actividad del dúplex en el sentido de mediar el fenómeno de interferencia que conduce a una degradación del ARNm de PTEN. La modificación total de la cadena homosentido hace que la molécula de ARNi sea estable en el suero y permite cierta actividad.

Los bloques alternativos de 5 nucleótidos con modificación 2'-O-metilo hace que la molécula de ARNi sea estable en el suero y permite la actividad en el ARN de PTEN como se muestra mediante incubación del dúplex de ARNi en suero durante dos horas y carga de las muestras en un gel de poliacrilamida al 10%. Como puede verse en la figura 11B el dúplex que comprende las cadenas 80A y 80B se degrada fuertemente después de incubación en suero durante 2 horas. El dúplex que consiste en las cadenas 82A y 82B confirma el resultado de que el extremo 5' de la primera cadena que comprende la cadena antisentido no debe modificarse en los nucleótidos 5' terminales (compárese 82A82B con la 81A81B con orientación inversa). Esto también se confirma por los resultados obtenidos con el dúplex que consiste en las cadenas 86A y 86B que es tanto activo como estable en el suero. Merece la pena indicar que las moléculas con bloques no modificados en el extremo 5' de la cadena antisentido son más activos, mientras que el grupo 5'-OH terminal preferiblemente no está derivatizado.

Se llevaron a cabo experimentos adicionales usando diferentes patrones de modificación de la modificación 2'-O-metilo de los nucleótidos. Los resultados de los mismos se muestran en las figuras 12A a 12C y se discuten en esta memoria con más detalle en el ejemplo 9.

Ejemplo 9

Impacto de la modificación 2'-O-alquilo interna alternante en la estabilidad de las moléculas de ARNi en el suero

El montaje experimental para llevar a cabo esta clase de estudio era el mismo usado en relación con los estudios descritos en el ejemplo 1 y ejemplo 8, respectivamente, siendo el ácido nucleico objetivo otra vez el ARNm de PTEN. Se transfectaron células HeLa con las diferentes moléculas de ARNi representadas en la figura 12B y el bloqueo de ARN se demostró usando la RT-PCR en tiempo real en el ARN de PTEN de una forma dependiente de la dosis (figura 12A). La estabilidad de las diferentes moléculas de ARNi después de 15 min y 2 horas en el suero a 37ºC se representa en la figura 12C y en la figura 12D se representa una transferencia Western para p110 y PTEN como proteínas objetivo de las diferentes moléculas de ARNi, siendo las moléculas de ARNi ensayadas las mismas en los experimentos de las figuras 12C y 12D.

Como se ilustra en la figura 12A y 12C, los nucleótidos modificados con grupos 2'-O-metilo que alternan con nucleótidos no modificados, convierten a las moléculas de ARNi estables en el suero, mientras que permiten que todavía sean activas en el sentido de interferir con el ARNm objetivo. Se muestra que la incubación de moléculas dúplex de ARNi durante 15 min y 2 horas en el suero degradará el dúplex no modificado y el dúplex en el que los 10 nucleótidos situados más en el extremo 5' no están modificados.

En las moléculas de ARNi representadas en la figura 12B se dan diferentes patrones de nucleótidos modificados y no modificados. La molécula de ARNi 94A1/94B1 comprende una estructura en la que un nucleótido modificado está flanqueado por un nucleótido no modificado, estando el nucleótido no modificado situado en el extremo 5' de la primera cadena. La molécula de ARNi compuesta de las cadenas 94A2 y 94B2 es otro ejemplo en el que los nucleótidos modificados y los nucleótidos no modificados de la primera y la segunda cadena están situados en lados opuestos. En contrate con esto, la molécula de ARNi compuesta de las cadenas 94A1 y 94B2 tienen el mismo patrón de nucleótidos modificados y no modificados. Sin embargo, hay un desplazamiento de fase de modo que los nucleótidos modificados forman apareamiento de bases con un nucleótido no modificado. Las dos moléculas de ARNi compuestas de las cadenas 94A1 y 94B1 y las cadenas 94A2 y 94B2 difieren entre sí de modo que en el primer caso la primera cadena empieza con un nucleótido no modificado y el primer nucleótido correspondiente de la segunda cadena, es decir, el nucleótido en el extremo 3' de la segunda cadena, empieza con un nucleótido no modificado, y la disposición es la opuesta a la de la molécula de ARNi compuesta de 94A2 y 94B2.

Además, las moléculas de ARNi modificadas alternantes como se representan en la figura 12B son funcionales en la mediación del bloqueo de la proteína PTEN como se muestra en la figura 12D, pero sólo cuando los nucleótidos terminales segundo 5' y segundo 3' no están modificados (véase 94A294B1 y 94A294B2). Considerados juntos estos datos muestran que las moléculas de ARNi más estables y más activas tienen restos nucleótidos modificados con 2'-alquilo y no modificados alternantes. Hay que indicar que estas moléculas muestran una reducción del ARNm muy similar cuando se comparan con las moléculas de ARNip no modificadas que son estables en el suero y permiten un manejo mayor o más fácil.

Ejemplo 10

Bloqueo de proteínas funcionales mediado por moléculas de ARNi modificadas internamente

El enfoque experimental era similar al señalado en relación con el ejemplo 1.

Se llevaron a cabo transferencias Western en células HeLa recogidas en diferentes puntos de tiempo después de la transfección (48, 72, 96 y 120 horas) con moléculas de ARN modificadas alternantes como se representa en la figura 12B. Por razones experimentales hay que destacar que en el punto de tiempo de 96 horas las células se habían dividido y se había vuelto a cultivar en placa la mitad de la población. Se aplicaron a las células 40 nM de las diferentes moléculas de ARNi. Las células se transfectaron de forma continua durante 72 horas con lípidos catiónicos como se describe en el ejemplo 1; después se volvieron a cultivar en placa en ausencia de reactivos de transfección.

Las transfecciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos o 10 cm (de 30% a 50% de confluencia) usando diferentes lípidos catiónicos tales como oligofectamina, lipofectamina (Life Technologies), NC388, L8 (Atugen, Berlín), los ARNi se transfectaron por adición de complejo concentrado 5x previamente formado de ARNip y lípido en medio sin suero a células en medio completo. El volumen de transfección total era 100 μl para células cultivadas en placa de 96 pocillos y 10 ml para placas de 10 cm. La concentración final de lípido era 0,8 a 1,2 μg/ml dependiendo de la densidad celular; la concentración de ARNip se indica en cada experimento.

El resultado del análisis de transferencia Western se representa en la figura 13. Como puede verse en esta figura, las moléculas de ARNi de las versiones 94A2B1 y 94A2B2 dieron un bloqueo más duradero de la proteína PTEN que las moléculas no modificadas. En este experimento se confirma la falta de bloqueo de proteínas visto también en la figura 12 con moléculas de las versiones 94A1B1 y 94A1B2. Las moléculas no modificadas (80AB) no son tan potentes para mantener el bloqueo duradero cuando las células no se transfectan continuamente.

Ejemplo 11

Bloqueo persistente de la proteína PTEN con modificación 2'-O-metilo alternante de las moléculas de ARNi

El enfoque experimental era similar al señalado en relación con el ejemplo 10, excepto que la transfección se terminó después de 5 h por sustitución del medio de transfección por medio nuevo. El protocolo se modificó ligeramente de modo que cada una de las moléculas de ARNi se preparó una concentración 40 nM usando una solución madre de 1 μg de ARNi/ml de lípido catiónico, como se ha descrito en relación con el ejemplo 1. Cinco horas después de la transfección se retiró el medio y se añadió EMEM reciente. Las células se dividieron después de 72 h y la mitad de las células se lisaron y la otra mitad se volvieron a cultivar en placa y se lisaron 24 h después (96 h después de la transfección). Los resultados de un análisis de transferencia Western usando 3 moléculas de ARNi diferentes (80AB, 94A1/B2, 94A2/B1) se representan en la figura 14. Como testigo positivo se usaron células sin tratar. La figura 14 muestra la expresión de PTEN después de 72 h y 96 h, respectivamente. Considerando las particularidades estructurales de las diferentes moléculas de ARNi, a partir de la figura 14 puede verse que el bloqueo de la proteína es persistente con moléculas alternantes de la clase 94A2B1 incluso después de 96 h después de división y recultivo en placa de las células, comparado con las moléculas de ARNi no modificadas (tales como 80AB) y la moléculas de ARNi 94A1B2.

Se llevó a cabo otro experimento usando las construcciones de ARNip representadas en la figura 15A (panel izquierdo). A partir de los resultados descritos como la relación de degradación del ARNm de PTEN/p110α con las diferentes concentraciones de construcciones de ARNip administradas al sistema de ensayo, se puede ver que las moléculas de ARNip con una o ambas cadenas que consistan en restos 2'-O-metilo no eran capaces de inducir la

interferencia por ARN en el sistema de mamíferos (figura 15A, moléculas V2, V5, V6). Sin embargo, la disminución de actividad era menos pronunciada cuando estaban modificadas sólo partes de las cadenas. Es interesante que una molécula que tenía una cadena antisentido no modificada (que es la cadena superior en la representación a lo largo de esta memoria descriptiva, si no se indica lo contrario) y una cadena homosentido completamente modificada era significativamente más activa cuando se comparaba con la versión inversa (figura 5A, moléculas V5 y V6). Este resultado sugiere que la cadena antisentido del ARNip parece que es más crítica y sensible a la modificación. Las moléculas más eficaces en la inducción de ARNm de PTEN tenían sólo segmentos de modificaciones que dejaban el extremo 5' sin modificar o estaban modificados en posiciones alternantes en ambas cadenas (figura 15A, moléculas V10, V12).

Para ensayar la resistencia a la nucleasa, las diferentes versiones de ARNip se incubaron en suero seguido de electroforesis en gel de PAA. El resultado se muestra en la figura 15B (panel derecho con las diferentes secuencias indicadas en el panel izquierdo de la figura 15B). Como se ha mostrado antes, las moléculas de ARNip de extremos romos con ribonucleótidos no modificados se degradaron rápidamente, mientras que los nucleótidos con una sustitución 2'-O-metilo completa mediaron la resistencia frente a las nucleasas derivadas del suero (figura 15B, compárese la molécula AB con V1). Las moléculas de ARNip con modificación 2'-O-metilo parcial mostraron también una mayor estabilidad cuando se compararon con los ARNip no modificados. En especial, las moléculas con modificaciones alternantes en ambas cadenas mostraron una mejora significativa de la estabilidad (figura 15B, moléculas V13, V14, V15 y V12). Lo que es más importante, la transfección de tres de estas moléculas en células HeLa dio como resultado una reducción significativa de la expresión de la proteína PTEN como se representa en la figura 15C, longitud 6, 9 y 10). En este ensayo de actividad de interferencia por ARN se observó una preferencia inesperada por las moléculas que estaban modificadas cada dos nucleótidos empezando con el nucleótido 5' más terminal de la cadena antisentido (moléculas V15 y V12). Las moléculas que contenían modificaciones empezando por el segundo nucleótido en el extremo 5' de la cadena antisentido eran más estables, pero tenían una actividad muy reducida en el silenciamiento de genes (moléculas V13 y V14). Este resultado señala hacia las interacciones muy específicas entre las enzimas implicadas y los nucleótidos exactos en el dúplex de ARNip. Considerados juntos, los datos mostrados en esta memoria demuestran que las modificaciones 2'-O-metilo en posiciones particularmente seleccionadas en el dúplex de ARNip pueden aumentar la resistencia a las nucleasas y no suprimen necesariamente el ARNi completamente.

Aunque una mayor estabilidad del ARNip sintético tiene implicaciones fundamentales para la aplicación *in vivo*, también se analizó si la modificación particular también puede conducir a un bloqueo de proteína prolongado en sistemas de cultivos de células. De acuerdo con esto, se transfectaron transitoriamente células HeLa durante 6 horas usando diferentes versiones de ARNip específicos para PTEN. Después el complejo de lípido y ARNip se lavó y el bloqueo de la proteína PTEN se analizó 48 horas y 120 horas más tarde. Aunque los experimentos de bloqueo sin la transfección continuada de ARNip son complicados debido al rápido crecimiento de las células no transfectadas en este periodo de tiempo que da como resultado un bloqueo muy transitorio, los autores de la presente invención pusieron demostrar un bloqueo de la proteína PTEN prolongado con moléculas de ARNip estabilizadas por la modificación 2'-O-metilo descrita. A las 48 horas después de la transfección el ARNip (AB) mostraba la mayor reducción de los niveles de proteína PTEN, sin embargo a las 120 horas después de la transfección la reducción de la expresión de la proteína PTEN es superior con el ARNip estabilizado con modificaciones 2'-O-metilo alternantes (figura 15D, compárese la vía 2 con las vías 4, 6 y 7).

A partir de los resultados también puede verse que preferiblemente la posición de nucleótido inicial de la modificación alternante parece que es importante. Para ensayar esta preferencia con más detalle se sintetizaron dos series adicionales de ARNip, una específica para la quinasa Akt1 y la otra específica para p110β que es una de las dos subunidades catalíticas de PI(3-)quinasa. Las construcciones particulares se muestran en la figura 16A. Como puede verse en las mismas, sólo se usaron dúplex de ARNip de 19 nt de longitud sin ninguna modificación o con modificación 2'-O-metilo cada dos nucleótidos. Usando Akt1 como un objetivo, se observó un bloqueo de la proteína eficaz así como una reducción espectacular de los niveles de fosfo-Akt con ARNip romos, no modificados (figura 16A, panel derecho). De las diferentes versiones de moléculas con modificaciones cada dos nucleótidos, sólo una era eficaz para mediar la ARNi (figura 16A, molécula V5). Esta molécula de ARNip contenía una cadena antisentido que estaba modificada en los nucleótidos 5' y 3' más terminales. La cadena homosentido empezaba con los nucleótidos no modificados en la posición más terminal, dando como resultado una estructura en la que los ribonucleótidos modificados y no modificados de ambas cadenas están enfrentados entre sí. Como se esperaba esta molécula también estaba protegida frente a las nucleasas derivadas del suero, como se representa en la figura 16B (molécula V5).

Es interesante que una molécula de ARNip de 19 nt de longitud muy similar (V4) con modificaciones que empiezan en el segundo nucleótido de la cadena antisentido no mostraron activación de la interferencia por ARN en el ensayo particular usado. La versión V6 en la que los nucleótidos modificados de la cadena antisentido están enfrente de los nucleótidos modificados en la cadena homosentido, también era inactiva en este experimento. Una serie idénticas de moléculas de ARNip de 19 nt de longitud específicas para o110β confirmaron estas observaciones como se representa en la figura 16C. Otra vez la molécula de ARNip modificada de forma similar (V5) era la más activa, indicado por la reducción de la fosforilación de Akt, lo cual indica una menor actividad de la quinasa P (I)-3 debido a menores niveles de p110β. La menor actividad de las moléculas V6 se puede explicar por la menor estabilidad del dúplex, puesto que la misma estructura era activa en el experimento de bloqueo de PTEN con ARNip de 21 nucleótidos de longitud. Aunque se sabe que la modificación 2'-O-metilo en ambas cadenas enfrentadas entre sí reducirá la estabilidad de los dúplex de ácido nucleico, la diferencia entre la actividad de las moléculas de ARNip V4 y V5 (figuras 16B y C) probablemente no se debe a diferencias en estabilidad de dúplex puesto que el número de apareamiento de bases de nucleótidos

modificados y no modificados es el mismo. Esta diferencia de actividad se puede deber a requisitos específicos en la interacción de las proteínas implicadas en la degradación del ARNm objetivo. A partir de estos experimentos también se puede ver que los nucleótidos más terminales de la cadena antisentido se pueden modificar en el grupo 2'-OH sin pérdida significante de la actividad de silenciamiento.

Ejemplo 12

Estructuras de bucle diferentes son funcionales para mediar la interferencia por ARN

Para ensayar si las moléculas de ARNi, preferiblemente moléculas de ARNi sintéticas con estructuras autocomplementarias pueden inhibir la expresión de genes de forma tan eficaz como las moléculas de ARNip bicatenarias convencionales, se transfectaron células HeLa con ARNip sintético específico para p110β. Las transfecciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos o 10 cm (de 30% a 50% de confluencia) usando diferentes lípidos catiónicos tales como oligofectamina, lipofectamina (Life Technologies), se transfectaron GeneBlocs por adición de complejo concentrado 5x previamente formado de GB y lípido en medio sin suero a células en medio completo. El volumen total de transfección era 100 μl para las células cultivadas en placas de 96 pocillos y 10 ml para las células en placas de 10 cm. La concentración final de lípidos era 0,8 a 1,2 μg/ml dependiendo de la densidad celular; la concentración de moléculas de ARNi se indica en cada experimento.

Una valoración dependiente de la dosis mostró que no había diferencia significativa en la eficacia de bloqueo del ARNm lograda con el oligómero de 21 nt de longitud bicatenario convencional y las correspondientes moléculas monomoleculares, cuando se analizaron por PCR (Taqman) en tiempo real (figura 17A). Se ensayaron dos estructuras de bucle diferentes $(A)_{12}$ y un bucle pA derivado de VIH en paralelo con resultados similares. Una comparación de la posición relativa de la secuencia antisentido y la estructura de bucle puso de manifiesto una mayor eficacia de bloqueo cuando la secuencia antisentido estaba situada en 3' del bucle (figura 17B, compárense las construcciones 3A, 3B y 4A, 4B).

Ejemplo 13

Estudios de la eficacia de diferentes bucles de horquilla intramoleculares y "burbujas" intermoleculares

Se ensayó la influencia de las diferentes estructuras de bucle en la inhibición del ARNm y la expresión de proteína. Para estos experimentos se eligieron Akt1 y Akt2 como objetivos. El enfoque experimental era similar al descrito en el ejemplo 12.

Era significativo que la reducción del ARNm de Akt1 representada en la figura 18A y 18B así como los niveles de proteína Akt1 representados en la figura 18C, eran completamente independientes de la estructura de bucle ensayada (compárense las moléculas 5A, 6A, 7A, 8A) (la estructura de la molécula de ARNi ensayada se representa siempre debajo del diagrama de barras). Incluso una molécula que contenía una estructura bastante no fisiológica tal como un conector de polietilenglicol (PEG) como un bucle, reducía eficazmente la expresión de Akt1, lo que indicaba que el tamaño y la secuencia de nucleótidos del bucle no es crucial (figura 18A; molécula 8A). Se usó una molécula de ARNip sintética específica para Akt2 (9A) para controlar la especificidad, y no tuvo efecto en los niveles de Akt1, como se muestra en la figura 15A. Sin embargo, silenciaba eficazmente la expresión de Akt2 (figura 18B; figura 18C). Las moléculas de ARN autocomplementarias con estructuras de bucle tienen la posibilidad de reasociarse como cadenas dobles en estructuras monomoleculares o bimoleculares en condiciones de hibridación fisiológica (figura 18B, estructura de bucle o burbuja). Para abordar la cuestión de si las moléculas de ARNip ejercen su función por adaptación de un bucle intramolecular o una "burbuja" intermolecular (se muestra esquemáticamente en la figura 18B) se transfectaron dos moléculas que no eran capaces de doblarse sobre sí mismas. Estas construcciones contenían las secuencias específicas para Akt1 y Akt2 en la misma molécula (figura 18B, construcciones 10A, 10B) y se diseñaron para que se restringieran a la formación de un dúplex bimolecular ("burbuja"). Sorprendentemente, esta molécula medió eficazmente el bloqueo de ARNm tanto de Akt1 como de Akt2, así como el bloqueo de proteínas cuando se transfectó después de reasociación de ambas cadenas.

No está claro si las estructuras de bucle y burbuja son realmente sustratos para las enzimas que procesan el ARN, p. ej. *Dicer*. En relación con esto, un estudio reciente de Paddison y colaboradores sugiere que los ARNip que contienen horquilla dependen más de la actividad de *Dicer* que los ARNip bicatenarios. Sin embargo, estos datos que demuestran la actividad de interferencia de ARN usando una molécula conectora de PEG, indican que es probable que la secuencia conectora sea irrelevante.

REIVINDICACIONES

1. Un ácido ribonucleico que comprende una estructura bicatenaria, en el que la estructura bicatenaria comprende una primera cadena y una segunda cadena, en el que la primera cadena comprende un primer segmento de nucleótidos contiguos y en el que dicho primer segmento es al menos parcialmente complementario de un ácido nucleico objetivo, y la segunda cadena comprende un segundo segmento de nucleótidos contiguos y en el que dicho segundo segmento es al menos parcialmente idéntico al ácido nucleico objetivo,

caracterizado porque dicho primer segmento y dicho segundo segmento comprenden un patrón que consiste en una pluralidad de grupos de nucleótidos modificados que tienen una modificación en la posición 2', de modo que en el segmento cada grupo de nucleótidos modificados está flanqueado en uno o ambos lados por un grupo de nucleótidos flanqueadores en el que los nucleótidos flanqueadores que forman el grupo de nucleótidos flanqueadores son nucleótidos no modificados o nucleótidos que tienen una modificación diferente de la modificación de los nucleótidos modificados.

2. El ácido ribonucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el grupo de nucleótidos modificados y/o el grupo de nucleótidos flanqueadores comprenden un número de nucleótidos, en los que el número se selecciona del grupo que comprende de 1 nucleótido a 10 nucleótidos.

3. El ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el patrón de nucleótidos modificados de dicho primer segmento es el mismo que el patrón de nucleótidos modificados de dicho segundo segmento.

4. El ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el patrón de dicho primer segmento se alinea con el patrón de dicho segundo segmento.

5. El ácido ribonucleico de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el patrón de dicho primer segmento está desplazado en uno o más nucleótidos respecto al patrón del segundo segmento.

6. El ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la modificación se selecciona del grupo que comprende amino, flúor, metoxi, alcoxi y alquilo.

7. El ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la estructura bicatenaria tiene extremo romo.

8. El ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la estructura bicatenaria tiene extremos romos en ambos lados.

9. El ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la estructura bicatenaria tiene el extremo romo en el lado de la estructura bicatenaria que está definido por el extremo 5' de la primera cadena y el extremo 2' de la segunda cadena.

10. El ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la estructura bicatenaria tiene el extremo romo en la estructura bicatenaria que está definido por el extremo 3' de la primera cadena y el extremo 5' de la segunda cadena.

11. El ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la primera cadena comprende un extremo protuberante en el extremo 5' y la segunda cadena comprende un extremo protuberante en el extremo 5'.

12. El ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que ambas cadenas tienen un extremo protuberante de al menos un nucleótido en el extremo 3'.

13. El ácido ribonucleico de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12, en el que el extremo protuberante consiste en al menos un nucleótido que se selecciona del grupo que comprende ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos.

14. El ácido ribonucleico de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el nucleótido tiene una modificación, de modo que dicha modificación se selecciona preferiblemente del grupo que comprende nucleótidos que son un abásico invertido y nucleótidos que tienen una modificación NH_2 en la posición 2'.

15. El ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la longitud de la estructura bicatenaria tiene una longitud de aproximadamente 17 a 21 y más preferiblemente 18 ó 19 bases.

16. El ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 9 a 14, en el que la longitud de dicha primera cadena y la longitud de dicha segunda cadena se seleccionan independientemente entre sí del grupo que comprende los intervalos de aproximadamente 15 a aproximadamente 23 bases, 17 a 21 bases y 18 ó 19 bases.

17. El ácido ribonucleico de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la longitud de dicha primera cadena y la longitud de dicha segunda cadena se seleccionan independientemente entre sí del grupo que comprende los intervalos de 17 a 21 bases y 18 ó 19 bases.

18. El ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que la complementaridad entre dicha primera cadena y el ácido nucleico objetivo es perfecta.

19. El ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que él dúplex formado entre la primera cadena y el ácido nucleico objetivo comprende al menos 15 nucleótidos, en el que hay un apareamiento erróneo o dos apareamientos erróneos entre dicha primera cadena y el ácido nucleico objetivo que forman dichas estructuras bicatenarias.

20. El ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 5 a 19, en la medida en que no se refiere a la reivindicación 4, en el que tanto la primera cadena como la segunda cadena comprenden un patrón que consiste en una pluralidad de grupos de nucleótidos modificados y una pluralidad de grupos de nucleótidos flanqueadores,

en el que cada grupo de nucleótidos modificados comprende al menos un nucleótido y en el que cada grupo de nucleótidos flanqueadores comprende al menos un nucleótido;

y cada grupo de nucleótidos modificados de la primera cadena está alineado con un grupo de nucleótidos flanqueadores en la segunda cadena, en el que

el nucleótido 5' más terminal de la primera cadena es un nucleótido del grupo de nucleótidos modificados, y el nucleótido 3' más terminal de la segunda cadena es un nucleótido del grupo de nucleótidos flanqueadores.

21. El ácido ribonucleico de acuerdo con la reivindicación 20, en el que cada grupo de nucleótidos modificados consiste en un solo nucleótido y/o cada grupo de nucleótidos flanqueadores consiste en un solo nucleótido.

22. El ácido ribonucleico de acuerdo con la reivindicación 21, en el que en la primera cadena el nucleótido que forma el grupo de nucleótidos flanqueadores es un nucleótido no modificado que está dispuesto en una dirección 3' respecto al nucleótido que forma el grupo de nucleótidos modificados, y

en el que en la segunda cadena el nucleótido que forma el grupo de nucleótidos modificados es un nucleótido modificado que está dispuesto en la dirección 5' respecto al nucleótido que forma el grupo de nucleótidos flanqueadores.

23. El ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en el que la primera cadena comprende de ocho a doce, preferiblemente de nueve a once grupos de nucleótidos modificados, y en el que la segunda cadena comprende de siete a once, preferiblemente de ocho a diez grupos de nucleótidos modificados.

24. El ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la primera cadena y la segunda cadena están unidas por una estructura de bucle.

25. El ácido ribonucleico de acuerdo con la reivindicación 24, en el que la estructura de bucle está compuesta de un polímero de ácido no nucleico.

26. El ácido ribonucleico de acuerdo con la reivindicación 25, **caracterizado** porque el polímero de ácido no nucleico es polietilenglicol.

27. El ácido ribonucleico de acuerdo con la reivindicación 24, en el que la estructura de bucle está compuesta de un ácido nucleico.

28. El ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, **caracterizado** porque el extremo 5' de la primera cadena está unido al extremo 3' de la segunda cadena.

29. El ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, **caracterizado** porque el extremo 3' de la primera cadena está unido al extremo 5' de la segunda cadena.

30. El ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, en el que el gen objetivo se selecciona del grupo que comprende genes estructurales, genes domésticos, factores de transcripción, factores de motilidad, factores de ciclo celular, inhibidores del ciclo celular, enzimas, factores de crecimiento, citoquinas y supresores de tumores.

31. Uso de un ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, para la validación de objetivos.

32. Uso de un ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, para fabricar un medicamento.

33. El uso de acuerdo con la reivindicación 32, en el que el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad o una afección que se selecciona del grupo que comprende glioblastoma, cáncer de próstata, cáncer de pecho, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer pancreático y leucemia, diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares y enfermedades metabólicas.

34. Una célula, preferiblemente una célula bloqueada, que contiene un ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en la que si la célula es una célula humana, la célula humana es una célula humana aislada.

35. Un organismo, preferiblemente un organismo bloqueado, que contiene un ácido ribonucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en el que el organismo es diferente de un ser humano.

36. Una composición que contiene un ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30.

37. Una composición farmacéutica que contiene un ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

38. Un método *in vitro* para inhibir la expresión de un gen objetivo en una célula o su derivado, que comprende introducir un ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en la célula en una cantidad suficiente para inhibir la expresión del gen objetivo, en el que el gen objetivo es el gen objetivo del ácido ribonucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30.

Fig. 1

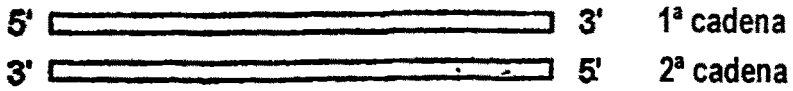


Fig. 2

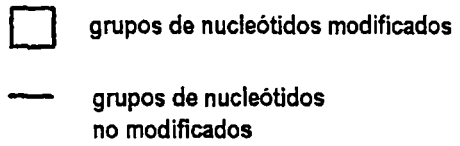


Fig. 2A

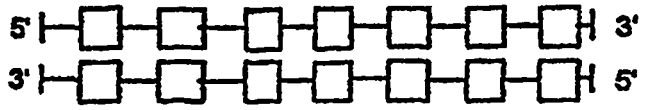


Fig. 2B

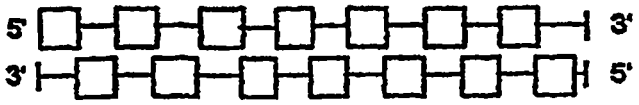


Fig. 2C

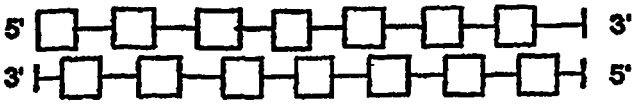
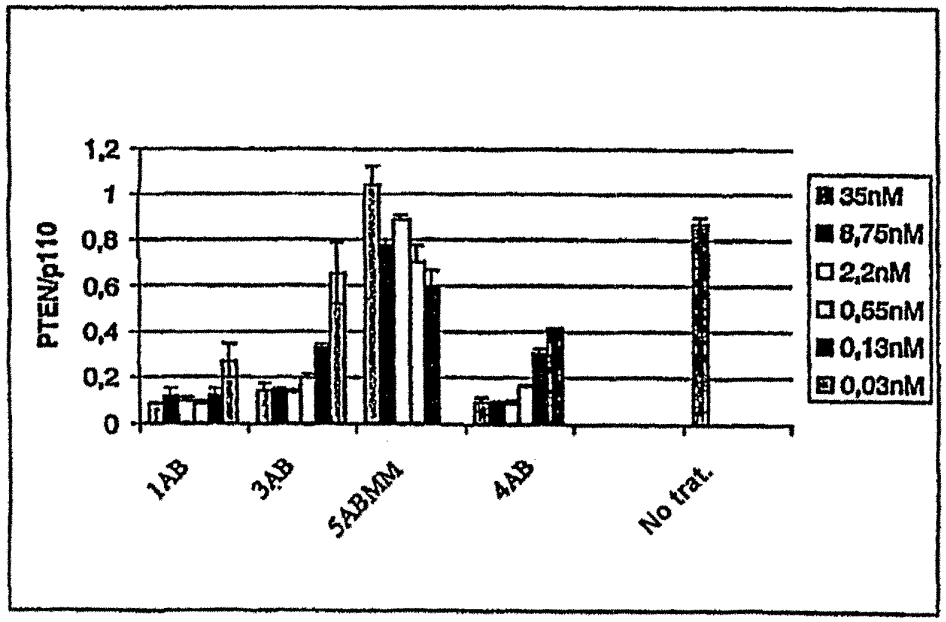


Fig.3



3A

SOLO ARN CON 2 DESOXI EN CADA EXTREMO

1A 5'- cuccuuuuguuucugcuaacg-TT
1B 3'-TT-gaggaaaacaaagacgauugc

SOLO ARN CON GRUPOS NH2 EN CADA EXTREMO 3' Y 2 DESOXI

3A 5'- cuccuuuuguuucugcuaacg-TT-NH2
3B 3'-NH2-TT-gaggaaaacaaagacgauugc

SOLO ARN CON ABÁSICO INVERTIDO Y 2 TT

4. 16153-iB (iB en los extremos 3')
4A 5'- cuccuuuuguuucugcuaacg-TT-iB
4B 3'-iB-TT-gaggaaaacaaagacgauugc

SOLO ARN CON 2 DESOXI EN CADA EXTREMO

5AMM 5'- cucauuuucuuugugcucacg-TT
5BMM 3'-TT-gaguaaaagaaacacgagugc

3B

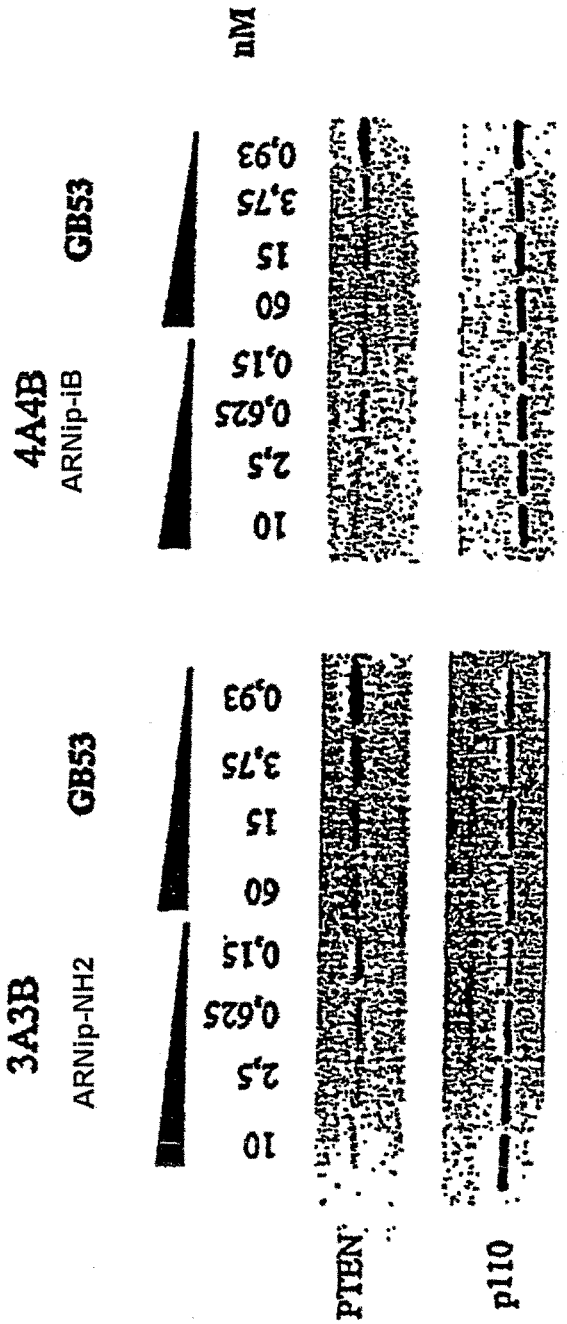
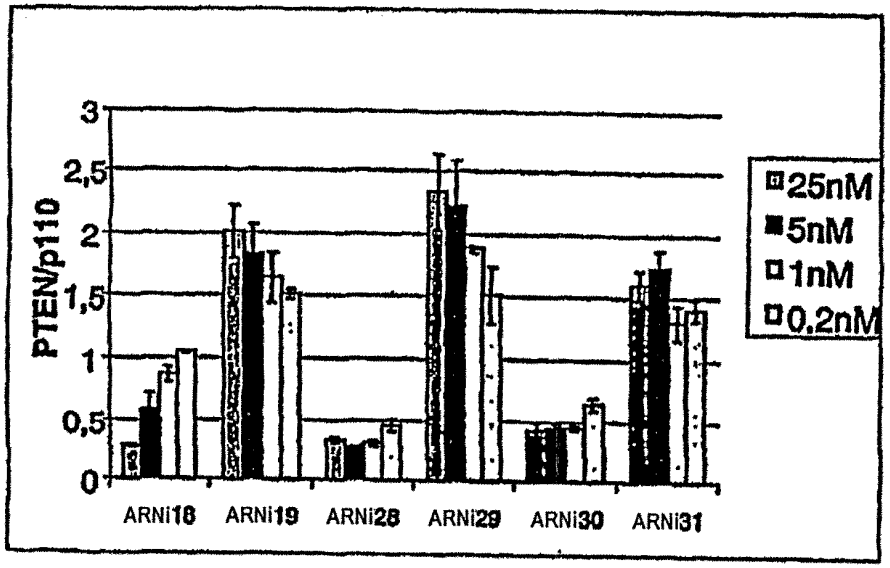

3A3B
ARNip-NH2
GB53
10
2,5
0,625
0,15
60
15
3,75
0,93
4A4B
ARNip-iB
GB53
10
2,5
0,625
0,15
60
15
3,75
0,93
nM
PTEN
p110

Fig. 3C

4A



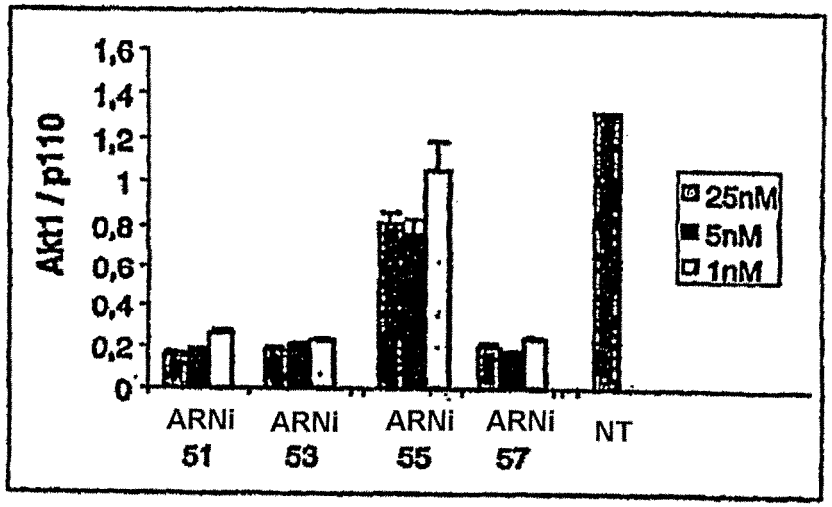
4B

18A	5'- cuccuuuuguuucugcuaacg-TT
18B	3'-TT-gaggaaaacaaagacgauugc
19A(MM)	5'- cucauuuucuuugugcucacg-TT
19B(MM)	3'-TT-gaguaaaagaaacacgagugc
28A	5'- cuccuuuuguuucugcuaacg-
28B	3'- gaggaaaacaaagacgauugc-
29A(MM)	5'- cucauuuucuuugugcucacg-
29B(MM)	3'- gaguaaaagaaacacgagugc
30A	5'-TT-cuccuuuuguuucugcuaacg-
30B	3' -gaggaaaacaaagacgauugc-TT
31A (MM)	5'-TT-cucauuuucuuugugcucacg-
31B (MM)	3' -gaguaaaagaaacacgagugc-TT

Fig. 4

Fig. 5

5A

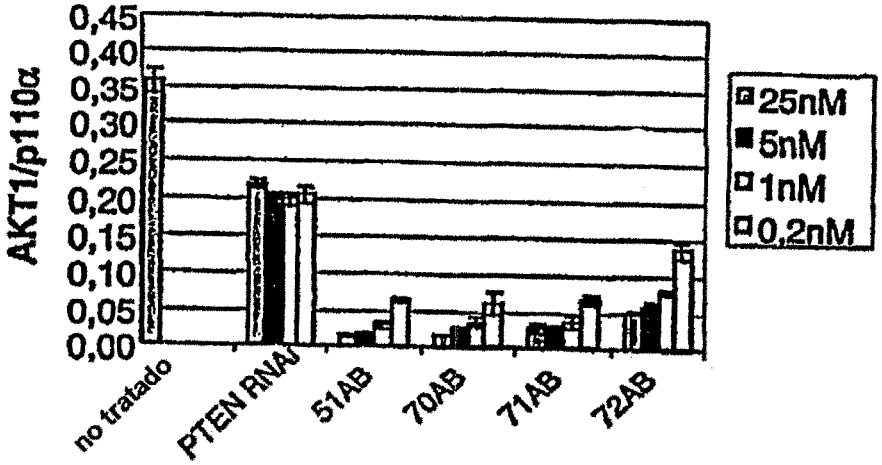


5B

51A	5'-	-ucuugauguacuccccucg-uu	19nt 3'uu
51B	3'-	uu-agaacuacaugaggggagc-	
53A	5'-	-ucuugauguacuccccucg-uu	19nt 3' ARN sec. específica
53B	3'-	cc-agaacuacaugaggggagc-	
55A	5'-	-cuugauguacuccccuc-gu	17nt 3' ARN sec. específica
55B	3'-	ca-gaacuacaugaggggag-	
57A	5'-	-ucuugauguacuccccucg-TT	19nt 3' ADN sec. específica
57B	3'-	CC-agaacuacaugaggggagc-	

Fig. 6

6A



6B

19nt (3'uu)
51A 5'- -ucuugauguacuccccucg-uu
51B 3'- uu-agaacuacaugaggggagc-

19nt (3'TT)
70A 5'- -ucuugauguacuccccucg-TT
70B 3'- TT-agaacuacaugaggggagc-

19nt con 1MM en ambos lados
71A 5'- -acuugauguacuccccucc-TT
71B 3'- TT-ugaacuacaugaggggagg-

19nt con 2MM en ambos lados
72A 5'- -aguugauguacuccccugc-TT
72B 3'- TT-ucaacuacaugaggggacg-

A

Akt1 1A	5′	ucuugauguacucccccucg-uu	19ámero
Akt1 1B	3′	uu-agaacuacaugaggggagc	
Akt1 2A	5′	ucuugauguacucccccucg-tt	19ámero
Akt1 2B	3′	cc-agaacuacaugaggggagc	
Akt1 3A	5′	ucuugauguacucccccucg-TT	19ámero
Akt1 3B	3′	CC-agaacuacaugaggggagc	
Akt1 4A	5′	ucuugauguacucccccucg-TT	19ámero
Akt1 4B	3′	TT-agaacuacaugaggggagc	
Akt1 5A	5′	cuugauguacucccccuc-gt	17ámero
Akt1 5B	3′	ca-gaacuacaugaggggag	
Akt1 6A	5′	acuugauguacucccccucc-TT	19ámero(2MM)
Akt1 6B	3′	TT-ugaacuacaugaggggagg	
Akt1 7A	5′	aguugauguacucccccugc-TT	19ámero(4MM)
Akt1 7B	3′	TT-ucaacuacaugaggggacg	
PTEN 1A	5′	cuccuuuuguuucugcuaacg-TT	21ámero
PTEN 1B	3′	TT-gaggaaaacaaagacgauugc	

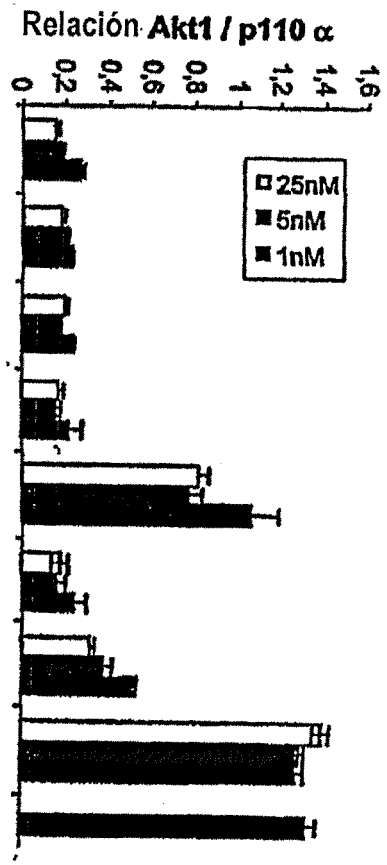


Fig. 7

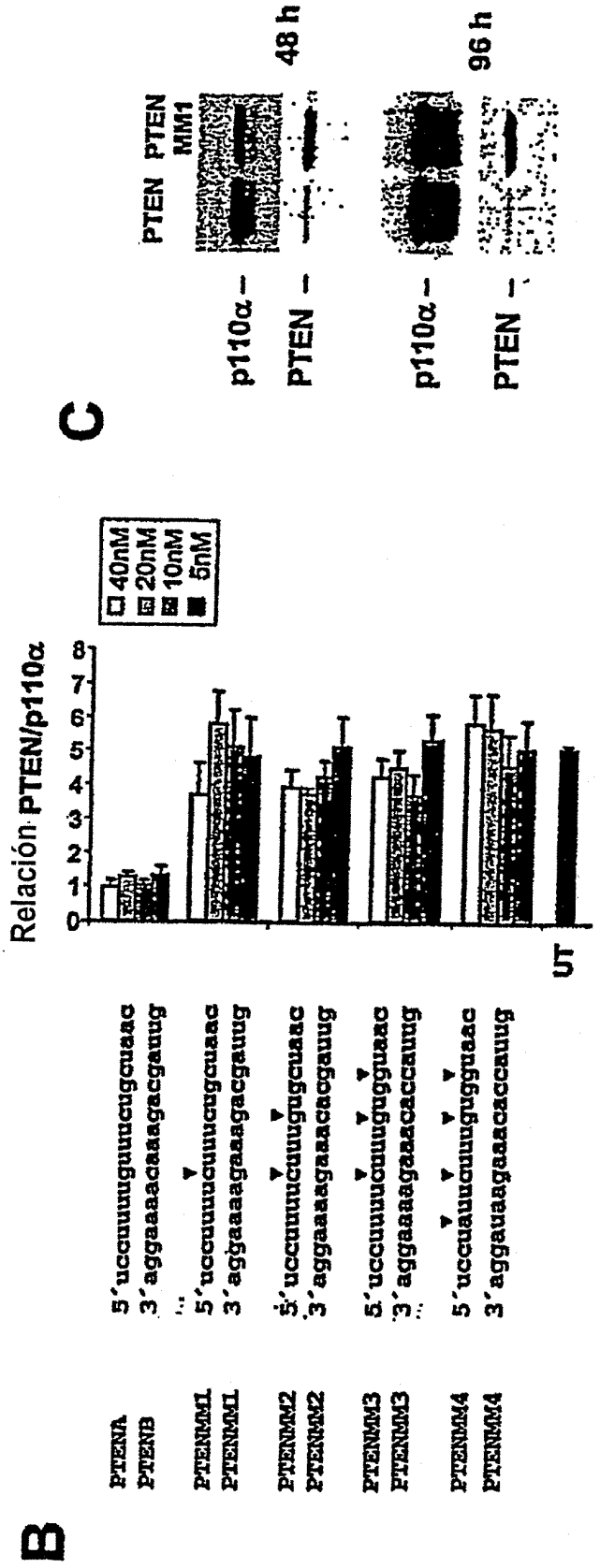
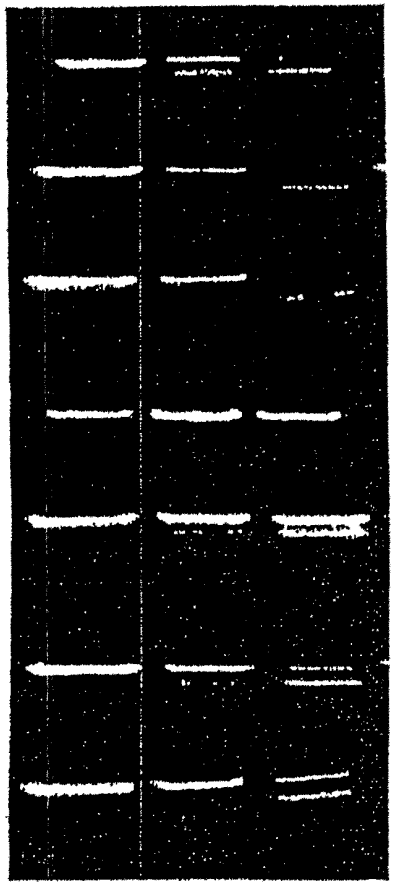

B
PTENA 5´uccuuuguuucugcuaac
PTENB 3´aggaaaacaaagacgauug
PTENMM1 5´uccuuucuuucugcuaac
PTENMM1 3´aggaaaagaaagacgauug
PTENMM2 5´uccuuucuuugugcuaac
PTENMM2 3´aggaaagaaacacgauug
PTENMM3 5´uccuuucuuugugguaac
PTENMM3 3´aggaaaagaaacaccauug
PTENMM4 5´uccuauucuuugugguaac
PTENMM4 3´aggauaagaaacaccauug
Relación PTEN/p110α
0
1
2
3
4
5
6
7
8
40nM
20nM
10nM
5nM
UT
C
PTEN
PTEN MM1
48 h
96 h
p110α –
PTEN –
p110α –
PTEN –

Fig. 7

Fig. 8'

8A



8B

Tuschl

18A 5'- cuccuuuuguuucugcuaacg-TT
18B 3'-TT-gaggaaaacaaagacgauugc

abásico invertido en ambos extremos y 2TT

24A 5'- iB-cuccuuuuguuucugcuaacg-TT-iB
24B 3'-iB-TT-gaggaaaacaaagacgauugc-iB

grupos NH2 en ambos extremos y 2-desoxi

26A 5'- NH2-cuccuuuuguuucugcuaacg-TT-NH2
26B 3'-NH2-TT-gaggaaaacaaagacgauugc-NH2

modificado con 2'-O-metilo con 2-desoxi en cada extremo

79A 5'- cuccuuuuguuucugcuaacg-TT
79B 3'- TT-gaggaaaacaaagacgauugc

Solo ARN

28A 5'- cuccuuuuguuucugcuaacg-
28B 3'- gaggaaaacaaagacgauugc-

Solo ARN con 2-desoxi en cada extremo 5'

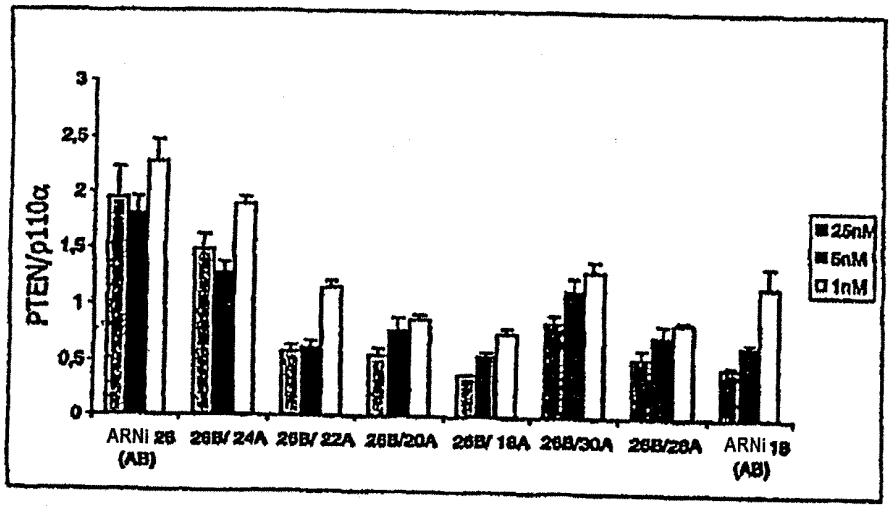
30A 5'-TT-cuccuuuuguuucugcuaacg-
30B 3'- gaggaaaacaaagacgauugc-TT

Grupos NH2 en cada extremo 3' y 2-desoxi

3A 5'- cuccuuuuguuucugcuaacg-TT-NH2
3B 3'-NH2-TT-gaggaaaacaaagacgauugc-

Fig. 9

9A



9B

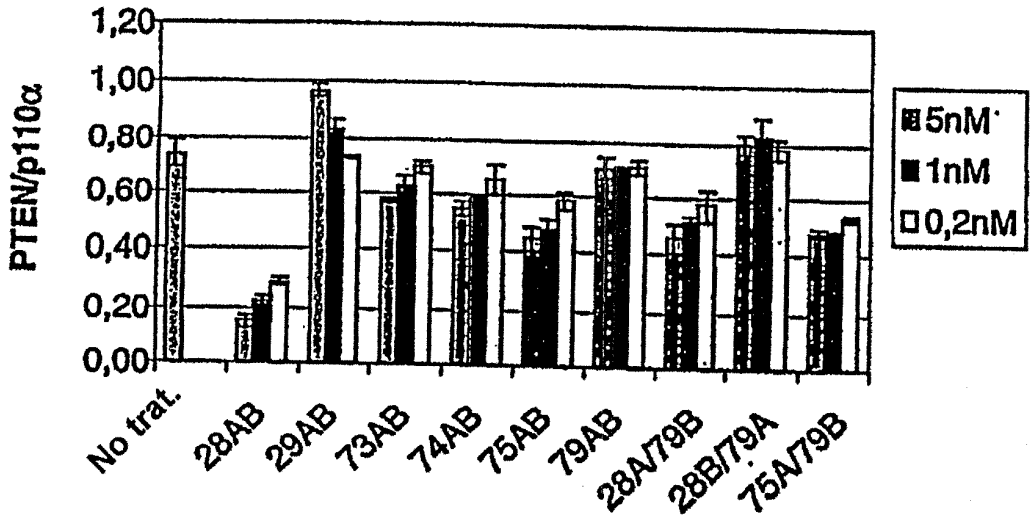
26A	5'- NH2-cuccuuuguuucugcuaacg-TT-NH2
26B	3'-NH2-TT-gaggaaaacaaagacgauugc-NH2
24A	5'- iB-cuccuuuguuucugcuaacg-TT-iB
26B	3'-NH2-TT-gaggaaaacaaagacgauugc-NH2
22A	5'- cuccuuuguuucugcuaacg-TT-iB
26B	3'-NH2-TT-gaggaaaacaaagacgauugc-NH2
20A	5'- cuccuuuguuucugcuaacg-TT-NH2
26B	3'-NH2-TT-gaggaaaacaaagacgauugc-NH2
18A	5'- cuccuuuguuucugcuaacg-TT
26B	3'-NH2-TT-gaggaaaacaaagacgauugc-NH2
30A	5'- TT-cuccuuuguuucugcuaacg-
26B	3'-NH2-TT-gaggaaaacaaagacgauugc-NH2
28A	5'- cuccuuuguuucugcuaacg-
26B	3'-NH2-TT-gaggaaaacaaagacgauugc-NH2
18A	5'- cuccuuuguuucugcuaacg-TT
18B	3'- TT-gaggaaaacaaagacgauugc

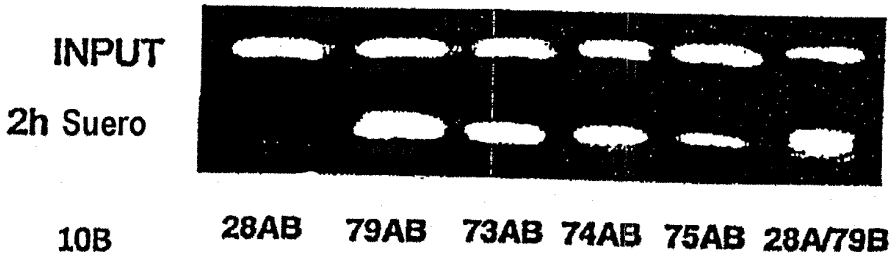
9C

-nnnnnnnnnnnnnnn-tt NH2-nnnnnnnnnnnnnnn-NH2	funcional
-nnnnnnnnnnnnnnn-tt-NH2 NH2-nnnnnnnnnnnnnnn-NH2	funcional
NH2-nnnnnnnnnnnnnnn-tt-NH2 tt-nnnnnnnnnnnnnnn-tt	no funcional

Fig. 10

10A





10B

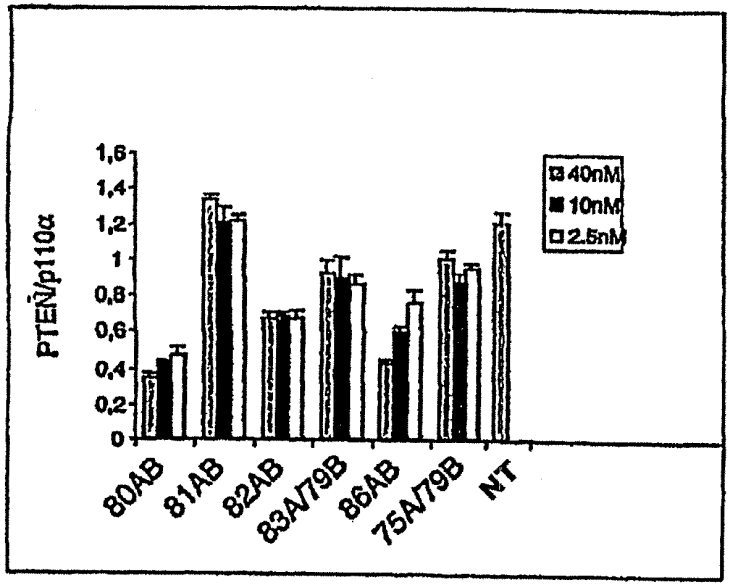
10C

ARN La negrilla itálica representa 2'-O-metilo

28A	5'-	cuccuuuuguuucugcuaacg-
28B	3'-	gaggaaaacaaagacgauugc
29A	5'-	cuccuuuucuuugugcuaacg
29B	3'-	gaggaaaacaaacacgauugc
73A	5'-	cuccuuuuguuucugcuaacg-
73B	3'-	-gaggaaaacaaagacgauugc-
74A	5'-	cuccuuuuguuucugcuaacg-
74B	3'-	-gaggaaaacaaagacgauugc-
75A	5'-	cuccuuuuguuucugcuaacg-
75B	3'-	-gaggaaaacaaagacgauugc-
79A	5'-	cuccuuuuguuucugcuaacg-
79B	3'-	-gaggaaaacaaagacgauugc-
28A	5'-	cuccuuuuguuucugcuaacg-
79B	3'-	-gaggaaaacaaagacgauugc-
79A	5'-	cuccuuuuguuucugcuaacg-
28B	3'-	gaggaaaacaaagacgauugc-
75A	5'-	cuccuuuuguuucugcuaacg-
79B	3'-	-gaggaaaacaaagacgauugc-

Fig. 11

11A



11C

ARN La negrilla itálica representa 2'-O-metilo

80A	5'-	cuccuuuuguuucugcuaacg-
80B	3'-	-gaggaaaacaaagacgauugc-
81A	5'-	cuccuuuuguuucugcuaacg-
81B	3'-	-gaggaaaacaaagacgauugc-
82A	5'-	cuccuuuuguuucugcuaacg-
82B	3'-	gaggaaaacaaagacgauugc-
83A	5'-	cuccuuuuguuucugcuaacg-
79B	3'-	-gaggaaaacaaagacgauugc-
86A	5'-	cuccuuuuguuucugcuaacg-
86B	3'-	-gaggaaaacaaagacgauugc-
75A	5'-	cuccuuuuguuucugcuaacg-
79B	3'-	-gaggaaaacaaagacgauugc-

11B

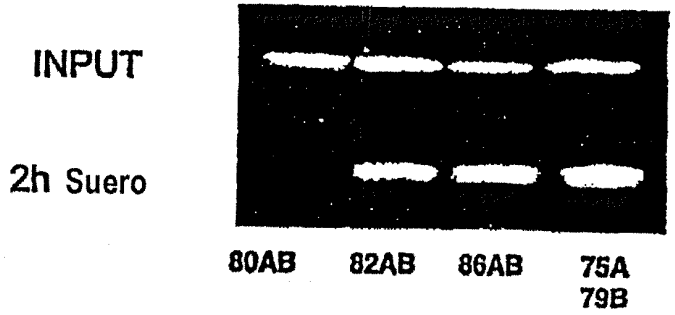
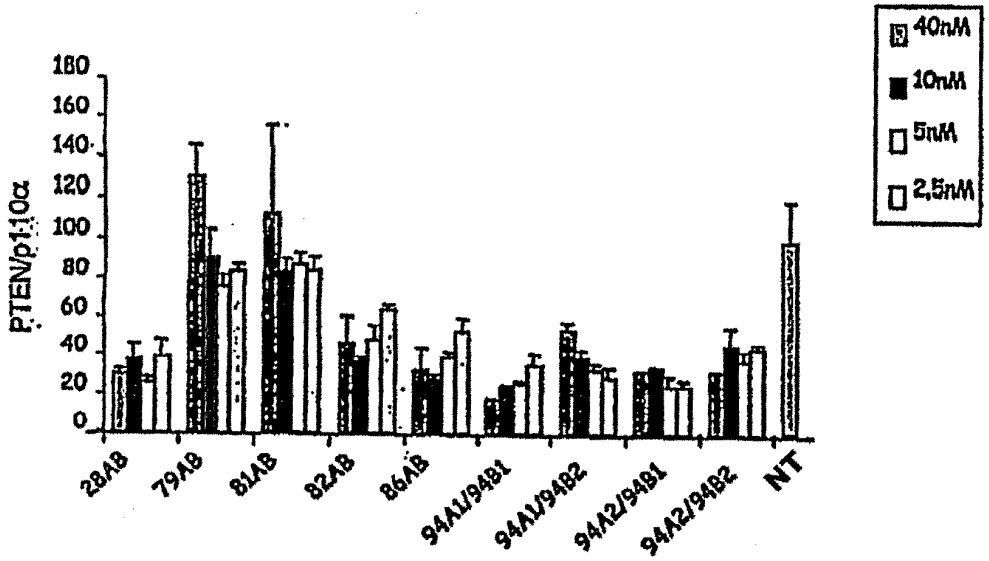


Fig. 12

12A

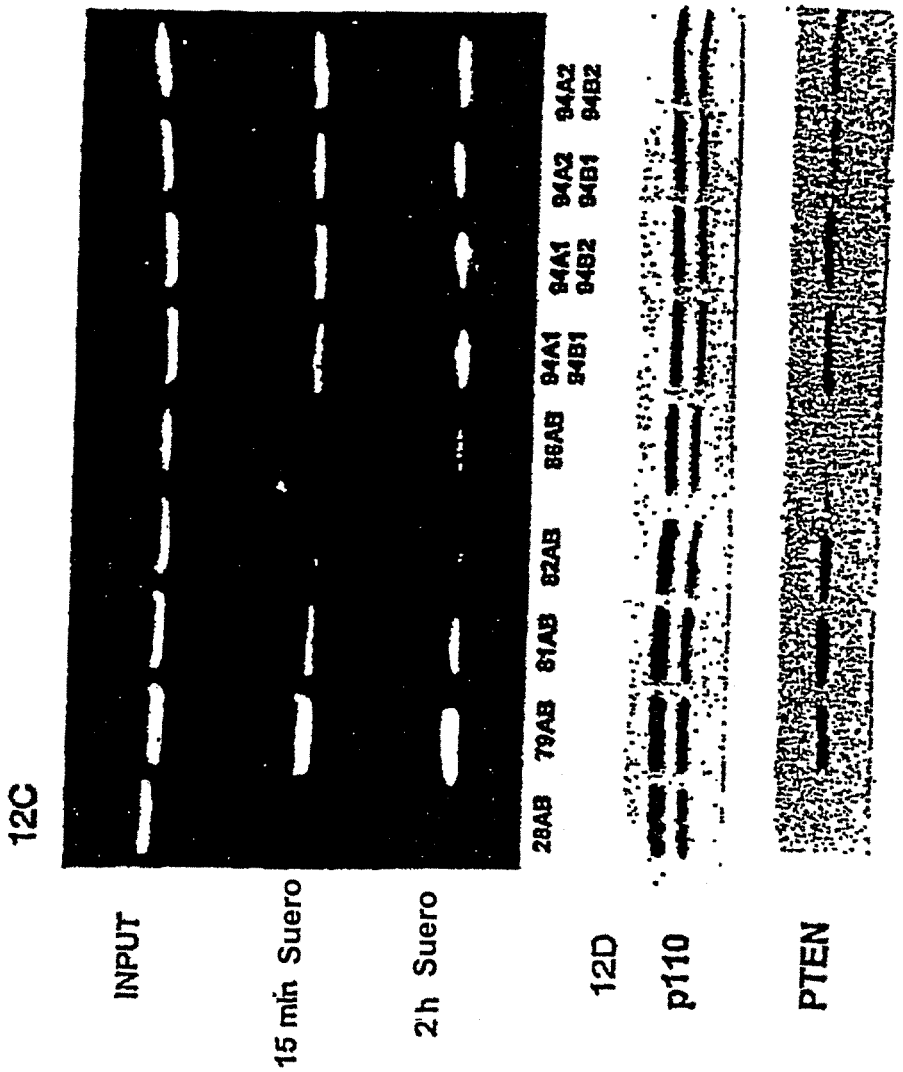


12B

ARN La negrilla itálica representa 2'-O-metilo

28A	5'-	cuccuuuuguuucugcuaacg-
28B	3'-	gaggaaaacaaagacgauugc-
79A	5'-	***cuccuuuuguuucugcuaacg-***
79B	3'-	***gaggaaaacaaagacgauugc-***
81A	5'-	***cuccuuuuguuucugcuaacg-***
81B	3'-	gaggaaaacaaagacgauugc-
82A	5'-	cuccuuuuguuucugcuaacg-
82B	3'-	***gaggaaaacaa***agacgauugc-
86A	5'-	cuccuuuuguuucug***cuaacg-***
86B	3'-	***gagg***aaaacaa***agac***gauugc-
94A1 94B1	5'- 3'-	cuccuuuuguuucugcuaacg- gaggaaaacaaagacgauugc-
94A1 94B2	5'- 3'-	cuccuuuuguuucugcuaacg- gaggaaaacaaagacgauugc-
94A2 94B1	5'- 3'-	cuccuuuuguuucugcuaacg gaggaaaacaaagacgauugc-
94A2 94B2	5'- 3'-	cuccuuuuguuucugcuaacg gaggaaaacaaagacgauugc

Fig. 12


12C
INPUT
15 min Suero
2h Suero
28AB
79AB
81AB
82AB
86AB
94A1
94B1
94A1
94B2
94A2
94B1
94A2
94B2
12D
p110
PTEN

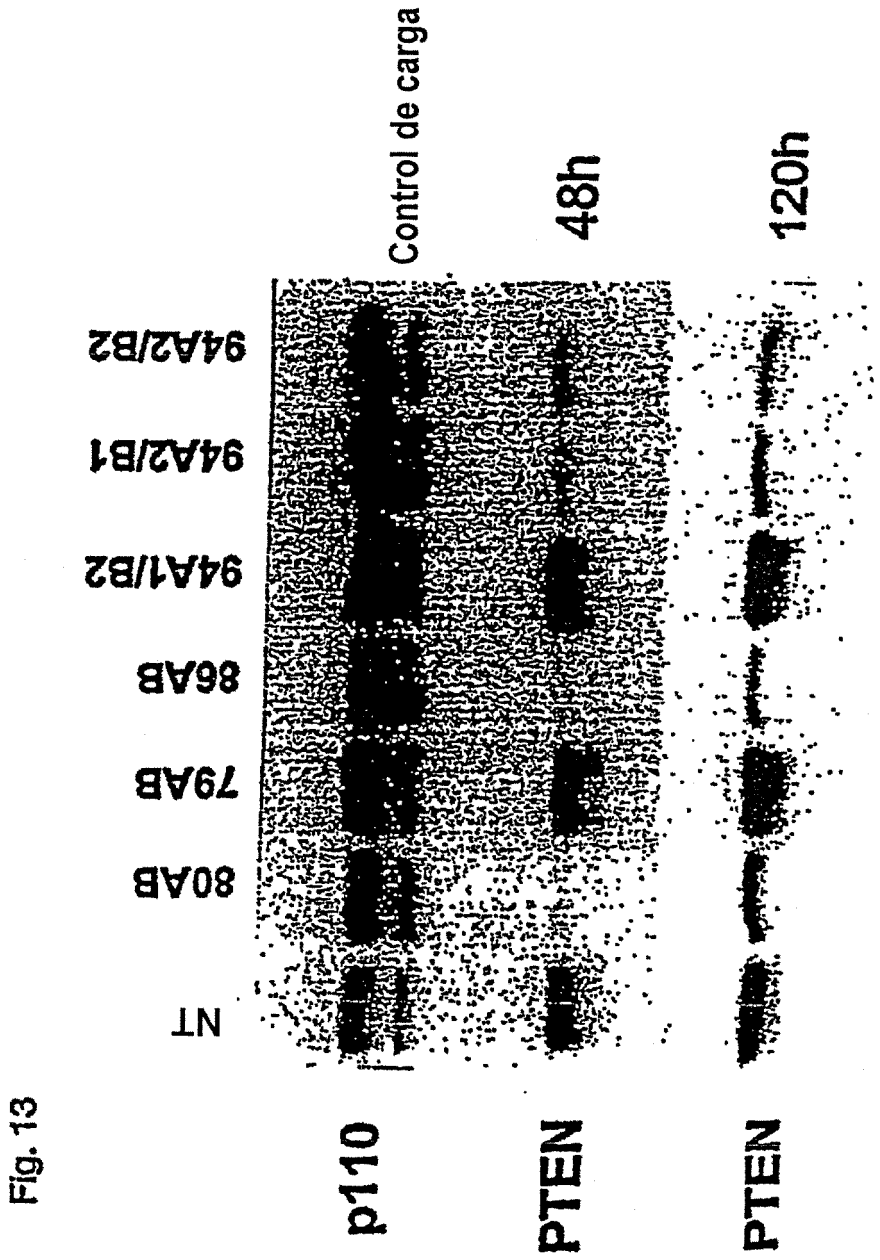

NT
80AB
79AB
86AB
94A1/B2
94A2/B1
94A2/B2
p110
PTEN
PTEN
Control de carga
48h
120h

Fig. 13

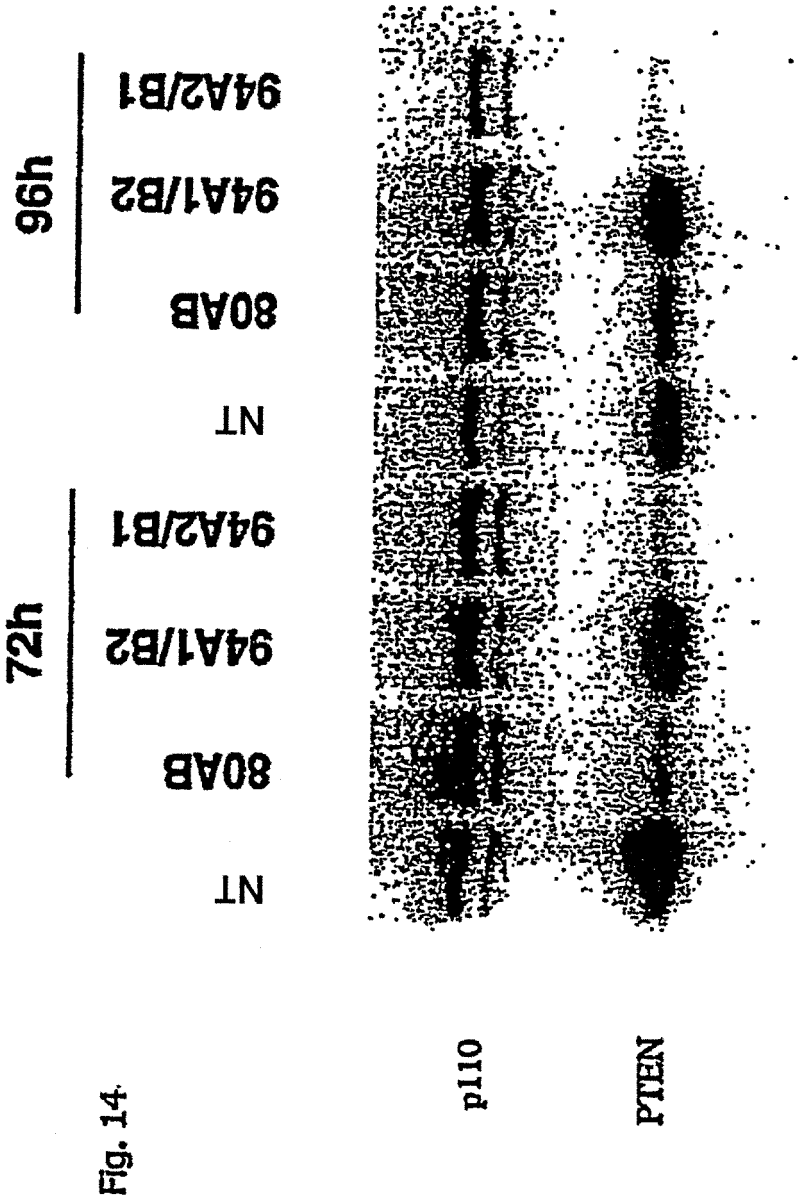

72h
96h
NT
80AB
94A1/B2
94A2/B1
NT
80AB
94A1/B2
94A2/B1
p110
PTEN

Fig. 14.

A

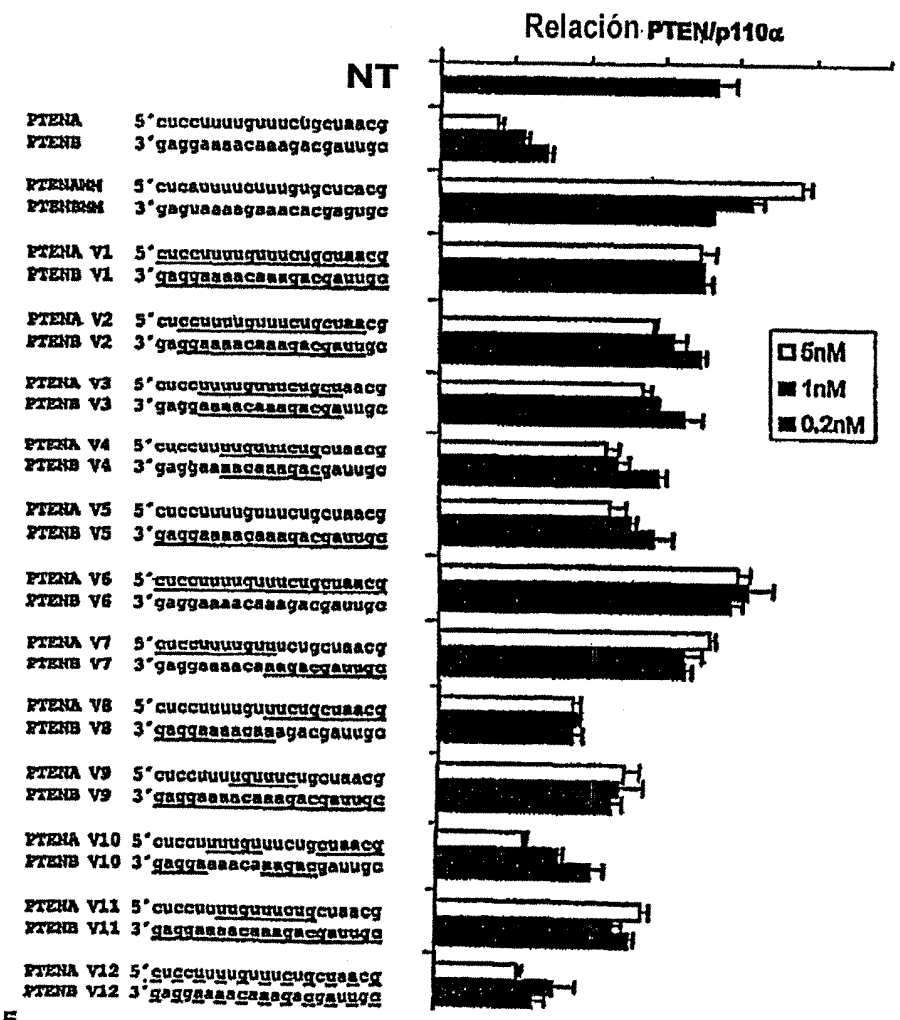
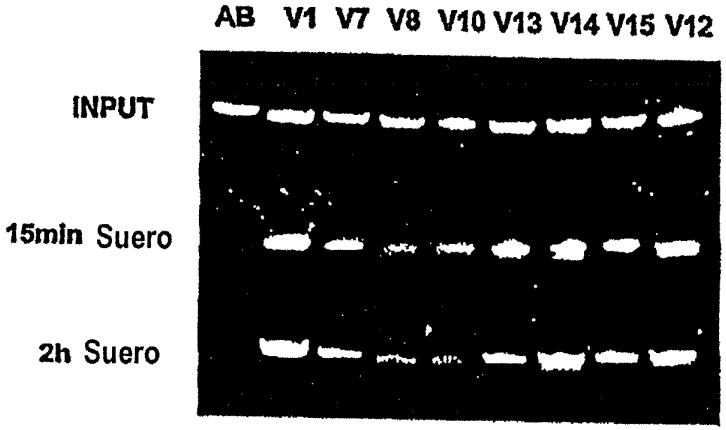

Relación PTEN/p110α
NT
PTENA 5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB 3'gaggaaaacaaagacgauugc
PTENA V1 5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB V1 3'gaggaaaacaaagacgauugc
PTENA V2 5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB V2 3'gaggaaaacaaagacgauugc
PTENA V3 5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB V3 3'gaggaaaacaaagacgauugc
PTENA V4 5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB V4 3'gaggaaaacaaagacgauugc
PTENA V5 5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB V5 3'gaggaaaacaaagacgauugc
PTENA V6 5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB V6 3'gaggaaaacaaagacgauugc
PTENA V7 5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB V7 3'gaggaaaacaaagacgauugc
PTENA V8 5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB V8 3'gaggaaaacaaagacgauugc
PTENA V9 5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB V9 3'gaggaaaacaaagacgauugc
PTENA V10 5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB V10 3'gaggaaaacaaagacgauugc
PTENA V11 5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB V11 3'gaggaaaacaaagacgauugc
PTENA V12 5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB V12 3'gaggaaaacaaagacgauugc
5nM
1nM
0.2nM

Fig. 15

B

PTENA	5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB	3'gaggaaaacaaagacgauugc
PTENA V1	5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB V1	3'gaggaaaacaaagacgauugc
PTENA V7	5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB V7	3'gaggaaaacaaagacgauugc
PTENA V8	5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB V8	3'gaggaaaacaaagacgauugc
PTENA V10	5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB V10	3'gaggaaaacaaagacgauugc
PTENA V13	5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB V13	3'gaggaaaacaaagacgauugc
PTENA V14	5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB V14	3'gaggaaaacaaagacgauugc
PTENA V15	5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB V15	3'gaggaaaacaaagacgauugc
PTENA V12	5'cuccuuuuguuucugcuaacg
PTENB V12	3'gaggaaaacaaagacgauugc



C

D

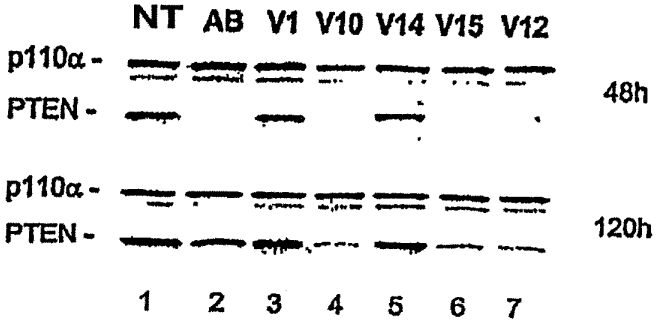
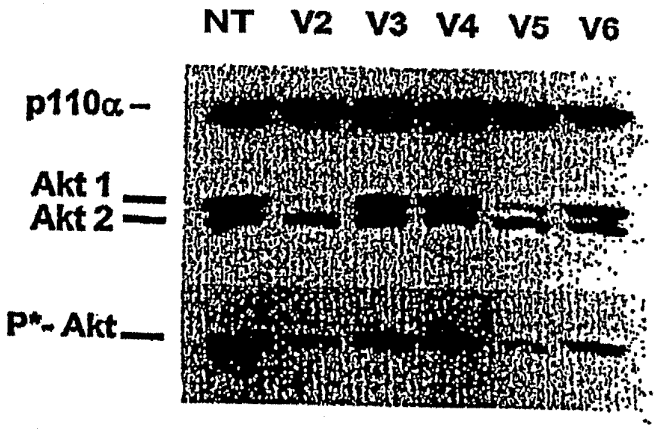


Fig. 15

A

Akt1A V1	5'ucuugauguacuccccucg-TT
Akt1B V1	3'TT-agaacuacaugaggggagc
Akt1A V2	5'ucuugauguacuccccucg
Akt1B V2	3'agaacuacaugaggggagc
Akt1A V3	5'ucuugauguacuccccucg
Akt1B V3	3'agaacuacaugaggggagc
Akt1A V4	5'ucuugauguacuccccucg
Akt1B V4	3'agaacuacaugaggggagc
Akt1A V5	5'ucuugauguacuccccucg
Akt1B V5	3'agaacuacaugaggggagc
Akt1A V6	5'ucuugauguacuccccucg
Akt1B V6	3'agaacuacaugaggggagc



B

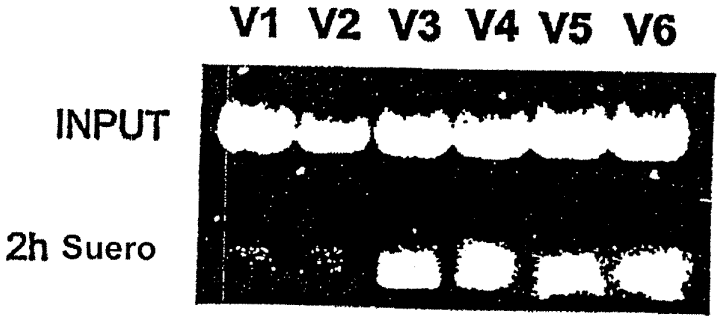


Fig. 16

C

P110β V2	5'aauuccaugguucauucc
P110β V2	3'uuaaggucaccaaguaagg
P110β V3	5'aauuccaugguucauucc
P110β V3	3'uuaaggucaccaaguaagg
P110β V4	5'aauuccaugguucauucc
P110β V4	3'uuaaggucaccaaguaagg
P110β V5	5'aauuccaugguucauucc
P110β V5	3'uuaaggucaccaaguaagg
P110β V6	5'aauuccaugguucauucc
P110β V6	3'uuaaggucaccaaguaagg

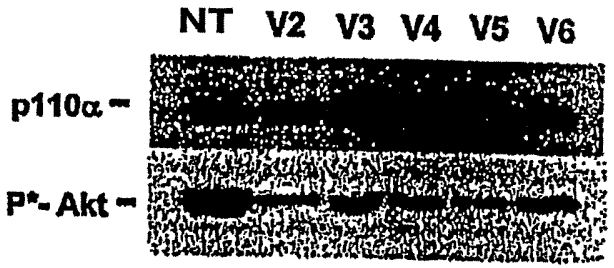


Fig. 16

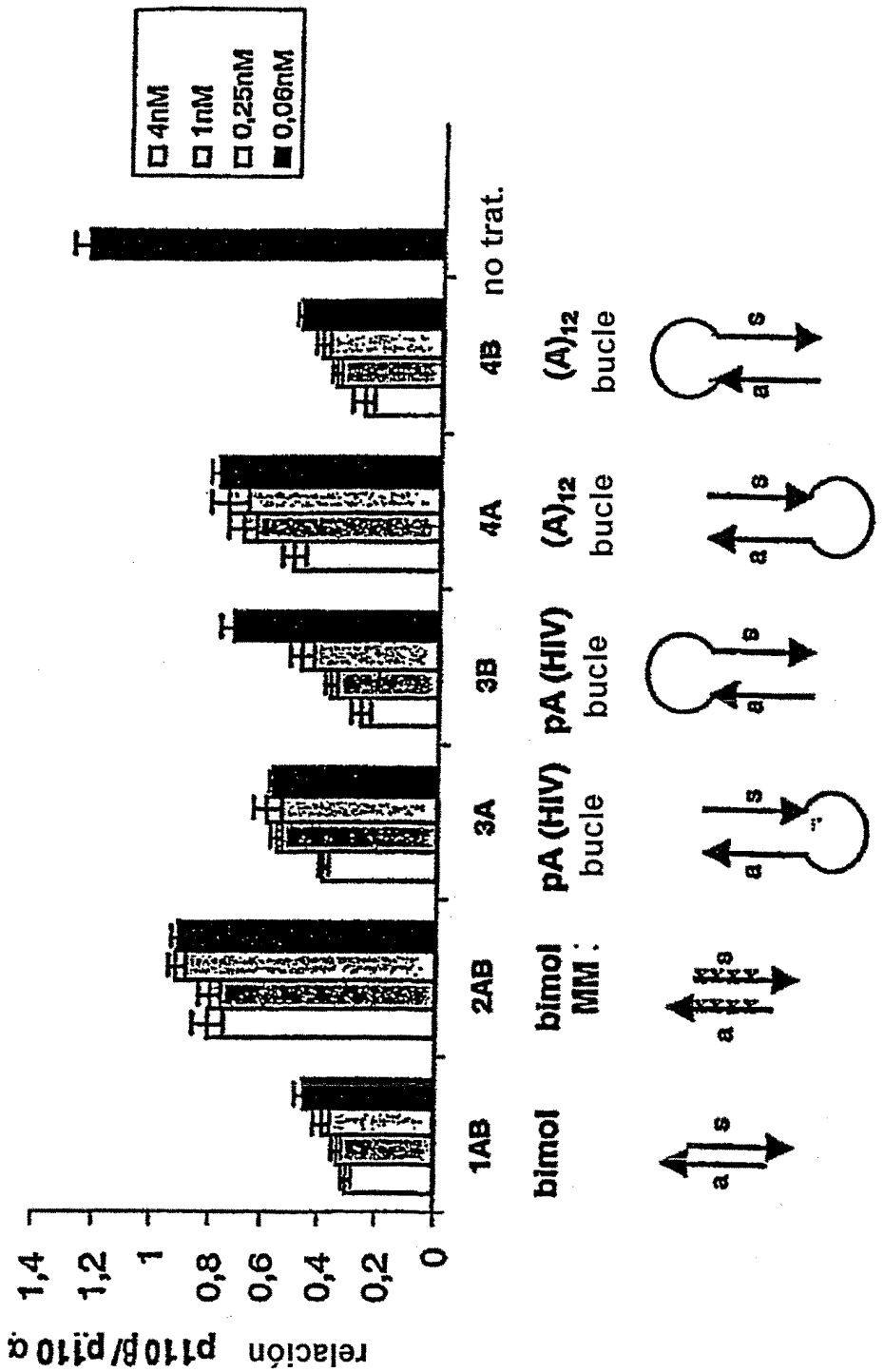
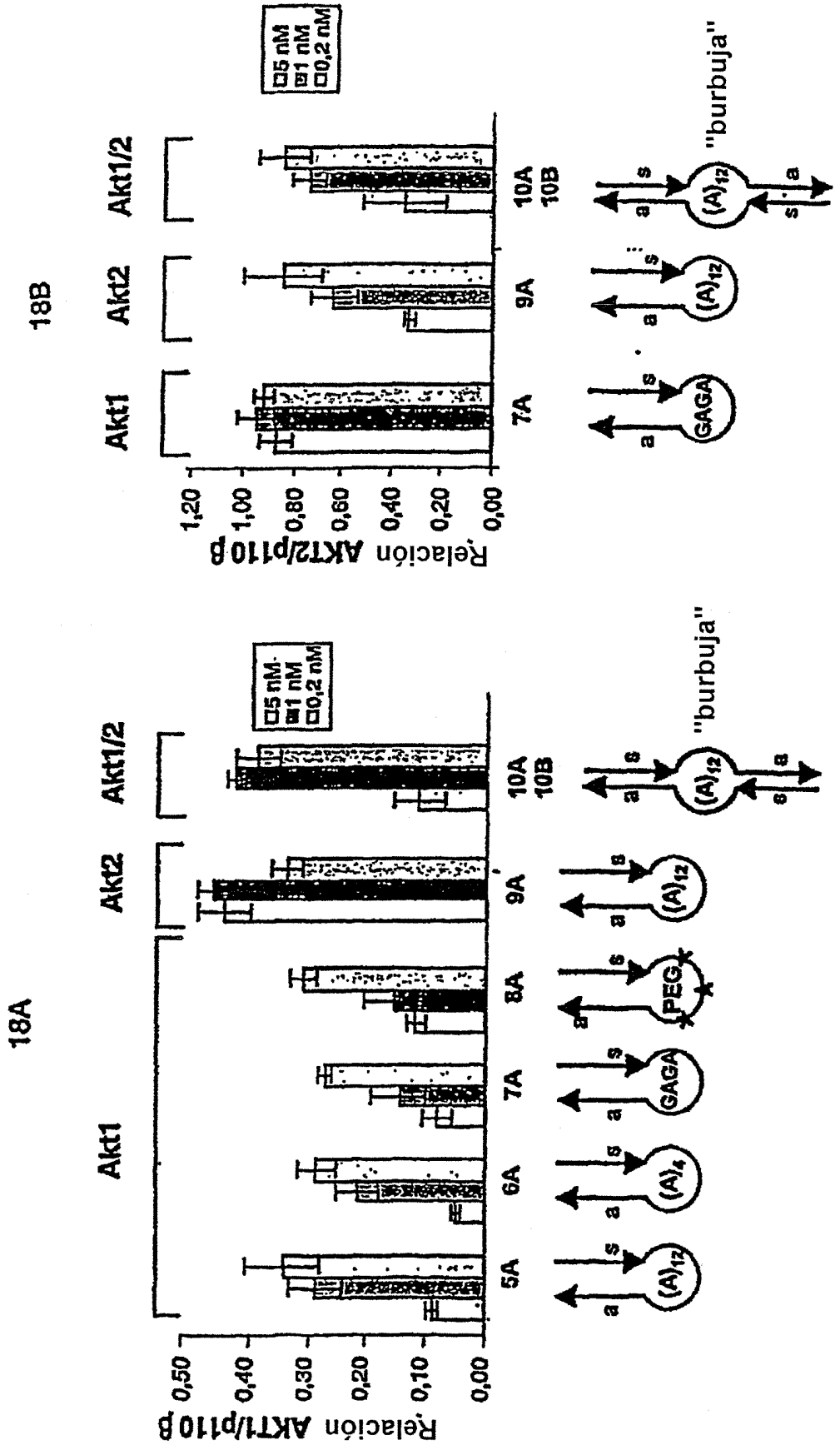


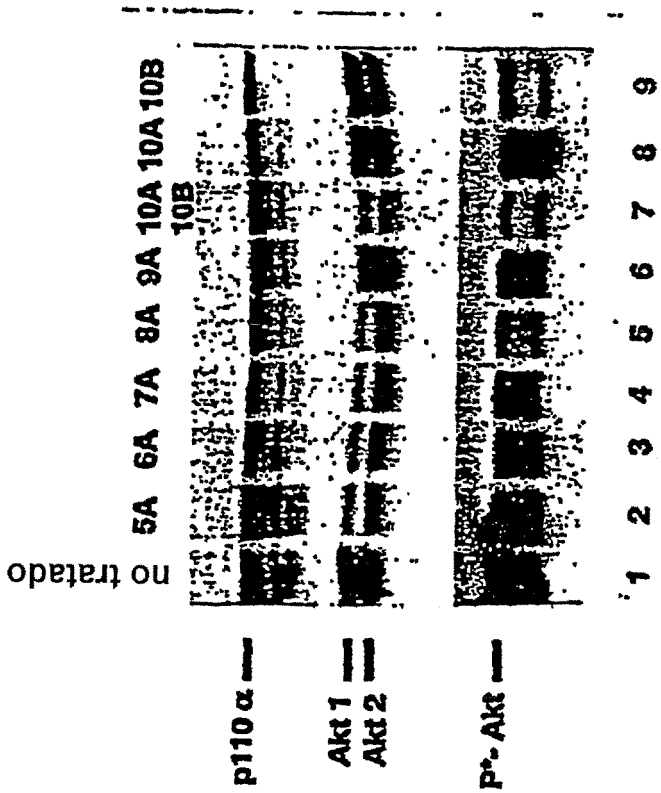
Fig.17

17A

17B

Fig. 18


18A
Relación AKT1/p110 β
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
Akt1
Akt2
Akt1/2
5A
6A
7A
8A
9A
10A
10B
5 nM
1 nM
0,2 nM
(A)12
(A)4
GAGA
PEG
"burbuja"
18B
Relación AKT2/p110 β
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Akt1
Akt2
Akt1/2
7A
9A
10A
10B
5 nM
1 nM
0,2 nM
GAGA
(A)12
"burbuja"


no tratado
5A
6A
7A
8A
9A
10A
10A
10B
10B
p110 α
Akt 1
Akt 2
P*- Akt
1
2
3
4
5
6
7
8
9

18C

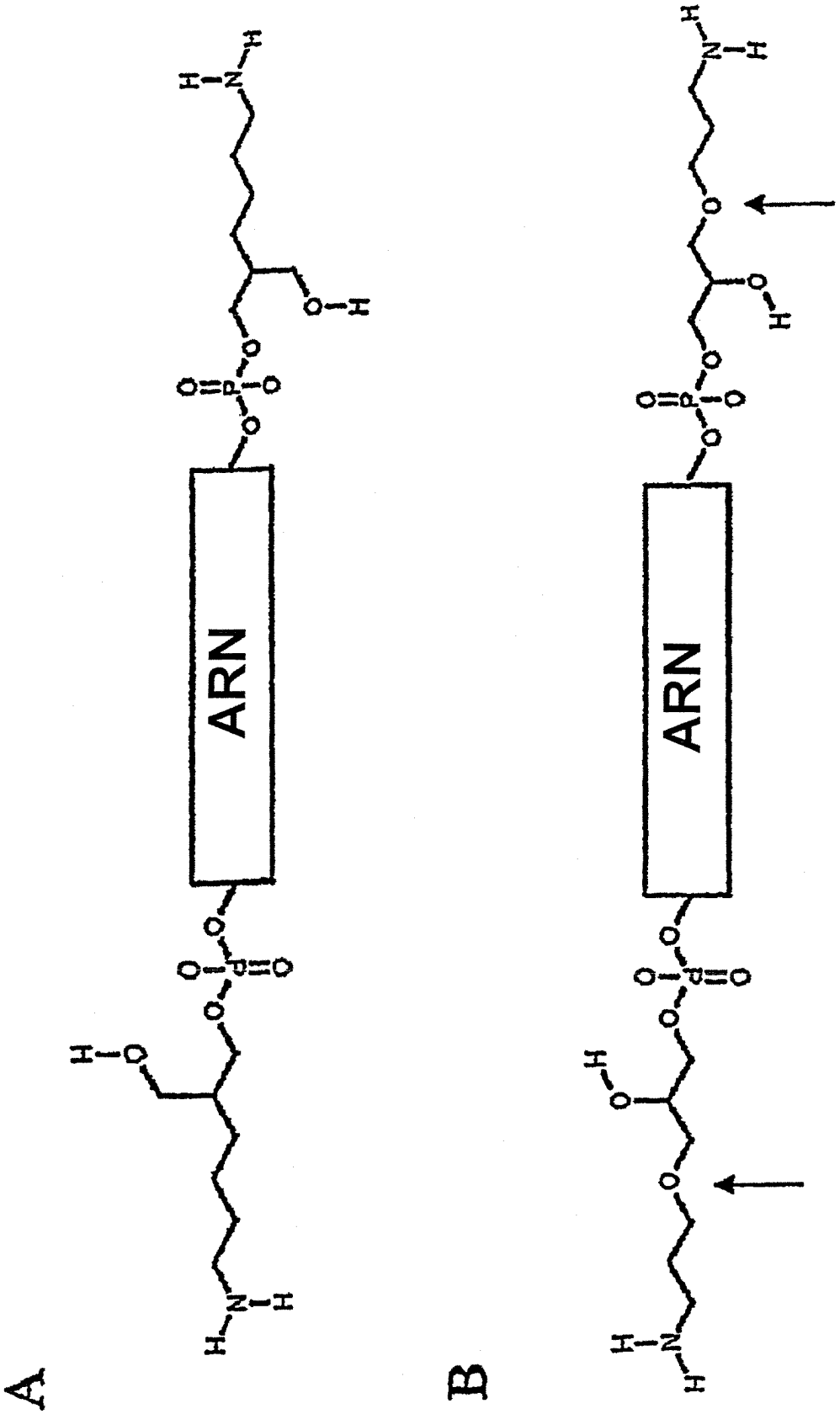


Fig. 19

LISTA DE SECUENCIAS

<110> atugen AG
<120> Otras formas nuevas de moléculas de ARN de interferencia
<130> A 19014 PCT
<160> 174
<170> PatentIn version 3.1
<210> 1
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 1A (Fig. 3B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN

<400> 1

cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 2
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 1B (Fig. 3B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN

<400> 2

cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210> 3
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 3A (Fig. 3B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN
<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> modificado con NH_2

<400> 3

cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 4
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 3B (Fig. 3B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN
<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> modificado con NH_2

<400> 4

cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210> 5
<211> 23
<212>ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 4A (Fig. 3B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN
<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> unido a abásico invertido

<400> 5

cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 6
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 4B (Fig. 3B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN
<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)

<223> unido a abásico invertido

<400> 6

cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210> 7
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_.feature
<223> SAMM (Fig. 3B)
<220>
<221> misc_.feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22).. (23)
<223> ADN

<400> 7

cucauuuucu uugugcucac gtt 23

<210> 8
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 5BMM (Fig. 3B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN

<400> 8

cgugagcaca aagaaaauga gtt 23

<210> 9

<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 18A (Fig.4B, 8B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN

<400> 9

cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 10
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 18B (Fig. 4B, 8B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN

<400> 10

cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210> 11
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>

<221> misc_feature
<223> 19A(MM) (Fig. 4B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN

<400> 11

cucauuuucu uugugcucac gtt 23

<210> 12
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 19B(MM) (Fig. 4B)
<220>
<221> misc_feature
<222>(1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN

<400> 12

cgugagcaca aagaaaauga gtt 23

<210> 13
<211> 21
<212> ADN.
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 28A (Fig. 4B, 8B, 9C, 10C)

<400> 13

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 14
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc._feature
<223> 28B (Fig. 4B, 8B, 9C, 10C)

<400> 14

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 15
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 29A(MM) (Fig. 4B)

<400> 15

cucauuuucu uugugcucac g 21

<210> 16
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 29B(MM) (Fig. 4B)

<400> 16

cgugagcaca aagaaaauga g 21

<210> 17
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 30A (Fig. 4B, 8B)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> ADN
<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(23)
<223> ARN

<400> 17

ttcuccuuuu guuucugcua acg 23

<210> 18
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 30B (Fig. 4B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> ADN
<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(23)
<223> ARN

<400> 18

ttcguuagca gaaacaaaag gag 23

<210> 19
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 31A(MM) (Fig. 4B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> ADN
<220>
<221> misc_feature

<222> (3)..(23)
<223> ARN

<400> 19

ttcucauuuu cuuugugcuc acg 23

<210> 20
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 31B(MM) (Fig.4B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1).. (2)
<223> ADN
<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(23)
<223> ARN

<400> 20

ttcgugagca caaagaaaau gag 23

<210> 21
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 51A (Fig. 5B)

<400> 21

ucuugaugua cuccccucgu u 21

<210> 22
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature

<223> 51B (Fig. 5B)

<400> 22

cgaggggagu acaucaagau u 21

<210>23
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 53A (Fig. 5B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> ADN

<400> 23

ucuugaugua cuccccucgu u 21

<210> 24
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 53B (Fig. 5B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> ADN

<400> 24

cgaggggagu acaucaagac c 21

<210> 25

<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 55A (Fig. 5A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(17)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(19)
<223> ADN

<400> 25

cuugauguac uccccucgu 19

<210> 26
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 55B (Fig. 5B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1).. (17)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(19)
<223> ADN

<400> 26

gaggggagua caucaagac 19

<210> 27
<211> 21
<212>ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>

<221> misc_feature
<223> 57A (Fig. 5B)
<220>
<221> misc_feature
<222>(1)..(19)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> ADN

<400> 27

ucuugaugua cuccccucgt t 21

<210> 28
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 57B (Fig. 5B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> ADN

<400> 28

cgaggggagu acaucaagac c 21

<210> 29
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 51A (Fig. 6B)

<400> 29

ucuugaugua cuccccucgu u 21

<210> 30
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 51B (Fig. 6B)

<400> 30

cgaggggagu acaucaagau u 21

<210> 31
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 70A (Fig. 6B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222>(20).. (21)
<223> ADN

<400> 31

ucuugaugua cuccccucgt t 21

<210> 32
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 70B (Fig. 6B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> ARN
<220>

<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> ADN

<400> 32

cgaggggagu acaucaagat t 21

<210> 33
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 71A (Fig. 6B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> ADN

<400> 33

acuugaugua cuccccucct t 21

<210> 34
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 71B (Fig. 6B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (20).. (21)
<223> ADN

<400> 34

ggaggggagu acaucaagut t 21

<210> 35
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 72A (Fig. 6B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> ADN

<400> 35

aguugaugua cuccccugct t 21

<210> 36
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 72B (Fig. 6B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> ADN

<400> 36

gcaggggagu acaucaacut t 21

<210> 37
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi

<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1 1A (Fig. 7A)

<400> 37

ucuugaugua cuccccucgu u 21

<210> 38
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1 1B (Fig. 7A)

<400> 38

cgaggggagu acaucaagau u 21

<210> 39
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1 2A (Fig. 7A)

<400> 39

ucuugaugua cuccccucgu u 21

<210> 40
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1 2B (Fig. 7A)

<400> 40

cgaggggagu acaucaagac c 21

<210> 41
<211> 21

<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1 3A (Fig. 7A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> ADN

<400> 41

ucuugaugua cuccccucgt t 21

<210> 42
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1 3B (Fig. 7A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1).. (19)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (20).. (21)
<223> ADN

<400> 42

cgaggggagu acaucaagac c 21

<210> 43
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature

<223> Akt1 4A (Fig. 7A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1).. (19)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (20).. (21)
<223> ADN

<400> 43

ucuugaugua cuccccucgt t 21

<210> 44
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1 4B (Fig. 7A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> ADN

<400> 44

cgaggggagu acaucaagat t 21

<210> 45
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1 5A (Fig. 7A)

<400> 45

cuugauguac uccccucgu 19

<210> 46

<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1 5B (Fig. 7A)

<400> 46

gaggggagua caucaagac 19

<210> 47
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1 6A (Fig. 7A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (20).. (21)
<223> ADN

<400> 47

acuugaugua cuccccucct t 21

<210> 48
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt 1 6B (Fig, 7A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature

<222> (20)..(21)
<223> ADN

<400> 48

ggaggggagu acaucaagut t 21

<210> 49
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1 7A (Fig. 7A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222>(20)..(21)
<223> ADN

<400> 49

aguugaugua cuccccugct t 21

<210> 50
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1 7B (Fig. 7A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> ADN

<400> 50

gcaggggagu acaucaacut t 21

<210> 51
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTEN 1A (Fig. 7A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN

<400> 51

cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 52
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTEN 1B (Fig. 7A)
<220>
<221> misc_.feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN

<400> 52

cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210> 53
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi

<220>
<221> misc_feature
<223> PTENA (Fig. 7B)

<400> 53

uccuuuguu ucugcuaac 19

<210> 54
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENB (Fig. 7B)

<400> 54

guuagcagaa acaaaagga 19

<210> 55
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENMM1 (Fig. 7B)

<400> 55

uccuuuucuu ucugcuaac 19

<210> 56
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENMM1 (secuencia complementaria, Fig. 7B)

<400> 56

guuagcagaa agaaaagga 19

<210> 57
<211> 19

<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENMM2 (Fig. 7B)

<400> 57

uccuuuucuu ugugcuaac 19

<210> 58
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221 > misc_feature
<223> PTENMM2 (secuencia complementaria, Fig. 7B)

<400> 58

guuagcacaa agaaaagga 19

<210> 59
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENMM3 (Fig. 7B)

<400> 59

uccuuuucuu ugugguaac 19

<210> 60
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENMM3 (secuencia complementaria, Fig. 7B)

<400> 60

guuaccacaa agaaaagga 19

<210> 61
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENMM4 (Fig. 7B)

<400> 61

uccuauucuu ugugguaac 19

<210> 62
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENMM4 (secuencia complementaria; Fig. 7B)

<400> 62

guuaccacaa agaauagga 19

<210> 63
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 24A (Fig. 8B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN

<400> 63

cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 64
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 24B (Fig. 8B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> unido a abásico invertido
<220>
<221> misc_feature
<222> (1).. (21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN
<220>
<221> misc_feature
<222> (23).. (23)
<223> unido a abásico invertido

<400> 64

cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210> 65
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 26A (Fig. 8B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1).. (1)
<223> modificado con NH_2
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)

<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN
<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> modificado con NH_2

<400> 65

cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 66
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 26B (Fig. 8B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Modificado con NH_2
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN
<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> Modificado con NH_2

<400> 66

cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210> 67
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi

<220>
<221> misc_feature
<223> 79A (Fig. 8B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN modificado con 2'-O-metilo
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN

<400> 67

cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 68
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 79B (Fig. 8B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN modificado con 2'-O-metilo
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN

<400> 68

cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210 > 69
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 30B (Fig. 8B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)

<223> ADN
<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(23)
<223> ARN

<400> 69

ttcguuagca gaaacaaaag gag 23

<210> 70
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 3A (Fig. 8B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN
<220>
<221> misc feature
<222> (23)..(23)
<223> Modificado con NH_2

<400> 70

cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 71
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 3B (Fig. 8B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>

<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN
<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> Modificado con NH_2

<400> 71

cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210> 72
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 26A (Fig. 9B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Modificado con NH_2
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN
<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> Modificado con NH_2

<400> 72

cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 73
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature

<223> 24A (Fig. 9B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> unido a abásico invertido
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN
<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> unido a abásico invertido

<400> 73

cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 74
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 22A (Fig. 9B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN
<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> unido a abásico invertido

<400> 74

cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 75
<211> 23

<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 20A (Fig. 9B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN
<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> Modificado con NH_2

<400> 75

cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 76
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 30A (Fig. 9B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> ADN
<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(23)
<223> ARN

<400> 76

ttcuccuuuu guuucugcua acg 23

<210> 77
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 26B (Fig. 9B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Modificado con NH_2
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN
<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> Modificado con NH_2

<400> 77

cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210> 78
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 18A (Fig. 9B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN

<400> 78

cuccuuuugu uucugcuaac gtt 23

<210> 79
<211> 23

<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 18B (Fig. 9B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(23)
<223> ADN

<400> 79

cguuagcaga aacaaaagga gtt 23

<210> 80
<222> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 28A (Fig. 9B)

<400> 80

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 81
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 29A (Fig. 10C)

<400> 81

cuccuuuucu uugugcuaac g 21

<210> 82
<211> 21
<212> ARN

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 29B (Fig. 10C)

<400> 82

cguuagcaca aacaaaagga g 21

<210> 83
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 73A (Fig. 10C)
<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(19)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 83

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 84
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 73B (Fig. 10C)
<220>
<221> misc_feature
<222> (3).. (19)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 84

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 85
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 74A (Fig. 10C)
<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(17)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 85

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 86
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 74B (Fig. 10C)
<220>
<221> misc_feature
<222> (5).. (17)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 86

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 87
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 75A (Fig. 10C)
<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(15)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 87

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 88

<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 75B (Fig. 10C)
<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(15)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 88

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 89
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223>79A (Fig. 10C)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 89

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 90
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 79B (Fig. 10C, 11C)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 90

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 91
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 80A (Fig. 11C)

<400> 91

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 92
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 80B (Fig. 11C)

<400> 92

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 93
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 81A (Fig. 11C)
<220>
<221> misc_feature
<222>(1)..(11)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 93

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 94
<211> 21

<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 81B (Fig. 11C)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(11)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 94

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 95
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 82A (Fig. 11C)
<220>
<221> misc_feature
<222>(11)..(21)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 95

cuccuuuugu uucugcuaac g 1

<210> 96
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 82B (Fig. 11C)
<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(21)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 96

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 97
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 83A (Fig. 11C)
<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(13)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 97

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 98
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 86A (Fig. 11C)
<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(10)
<223> modificado con 2'-O-metilo
<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(21)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 98

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 99
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 86B (Fig. 11C)
<220>

<221> misc_feature
<222> (7)..(11)
<223> modificado con 2'-O-metilo
<220>
<221> misc_feature
<222> (17).. (21)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 99

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 100
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 75A (Fig. 11C)
<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(15)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 100

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 101
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 28A (Fig. 12B)

<400> 101

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 102
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>

<221> misc_feature
<223> 28B (Fig. 12B)

<400> 102

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 103
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 79A (Fig. 12B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 103

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 104
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 79B (Fig. 12B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 104

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 105
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature

<223> 81A (Fig. 12B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(11)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 105

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 106
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 81B (Fig. 12B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1).. (11)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 106

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 107
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 82A (Fig. 12B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(21)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 107

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 108
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>

<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 82B (Fig. 12B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(21)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 108

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 109
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 86A (Fig. 12B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (5).. (10)
<223> modificado con 2'-O-metilo
<220>
<221> misc_feature
<222> (16).. (21)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 109

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 110
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 86B (Fig. 12B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(11)
<223> modificado con 2'-O-metilo
<220>
<221 > misc_feature

<222> (18)..(21)
<223> modificado con 2'-O-metilo

<400> 110

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 111
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 94A1 (Fig. 12B)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 2,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 son 2'-O metil-ribonucleótidos

<400> 111

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 112
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 94B1 (Fig. 12B)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 112

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 113
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 94A1 (Fig. 12B)
<220>

<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 113

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 114
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 94B2 (Fig. 12B)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 114

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 115
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 94A2 (Fig. 12B)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 115

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 116
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 94B1 (Fig. 12B)
<220>

<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 116

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 117
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 94A2 (Fig. 12B)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 117

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 118
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> 94B2 (Fig. 12B)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 118

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 119
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENA (Fig. 15A,B)

<400> 119

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 120
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENB (Fig. 15A, B)

<400> 120

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 121
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENAMM (Fig. 15A)

<400> 121

cucauuuucu uugugcucac g 21

<210> 122
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENBMM (Fig. 15A)

<400> 122

cgugagcaca aagaaaauga g 21

<210> 123
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi

<220>
<221> misc_feature
<223> PTENA V1 (Fig. 15A, B)
<220>
<221> misc_feature
<223> 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 123

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 124
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENB V1 (Fig. 15A, B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 124

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 125
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENA V2 (Fig. 15A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (3).. (19)
<223> 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 125

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 126
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENB V2 (Fig. 15A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(19)
<223> 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 126

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 127
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENA V3 (Fig. 15A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (5).. (17)
<223> 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 127

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 128
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENB V3 (Fig. 15A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(17)
<223> 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 128

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 129

<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENA V4 (Fig. 15A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(15)
<223> 2'-O metil-ribonucleótidos

<400> 129

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 130
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENB V4 (Fig. 15A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(15)
<223> 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 130

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 131
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENA V5 (Fig. 15A)

<400> 131

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 132
<211> 21

<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENB V5 (Fig. 15A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 132

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 133
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENA V6 (Fig. 15A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 133

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 134
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENB V6 (Fig. 15A)

<400> 134

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 135
<211> 21
<212> ARN

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENA V7 (Fig. 15A, B)
<220>
<221> misc_feature
<223> 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 135

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 136
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENB V7 (Fig. 15A, B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(11)
<223> 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 136

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 137
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENA V8 (Fig. 15A, B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(21)
<223> 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 137

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 138

<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENB V8 (Fig. 15A, B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(21)
<223> 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 138

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 139
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENA V9 (Fig. 15A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(13)
<223> 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 139

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 140
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feafure
<223> PTENB V9 (Fig. 15A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 140

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 141
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENA V10 (Fig. 15A, B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(10)
<223> 2'-O-metil-ribonucleótidos
<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(21)
<223> 2'-O metil-ribonucleótidos

<400> 141

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 142
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENB V10 (Fig. 15A, B)
<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(12)
<223> 2'-O-metil-ribonucleótidos
<220>
<221> misc_feature
<222> (17).. (21)
<223> 2'-O metil-ribonucleótidos

<400> 142

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 143
<211> 21
<212> ARN

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENA V11 (Fig. 15A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(15)
<223> 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 143

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 144
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENB V11 (Fig. 15A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> PTENBV11 (Fig. 15)

<400> 144

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 145
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENA V12 (Fig. 15A, B)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 145

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 146

<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENB V12 (Fig. 15A, B)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 146

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 147
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENA V13 (Fig. 15B)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 147

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 148
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENB V13 (Fig. 15B)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 148

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 149

<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENA V14 (Fig. 15B)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 149

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 150
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENB V14 (Fig. 15B)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21 son 2'-O metil-ribonucleótidos

<400> 150

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 151
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENA V15 (Fig. 15B)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21 son 2'-O metil-ribonucleótidos

<400> 151

cuccuuuugu uucugcuaac g 21

<210> 152

<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> PTENB V15 (Fig. 15B)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 son 2'-O metil-ribonucleótidos

<400> 152

cguuagcaga aacaaaagga g 21

<210> 153
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1A V1 (Fig. 16A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> ADN

<400> 153

ucuugaugua cuccccucgt t 21

<210> 154
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1B V1 (Fig. 16A)
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)

<223> ARN
<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> ADN

<400> 154

cgaggggagu acaucaagat t 21

<210> 155
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1A V2 (Fig. 16A)

<400> 155

ucuugaugua cuccccucg 19

<210> 156
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1B V2 (Fig. 16A)

<400> 156

cgaggggagu acaucaaga 19

<210> 157
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1A V3 (Fig. 16A)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 son 2'-O metil-ribonucleótidos

<400> 157

ucuugaugua cuccccucg 19

<210> 158
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1B V3 (Fig. 16A)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 son 2'-O metil-ribonucleótidos

<400> 158

cgaggggagu acaucaaga 19

<210> 159
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> AKt1A V4 (Fig. 16A)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 159

ucuugaugua cuccccucg 19

<210> 160
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1B V4 (Fig. 16A)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 160

cgaggggagu acaucaaga 19

<210> 161
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1A V5 (Fig. 16A)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 161

ucuugaugua cuccccucg 19

<210> 162
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1B V5 (Fig. 16A)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 162

cgaggggagu acaucaaga 19

<210> 163
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1A V6 (Fig. 16A)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 163

ucuugaugua cuccccucg 19

<210> 164
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> Akt1B V6 (Fig. 16A)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 164

cgaggggagu acaucaaga 19

<210> 165
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> P110b V2 (Fig. 16C)

<400> 165

aauuccagug guucauucc 19

<210> 166
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> P110b V2 (secuencia complementaria, Fig. 16C)

<400> 166

ggaaugaacc acuggaauu 19

<210> 167
<211> 19
<212> ARN

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> P110b V3 (Fig. 16C)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 2, 4, 6, 8,10, 12, 14, 16 y 18 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 167

aauuccagug guucauucc 19

<210> 168
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> P110b V3 (secuencia complementaria, Fig. 16C)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 168

ggaaugaacc acuggaauu 19

<210> 169
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> P110b V4 (Fig. 16C)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 169

aauuccagug guucauucc 19

<210> 170
<211> 19
<212> ARN

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> P110b V4 (secuencia complementaria, Fig. 16C)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 18 y 21 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 170

ggaaugaacc acuggaauu 19

<210> 171
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> P110b V5 (Fig. 16C)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15,17 y 19 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 171

aauuccagug guucauucc 19

<210> 172
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> P110b V5 (secuencia complementaria, Fig. 16C)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 172

ggaaugaacc acuggaauu 19

<210> 173
<211> 19
<212> ARN

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> P110b V6 (Fig. 16C)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 173

aauuccagug guucauucc 19

<210> 174
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> ARNi
<220>
<221> misc_feature
<223> P110b V6 (secuencia complementaria, Fig. 16C)
<220>
<221> misc_feature
<223> los nucleótidos en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 son 2'-O-metil-ribonucleótidos

<400> 174

ggaaugaacc acuggaauu 19