(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 332 178**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/11 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04722233 .6**
(96) Fecha de presentación : **22.03.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1606406**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **21.12.2005**

(54) Título: **Análogos de RNA pequeños de interferencia (siRNA).**

(30) Prioridad: **21.03.2003 DK 2003 00442**
21.03.2003 US 456888 P
31.10.2003 DK 2003 01625
30.01.2004 DK 2004 00145

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.01.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.01.2010

(73) Titular/es: **Santaris Pharma A/S**
Kogle Alle 6
2970 Hørsholm, DK

(72) Inventor/es: **Elmén, Joacim;**
Wahlestedt, Claes;
Liang, Zicai;
Sørensen, Anders, Malling;
Ørum, Henrik y
Koch, Troels

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Análogos de RNA pequeños de interferencia (siRNA).

Campo de la invención

La presente invención se refiere a análogos pequeños de interferencia (siRNA) bicatenarios novedosos que comprenden monómeros de ácidos nucleicos cerrados (LNA). Dichos compuestos inducen la silenciación génica postranscripcional específica de secuencia en muchos organismos mediante un procedimiento conocido como interferencia de RNA (RNAi). Los compuestos descritos en el presente documento tienen propiedades mejoradas con respecto a los siRNA no modificados y pueden, en consecuencia, resultar útiles como agentes terapéuticos, por ejemplo, en el tratamiento de diversas formas de cáncer.

Antecedentes de la invención

Fire *et al*. descubrieron la interferencia de RNA (RNAi) en *C. Elegans* (Nature, 1998, 391, 806-811). Se encontró que largos tramos de RNA bicatenario (dsRNA) poseían un potente poder inactivador en la expresión génica que podía mantenerse durante generaciones en el gusano. La interferencia de RNA (RNAi) rápidamente se convirtió en una herramienta genómica funcional en *C. Elegans* (los inicios de la interferencia de RNA son revisados por Fire (TIG, 1999, 15, 358-363) y Bosher y Labouesse (Nature Cell Biology, 2000, 2, E31-E36)). Los primeros estudios en los que se demostró que la interferencia de RNA funcionaba en los vertebrados se realizaron en embriones de *Danio rerio* y en oocitos de ratón (Wargelius *et al*., Biochem. Biophys. Res. Com. 1999, 263, 156-161, Wianny y Zernicka-Goetz, Nature Cell Biology, 2000, 2, 70-75). Dado que el dsRNA induce efectos no específicos en las células de mamífero, se ha planteado la hipótesis de que estos mecanismos no estaban completamente desarrollados en el sistema embrionario murino (Alexopoulou *et al*., Nature, 2001, 413, 732-738, Reviews: Stark *et al*., Annu. Rev. Biochem., 1998, 67, 227-264 y Samuel, Clin. Micro. Rev., 2001, 14, 778-809).

En lo que respecta a *C. Elegans* y *Drosophila*, se ha demostrado que las hebras largas de RNAi se degradan a hebras bicatenarias cortas (21-23 nucleótidos) y que estas formas degradadas actúan de mediadoras de la interferencia (Zamore *et al*., Cell, 2000, 101, 25-33 y Elbashir *et al*., Gen. Dev., 2001, 15, 188-200). Elbashir *et al*. (Gen. Dev., 2001, 15, 188-200) demostraron que la escisión es igual en una diana codificante o no codificante y que ambas hebras del siRNA pueden guiar la escisión contra el RNA no codificante o codificante, respectivamente. Elbashir *et al*. mostraron de forma concluyente (Nature, 2001, 411, 494-498) que los siRNA actúan de mediadores de una inactivación potente en una variedad de líneas celulares de mamífero y probablemente eludían los efectos no específicos adversos de los dsRNA largos en las células de mamífero. Este descubrimiento supuso un hito en la biología moderna y la aplicación de los siRNA como agentes terapéuticos se convirtió rápidamente en un campo atractivo de investigación (revisado por McManus y Sharp, Nature Reviews Genetics, 2002, 3, 737-747 y Thompson, DDT, 2002, 7, 912-917).

Los dsRNA son bastante estables en medios biológicos. Sin embargo, en el momento en el que el dúplex se disocia formando las hebras individuales, estas, al ser de RNA, son degradadas inmediatamente. Una de las estrategias para conferir mayor estabilidad al siRNA ha sido introducir restos de RNA químicamente modificados en las hebras individuales del siRNA. Es bien sabido que los análogos de RNA sintéticos son mucho más estables en medios biológicos, y también se induce una mayor estabilidad en los restos de RNA naturales próximos. Por mayor estabilidad lo que se quiere decir principalmente es una mayor resistencia a las nucleasas pero también con dichas modificaciones se puede conferir una mejor captación celular y distribución tisular. Se han descrito diversos análogos de siRNA:

Pre-siRNA (Parrish *et al*. Mol. Cell, 2000, 6, 1077-1087) muestran tolerancia a ciertas modificaciones en el esqueleto para la RNAi en *C. elegans*. Mediante la transcripción *in vitro* de las dos hebras diferentes en presencia de nucleótidos modificados, fue posible demostrar que los fosforotioatos se toleran tanto en la hebra codificante como no codificante al igual que 2'-fluorouracilo en lugar de uracilo. 2'-Aminouracilo y 2'-aminocitidina reducen la actividad de RNAi cuando se incorporan a la hebra codificante y la actividad se pierde completamente cuando se incorporan a la hebra no codificante. Al cambiar uracilo a 2'-desoxitimidina en la hebra codificante, también se reduce el efecto, e incluso más cuando el cambio es en la hebra no codificante. Si una o ambas hebras están formadas completamente por monómeros de DNA, la actividad de RNAi se pierde totalmente. En el estudio mencionado anteriormente, también se investigaron modificaciones en las bases; se encontró que 4-tiouracilo y 5-bromouracilo se toleran en ambas hebras, mientras que 5-yodouracilo y 5-(3-aminoalil)uracilo reducen el efecto en la hebra codificante e incluso más en la hebra no codificante. Al sustituir la guanosina por inosina, se reduce mucho la actividad, independientemente de si la modificación se realiza en la hebra codificante o en la no codificante.

Sin embargo, las protuberancias de UU en 3' pueden intercambiarse por protuberancias de 2'desoxitimidina en 3' y son bien toleradas (Elbashir *et al*., Nature, 2001, 411, 494-498 y Boutla *et al*., Curr. Biol., 2001, 11, 1776-1780).

También se ha demostrado que pueden incorporarse monómeros de DNA en la hebra codificante sin poner en peligro la actividad.

Elbashir *et al*., (EMBO, 2001, 20, 6877-6888) demostraron que los siRNA modificados que contenían cuatro desoxinucleótidos en cada extremo 3' del siRNA mantenían toda la actividad. Además, se encontró que la actividad se eliminaba si el siRNA contenía sólo un emparejamiento de bases incorrecto en "mitad" de la molécula.

Sin embargo, también se reseñó que pueden tolerarse 1-2 emparejamientos incorrectos siempre que los emparejamientos incorrectos se introduzcan en la hebra codificante (Holen *et al*., NAR, 2002, 30, 1757-1766; Hohjoh, FEBS Lett., 2002, 26179, 1-5; Hamada *et al*., Antisense and Nucl. Acid Drug Dev., 2002, 12, 301-309; y Boutla *et al*., Curr. Biol., 2001, 11, 1776-1780)).

Nyk5nen *et al*. (Cell, 2001, 107, 309-321) demostraron la necesidad de ATP para producir siRNA de RNAi, pero también en las posteriores etapas para desarrollar la actividad de los siRNA. El ATP es necesario para desenrollar y mantener un 5'-fosfato para el reconocimiento por RISC. El 5'-fosfato es necesario para la actividad de siRNA. Martínez *et al*. (Cell, 2002, 110, 563-574) demostraron que una única hebra puede reconstituir el complejo silenciador inducido por RNA (RISC, Hammond *et al*., Nature, 2000, 404, 293-296) y que una única hebra no codificante tiene actividad especialmente cuando está 5'-fosforilada. La modificación en 5' de la hebra no codificante, inhibe la actividad aunque puede modificarse tanto el extremo 3' como el extremo 5' de la hebra codificante.

Amarzguioui *et al*. (NAR, 2003, 31, 589-595) confirmaron los hallazgos mencionados anteriormente, y se concluyó que se toleraba un emparejamiento incorrecto siempre que no estuviera demasiado cerca del extremo 5' de la hebra no codificante. Un emparejamiento incorrecto a 3-5 nucleótidos del extremo 5' de la hebra no codificante disminuye la actividad de forma notable. Sin embargo, se demostró que se toleran dos emparejamientos incorrectos si están en "medio" o hacia el extremo 3' de la hebra no codificante, aunque con una actividad ligeramente menor.

Se han introducido modificaciones, como por ejemplo fosforotioatos y 2'-O-metil RNA, en los extremos de siRNA (Amarzguioui *et al*., NAR, 2003, 31, 589-595) y se toleraban bien. La 2'-O-alilación reduce el efecto cuando está presente en el extremo 5' de la hebra no codificante.

El análogo nucleosídico bicíclico ENA (2'-0,4'-C-etilentimidina (ENA timidina, eT) también ha sido incorporado al siRNA (Hamada *et al*., Antisense and Nucl. Acid Drug Dev., 2002, 12, 301-309). Se demostró que dos ENA timidinas en el extremo 5' de la hebra codificante deterioraban el efecto. Hamada *et al*. (2002) concluyeron que: "al usar 2'-O,4'-C-etilen timidina, que es un componente de los ácidos nucleicos con puentes de etileno (ENA), se elimina completamente la RNAi".

Más recientemente, Braasch *et al*. (Biochemistry 2003, 42, 7967-7975) describieron un número de siRNA que contenían monómeros de LNA incorporados.

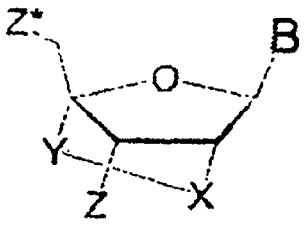
En conclusión, se ha demostrado que la hebra no codificante es más sensible a las modificaciones que la hebra codificante. Sin limitarse a ninguna teoría específica, se cree que estos fenómenos, al menos en parte, se basan en el hecho de que la estructura del dúplex hebra no codificante y diana tiene que ser RNA natural de forma A. La hebra codificante de siRNA puede considerarse un "vehículo" para la administración de la hebra no codificante a la diana y la hebra codificante no participa en la degradación del RNA catalizada por enzimas. Así, al contrario que con la hebra no codificante, las modificaciones en la hebra codificante son toleradas dentro de un cierto margen, aunque las modificaciones inducen cambios en la estructura de forma A del siRNA. Si se introducen cambios en la hebra no codificante tienen que ser estructuralmente equilibrados dentro del marco de reconocimiento del complejo silenciador inducido por RNA (RISC) natural.

Evidentemente, existe una necesidad en el campo de novedosos y análogos de siRNA mejorados que posean potentes propiedades *in vivo*, una mayor bioestabilidad (que corresponda a un mayor T_f), una mayor resistencia a nucleasas, captación celular mejorada y/o distribución tisular mejorada con respecto a los compuestos de siRNA que están disponibles actualmente.

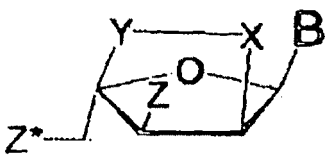
Así, el objeto de la presente invención es proporcionar análogos de siRNA mejorados que tenga una o más de las propiedades mejoradas mencionadas anteriormente. La presente invención así proporciona análogos de siRNA mejoradas que, entre otros, muestren un elevado grado de bioestabilidad y/o estabilidad a las nucleasas y que de forma eficaz se dirija contra RNA, como por ejemplo mRNA o pre-mRNA, o contra una variedad de RNA estructurales como por ejemplo tRNA, snRNA, scRNA, rRNA o incluso RNA reguladores como microRNA.

Breve descripción de la invención

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto bicatenario que comprende una hebra codificante y una hebra no codificante, en el que cada hebra comprende 12-35 nucleótidos y en el que dicho compuesto comprende al menos un monómero de ácido nucleico cerrado (LNA), que tiene la estructura



o



en las que

X se selecciona a partir del grupo constituido por O, S y NR^H, donde R^H es H o alquilo C_{1-4};

Y es CH_2;

B es una nucleobase;

Z y Z^a están independientemente ausentes o se seleccionan a partir del grupo constituido por un grupo de enlace internucleosídico, un grupo terminal y un grupo protector; de forma que cuando el monómero de LNA está localizado en el extremo 3', Z es un grupo terminal y Z* es un grupo de enlace internucleosídico; cuando el monómero de LNA está localizado en el extremo 5', Z está ausente y Z* es un grupo terminal; y cuando el monómero de LNA está localizado dentro de la secuencia de nucleótidos, Z está ausente y Z* es un grupo de enlace internucleosídico, y

en la que ningún monómero de LNA está localizado en el extremo 5' de la hebra no codificante.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la invención y un diluyente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un compuesto de acuerdo con la invención para usar como medicamento.

Todavía en otro aspecto más, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer o de síndrome respiratorio agudo grave (SARS).

Otros aspectos de la presente invención serán obvios a partir de la descripción siguiente y de las reivindicaciones anexas.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra las dos conformaciones de la furanosa (tipo S y tipo N).

La Fig. 2 muestra la estabilidad mejorada de siLNA comparada con siRNA en fluidos biológicos. GL3+/- se degrada rápidamente mientras que siLNA ligeramente modificado (n.º 2185/2186) y siLNA con mayores modificaciones (n.º 2703-01/2186) muestran una estabilidad notablemente mejorada. El estudio de estabilidad se realizó en suero bovino fetal al 10% en solución salina fisiológica a 37ºC.

La Fig. 3 muestra la regulación por disminución del gen NPY endógeno en células PC12 por los siLNA. Los compuestos analizados eran (de izquierda a derecha): 2ª barra: siRNA sin relación; 3ª barra: NPY+/1, 4ª barra: 2796/NPY-; 5ª barra: 2795/NPY+; 6ª barra: NPY+/2797; 7ª barra: 2796/2797.

La Fig. 4 muestra el efecto de siLNA dirigido contra luciferasa de luciérnaga y la modulación de la expresión. Las líneas de la izquierda representan la hebra codificante y las líneas de la derecha representan la hebra no codificante del siLNA. Las marcas de las líneas individuales representan la posición de los monómeros de LNA. Las dos últimas líneas de la derecha representan el siRNA de control. La primera barra (de la izquierda) representa la expresión del testigo de luciferasa, sin modular y completo con la que se normalizan todas las muestras. Los compuestos analizados eran (de izquierda a derecha): 2ª barra: GL3+/- ; 3ª barra: GL3+/2186; 4ª barra: GL3+/2187; 5ª barra: 2184/GL3-; 6ª barra: 2184/2186; 7ª barra: 2184/2187; 8ª barra: 2185/GL3-; 9ª barra: 2185/2186; 10ª barra: 2185/2187; 11ª barra: 2703-1/GL3-; 12ª barra: 2703-1/2186; 13ª barra: GL3+/2189; 14ª barra: siRNA sin relación.

La Fig. 5 muestra el efecto de siLNA dirigido contra luciferasa de Renilla y la modulación de la expresión. Las líneas de la izquierda representan la hebra codificante y las líneas de la derecha representan la hebra no codificante del siLNA. Las marcas de las líneas individuales representan la posición de los monómeros de LNA. La primera barra representa la expresión del testigo de luciferasa, sin modular y completo con la que se normalizan todas las muestras. Los compuestos analizados eran (de izquierda a derecha): 2ª barra: RL+/-; 3ª barra: RL+/2699-1; 4ª barra: 2700-1/2699-1; 5ª barra: 2702-1/2699-1; 6ª barra: RL+/2701-1; 7ª barra: 2700-1/2701-1; 8ª barra: 2702-1/2701-1.

La Fig. 6 muestra la estabilidad en suero de rata de oligos monocatenarios que contienen monómeros de LNA y RNA, RNA bicatenario (ds) y RNA monocatenario (ss). Los dsRNA y ssRNA fueron degradados inmediatamente, mientras que los oligos monocatenarios intactos que contenían monómeros de LNA y RNA podían detectarse después de 20-40 minutos. Los oligos analizados fueron 2189 y los ssRNA (GL3-) y dsRNA (GL3+/1) correspondientes.

La Fig. 7 muestra compuestos de siLNA y siRNA dirigidos contra SARS. Mayúsculas: monómero de beta-D-oxi-LNA. Minúsculas: monómero de RNA.

La Fig. 8 muestra el efecto citopático (CPE) en células vero infectadas con SARS y el menor CPE después del tratamiento con siRNA. Se muestra el siRNA SARS 1. El simulado se trata con el agente de transfección Lipofectamine 2000 solo. También se muestran células no infectadas.

La Fig. 9 muestra la inhibición de la citotoxicidad inducida por SARS mediante siRNA y siLNA. Los compuestos analizados eran: SARS 1: 2842-1/2843-1; SARS 2: 2872-1/2845-1; SARS 3: 2846-1/2847-1; SARS 4: 2848-1/2849-1 así como los siRNA no modificados correspondientes. No pudieron detectarse diferencias en el tratamiento con siLNA y siRNA para el sitio más eficaz, SARS 1. El sitio de eficacia media, SARS 3, fue mejorado mediante siLNA para que fuera tan eficaz como el sitio SARS 1. Los dos sitios que no mostraron ninguna eficacia de siRNA, SARS 2 y SARS 4, tampoco mostraron ningún efecto mediante el tratamiento con siLNA. El efecto inhibidor se reduce con dosis víricas elevadas (60.000 $DICT_{50}$). Los controles fueron siRNA y siLNA contra luciferasa (Luc) y neuropéptido Y (NPY). No se observaron efectos adversos con los controles de siLNA. La citotoxicidad se midió en términos de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) a las 50 horas de la infección. Las diferentes gráficas representan diferentes dosis víricas (dosis infecciosa de cultivo tisular 50, $DICT_{50}$).

La Fig. 10 muestra el mecanismo propuesto de RISC que se carga donde la helicasa está desenrollando el dúplex de siRNA en el extremo con una unión más débil.

La Fig. 11 muestra el efecto de emparejamientos incorrectos de un único par de bases incorporados en la otra punta del extremo 5' de la hebra no codificante. Las líneas son RNA, los círculos indican monómeros de LNA y las cruces ilustran las incorporaciones de emparejamientos incorrectos. Los compuestos analizados eran (de izquierda a derecha): luciferasa de Renilla: 2ª barra: RL+/-; 3ª barra: RL+/2701-1; 4ª barra: RL+(pos. 19A→C)/2701-1; 5ª barra: RL+(pos. 19A→C)/-; luciferasa de luciérnaga: 2ª barra: GL3+/-; 3ª barra: GL3+/2187; 4ª barra: GL3+(pos. 19A→C)/2187; 5ª barra: GL3+(pos. 19A→C)/-.

La Fig. 12 muestra el efecto de la posición del monómero de LNA en la hebra no codificante. Las líneas son RNA, los círculos indican monómeros de LNA. Los compuestos analizados eran (de izquierda a derecha): 2ª barra: GL3+/-; 3ª barra: GL3+/2187; 4ª barra: GL3+/2789; 5ª barra: GL3+/2790; 6ª barra: GL3+/2792: 7ª barra: GL3+/2793; 8ª barra: GL3+/2794; 9ª barra: GL3+/2864; 10ª barra: GL3+/2865; 11ª barra: GL3+/2866; 12ª barra: GL3+/2867.

La Fig. 13 muestra la mejora por siLNA de los sitios diana de eficacia media. El simulado representa sin oligo. Ren1 es el sitio diana óptimo para siRNA; y Ren2 y Ren3 son sitios menos potentes. Las líneas son RNA y los círculos indican monómeros de LNA. Los compuestos analizados eran: Ren1: RL+/-; Ren2: 2863/hebra no codificante no modificada correspondiente; Ren3: 2826/hebra no codificante no modificada correspondiente, así como los siRNA no modificados correspondientes.

La Fig. 14 muestra el efecto de silenciación génica dependiente de la concentración de siLNA y siRNA.

La Fig. 15 muestra diseños mejorados de siRNA modificados mediante incorporación de monómeros de DNA y LNA.

La Fig. 16 muestra la menor eficacia de siLNA usando un monómero de LNA con una nucleobase voluminosa (T en lugar de U) en la posición de escisión 10 en la hebra no codificante. Los compuestos analizados eran: siRNA: GL3+/-; siLNA10T: GL3+/2865; siLNA10U: GL3+/2865-U.

La Fig. 17 muestra la inhibición de la diana codificante/no codificante de SARS en 3'-UTR de luciferasa de luciérnaga.

La Fig. 18 muestra el efecto antitumoral *in vivo* de dos siLNA contra EGFP (3029/3031 y 3030/3031) sobre el xenoinjerto de 15PC3-EGFP en ratones NMRI.

La Fig. 19 muestra el volumen del tumor de ratones con xenoinjerto de 15PC3-EGFP tratados con siLNA y solución salina usando minibombas Alzet 1007D. Los tumores se implantaron en día 0. El tratamiento se inició el día 7 y finalizó el día 12. Como puede observarse, los ratones tratados con siLNA presentaban un tamaño tumoral correspondiente al de los ratones de control.

La Fig. 20 muestra que los dúplex de siLNA están intactos después de 7 días en las minibombas Alzet 1007D.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

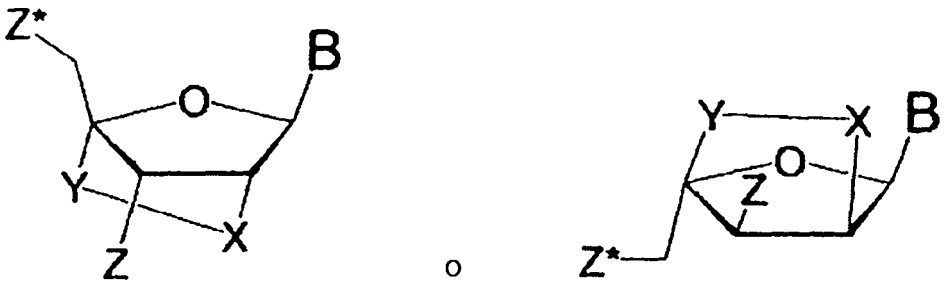
En el presente contexto el término "nucleótido" quiere decir una unidad de 2-desoxirribosa (DNA) o una unidad de ribosa (RNA) que está unida a través de su carbono número uno a una base nitrogenada, como por ejemplo adenina (A), citosina (C), timina (T), guanina (G) o uracilo (U), y que está unida a través de su átomo de carbono número cinco a un grupo de enlace internucleosídico (tal como se define a continuación) o a grupos terminales (tal como se define a continuación). Por consiguiente, cuando se usa en el presente documento, el término "nucleótido" engloba unidades de RNA (o monómeros) que comprenden una unidad de ribosa que está unida a través de su carbono número uno a

una base nitrogenada, como por ejemplo A, C, T, G o U, y que está unida a través de su átomo de carbono número cinco a un grupo fosfato o a un grupo terminal. De forma análoga, el término "nucleótido" también engloba unidades de DNA (o monómeros) que comprenden una unidad de 2-desoxirribosa que está unida a través de su carbono número uno a una base nitrogenada, como por ejemplo A, C, T, G o U, y que está unida a través de su átomo de carbono número cinco a un grupo fosfato o a un grupo terminal. El término "nucleótido" también cubre variantes o análogos de dichos monómeros de RNA y DNA. Más adelante se ofrece una descripción detallada de dichas variantes o análogos de monómeros de RNA y DNA.

En el presente contexto el término "nucleósido" quiere decir una unidad de 2-desoxirribosa (DNA) o una unidad de ribosa (RNA) que está unida a través de su carbono número uno a una base nitrogenada, como por ejemplo adenina (A), citosina (C), timina (T), guanina (G) o uracilo (U). Por consiguiente, cuando se usa en el presente documento, el término "nucleósido" engloba unidades de RNA (o monómeros) que comprenden una unidad de ribosa que está unida a través de su carbono número uno a una base nitrogenada, como por ejemplo A, C, T, G o U. De forma análoga, el término "nucleósido" también engloba unidades de DNA (o monómeros) que comprenden una unidad de 2-desoxirribosa que está unida a través de su carbono número uno a una base nitrogenada, como por ejemplo A, C, T, G o U. El término "nucleósido" también cubre variantes o análogos de dichos monómeros de RNA y DNA. Se entenderá que los nucleósidos individuales está unidos mediante un grupo de enlace internucleosídico.

Cuando se usa en el presente contexto, los términos "monómero de ácido nucleico cerrado", "resto de ácido nucleico cerrado", "monómero de LNA" o "resto de LNA" se refieren a un análogo nucleotídico bicíclico. Los monómeros de LNA se describen, entre otros, en los documento WO 99/14226, WO 00/56746, WO 00/56748, WO 01/25248, WO 02/28875, WO 03/006475 y WO 03/095467. El monómero de LNA también puede definirse con respecto a su fórmula química. Así, un "monómero de LNA" tal como se usa en el presente documento tiene la estructura química que se muestra en el Esquema 2 siguiente:

Esquema 2



2A 2B

en las que

X se selecciona a partir del grupo constituido por O, S y NR^H, donde R^H es H o alquilo, como por ejemplo alquilo C_{1-4};

Y es $(-CH_2)_r$, donde r es un número entero de 1-4; con con la condición de que cuando X=O entonces r no es 2.

Z y Z* están independientemente ausentes o se seleccionan a partir del grupo constituido por un grupo de enlace internucleosídico, un grupo terminal y un grupo protector; y

B es una nucleobase; Más adelante se ofrece una descripción detallada de los monómeros de LNA preferidos.

El término "grupo de enlace internucleosídico" se pretende que signifique un grupo capaz de acoplar covalentemente dos nucleósidos, dos monómeros de LNA, un nucleósido y un monómero de LNA, etc. los ejemplos específicos y preferidos incluyen grupos fosfato y grupos fosforotioato.

El término "ácido nucleico" se define como una molécula formada mediante el enlace covalente de dos o más nucleótidos. Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan de forma intercambiable en el presente documento. Cuando se usan en el presente documento, un "ácido nucleico" o a "polinucleótido" habitualmente contiene más de 35 nucleótidos.

El término "oligonucleótido" se refiere, en el contexto de la presente invención, a un oligómero (también denominado oligo) de RNA, DNA y/o monómeros de LNA así como sus variantes y análogos. Cuando se usa en el presente documento, un "oligonucleótido" habitualmente contiene 2-35 nucleótidos, en particular 12-35 nucleótidos.

Con el término “propiedades mejoradas” se entiende una o más propiedades por las que el compuesto de siLNA de la invención muestra un mejor resultado que sus homólogos naturales. Los ejemplos de dichos parámetros son facilidad de producción, coste de producción, mayor vida útil en depósito, mayor afinidad de unión a la diana (complemento provisional en la diana de siLNA o mRNA), mayor capacidad para penetrar una membrana celular, mejor resistencia a nucleasas extracelulares e intracelulares, mayor facilidad para la formulación farmacéutica, mayor potencia en su modo de acción, mejor distribución tisular, mejor respuesta fenotípica, mayor duración de los efectos, etc.

Con los términos “unidad” o “resto” es entiende un monómero.

El término “al menos uno” engloba un número entero mayor o igual a 1, como por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y así sucesivamente.

Los términos “un” y “uno/a” tal como se usan con respecto a un nucleótido, un nucleósido, un agente activo, un monómero de LNA, etc. se pretende que signifique uno o más. En particular, la expresión “un componente (como por ejemplo un nucleótido, un nucleósido, un agente activo, un monómero de LNA o similares) que se selecciona a partir del grupo constituido por...” se pretende que signifique que puede seleccionarse uno o más de los citados componentes. Así, las expresiones como “un componente que se selecciona a partir del grupo constituido por A, B y C” se pretende que incluya todas las combinaciones de A, B y C, es decir A, B, C, A+B, A+C, B+C y A+B+C.

El término “tio-LNA” se refiere a un nucleótido cerrado en el que la X en el Esquema 2 es S. tio-LNA puede estar tanto en la forma beta-D como en la forma alfa-L. Generalmente, se prefiere la forma beta-D de tio-LNA. La forma beta-D de tio-LNA se muestra en el Esquema 3 como el compuesto 3C.

El término “tio-LNA” se refiere a un nucleótido cerrado en el que la X en el Esquema 2 es NH o NR^H, donde R^H es hidrógeno o alquilo C_{1-4}. Amino-LNA puede estar tanto en la forma beta-D como en la forma alfa-L. Generalmente, se prefiere la forma beta-D de amino-LNA. La forma beta-D de amino-LNA se muestra en el Esquema 3 como el compuesto 3D.

El término “oxi-LNA” se refiere a un nucleótido cerrado en el que la X en el Esquema 2 es O. Oxi-LNA puede estar tanto en la forma beta-D como en la forma alfa-L. Se prefiere la forma beta-D de oxi-LNA. La forma beta-D y la forma alfa-L se muestran en el Esquema 3 como los compuestos 3A y 3B, respectivamente.

El término “siLNA” se usa ampliamente con respecto a los compuestos bicatenarios de la invención. Así, un “siLNA”, tal como se usa en el presente documento, siempre comprende al menos un monómero de LNA.

Tal como se usa en el presente documento, el término “siRNA” se refiere a un tramo bicatenario de RNA o de monómeros de RNA modificados. En un compuesto de siRNA típico, las dos hebras habitualmente tienen 19 nucleótidos complementarios entre sí, creando así una doble hebra que tiene 19 nucleótidos de longitud y cada hebra tiene un extremo 3’ de dos nucleótidos protuberantes. Esta no es una definición estricta de siRNA, que puede ser ligeramente más larga o más corta, y tener o no protuberancias. En el siRNA una hebra es la guía y es complementaria al RNA diana (hebra no codificante), y la otra hebra (hebra codificante) tiene la misma secuencia que el RNA diana y por lo tanto es complementario a la hebra guía o no codificante. En el presente documento, los RNAs reguladores como por ejemplo “micro RNA” (“miRNA”) y “RNA corto” (“shRNA”) y una variedad de RNA estructurales como por ejemplo tRNA, snRNA, scRNA, rRNA se usan de forma intercambiable con el término “siRNA”.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “RNAm” quiere decir los tránscrito(s) de RNAm de un gen diana conocidos actualmente, y cualesquiera transcritos adicionales que puedan identificarse.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “ácido nucleico diana” engloba cualquier RNA que podría someterse a modulación, escisión dirigida, bloqueo estérico (disminución de la abundancia del RNA diana y/o inhibición de la traducción) guiado por la hebra no codificante. El RNA diana podría, por ejemplo, ser RNA genómico, RNA vírico genómico, mRNA o un pre-mRNA.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “modificación de ácidos nucleicos específicos de diana ” quiere decir cualquier modificación en un ácido nucleico diana.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “gen” quiere decir el gen que incluye exones, intrones, regiones 5’ y 3’ no codificantes y elementos reguladores y todas sus variantes actualmente conocidas y cualquier variante adicional que pueda ser descubierta.

Tal como se usa en el presente documento, el término “modulación” quiere decir o bien un aumento (estimulación) o un descenso (inhibición) en la expresión de un gen. En la presente invención, la inhibición es la forma preferida de modulación de la expresión génica y el RNAm es una diana preferida.

Tal como se usa en el presente documento, el término “dirigir” un compuesto de siLNA o siRNA contra un ácido nucleico diana particular quiere decir proporcionar el oligonucleótido de siRNA o siLNA a la célula, animal o ser humano de tal forma que los compuestos de siLNA o siRNA sean capaces de unirse y modular la función de la diana.

Tal como se usa en el presente documento, "hibridación" quiere decir enlaces de hidrógeno, que pueden ser de Watson-Crick, Hoogsteen, enlaces de hidrógeno de Hoogsteen inverso, etc. entre bases nucleosídicas o nucleotídicas complementarias. Las cuatro nudeobases, que se encuentran habitualmente en el DNA son G, A, T y G, de las cuales G se empareja con C, y A se empareja con T. En el RNA la T se sustituye por uracilo (U), que después se empareja con A. Los grupos químicos de las nucleobases que participan en la formación de dúplex estándar constituyen la cara Watson-Crick. Hoogsteen demostró un par de años después que las nucleobases de purina (G y A) además de su cara Watson-Crick tienen una cara Hoogsteen que puede reconocerse desde el exterior de un dúplex, y se usa para unir los oligonucleótidos de pirimidina mediante enlaces de hidrógeno, formando así una estructura de triple hélice.

En el contexto de la presente invención "complementaria" se refiere a la capacidad de emparejamiento preciso entre dos secuencias de nucleótidos entre sí. Por ejemplo, si un nucleótido en una cierta posición de un oligonucleótido puede formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido situado en la posición correspondiente de una molécula de DNA o RNA, entonces se considera que el oligonucleótido y el DNA o RNA son complementarios entre sí en esa posición. Las hebras de DNA o RNA se consideran complementarias entre sí cuando un número suficiente de nucleótidos del oligonucleótido pueden formar enlaces de hidrógeno con los nucleótidos correspondientes del DNA o RNA diana para permitir la formación de un complejo estable. Para ser estable *in vitro* o *in vivo*, la secuencia de un compuesto de siLNA o siRNA no tiene que ser complementaria al 100% a su ácido nucleico diana. Los términos "complementario" y "específicamente hibridable" por lo tanto implican que el compuesto de siLNA o siRNA se une de una forma lo suficientemente fuerte y específica a la molécula diana para que proporcione la interferencia deseada con la función normal de la diana a la vez que no afecta a la función de las dianas distintas de RNAm.

En el presente contexto el término "conjugado" se pretende que indique una molécula heterogénea formada por la unión covalente de un compuesto tal como se describe en el presente documento a uno o más restos no nucleotídicos o no polinucleotídicos. Los ejemplos de restos no nucleotídicos o no polinucleotídicos incluyen agentes macromoleculares como por ejemplo proteínas, cadenas de ácidos grasos, restos de azúcares, glucoproteínas, polímeros, o sus combinaciones. Habitualmente las proteínas pueden ser anticuerpos contra una proteína diana. Los polímeros habituales pueden ser polietilenglicol.

En el presente contexto, el término "alquilo C_{1-6}" se pretende que signifique una cadena de hidrocarburo saturado lineal o ramificada en la que la cadena más larga tiene de uno a seis átomos de carbono, como por ejemplo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, neopentilo y hexilo. Una cadena de hidrocarburo ramificada se pretende que signifique un alquilo C_{1-6} sustituido en cualquier carbono con una cadena de hidrocarburo.

En el presente contexto, el término "alquilo C_{1-4}" se pretende que signifique una cadena de hidrocarburo saturado lineal o ramificada en la que la cadena más larga tiene de uno a cuatro átomos de carbono, como por ejemplo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo y terc-butilo. Una cadena de hidrocarburo ramificada se pretende que signifique un alquilo C_{1-4} sustituido en cualquier carbono con una cadena de hidrocarburo.

Cuando se usa en el presente documento el término "alcoxi C_{1-6}" se pretende que signifique alquil-oxi C_{1-6}, como por ejemplo metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, isobutoxi, sec-butoxi, terc-butoxi, pentoxi, isopentoxi, neopentoxi y hexoxi.

En el presente contexto, el término "alquenilo C_{2-6}" se pretende que signifique un grupo hidrocarburo lineal o ramificado que tiene de dos a seis átomos de carbono y que contiene uno o más enlaces dobles. Los ejemplos ilustrativos de grupos alquenilo C_{2-6} incluyen alilo, homoalilo, vinilo, crotilo, butenilo, butadienilo, pentenilo, pentadienilo, hexenilo y hexadienilo. La posición de la insaturación (el enlace doble) puede estar en cualquier posición a lo largo de la cadena de carbono.

En el presente contexto, el término "alquinilo C_{2-6}" se pretende que signifique grupos hidrocarburo lineales o ramificados que contiene de dos a seis átomos de carbono y que contiene uno o más enlaces triples. Los ejemplos ilustrativos de grupos alquinilo C_{2-6} incluyen acetileno, propinilo, butinilo, pentinilo y hexinilo. La posición de la insaturación (el enlace triple) puede estar en cualquier posición a lo largo de la cadena de carbono. Puede haber más de un enlace insaturado de tal forma que el "alquinilo C_{2-6}" sea un diino o un enediino como conoce el experto en la técnica.

El término "carcinoma" se pretende que indique un tumor maligno de origen epitelial. El tejido epitelial cubre o tapiza las superficies interiores y exteriores del cuerpo. Los ejemplos de tejido epitelial son la piel y la mucosa y serosa que tapizan las cavidades corporales y los órganos internos, como por ejemplo los intestinos, la vejiga urinaria, el útero, etc. El tejido epitelial también pueden extenderse a capas de tejido más profundas de las glándulas, como por ejemplo las glándulas que segregan moco.

El término "sarcoma" se pretende que indique un tumor maligno que crece a partir de tejido conjuntivo, como por ejemplo cartílago, grasa, músculos, tendones y huesos.

El término "glioma", cuando se usa en el presente documento, se pretende que cubra un tumor maligno que se origina en células gliales.

Compuestos de la invención

La presente invención se base, en parte, en el sorprendente descubrimiento de que el LNA puede usarse para mejorar la interferencia de RNA incorporando monómeros de LNA en la hebra codificante y/o no codificante de los polinucleótidos bicatenarios, como por ejemplo siRNA. Esto es particularmente sorprendente dado que los monómeros de ENA de estructura muy similar perjudican mucho la interferencia de RNA, incluso con siRNA mínimamente modificados (Hamada *et al*., Antisense and Nucl. Acid Drug Dev., 2002, 12, 301-309).

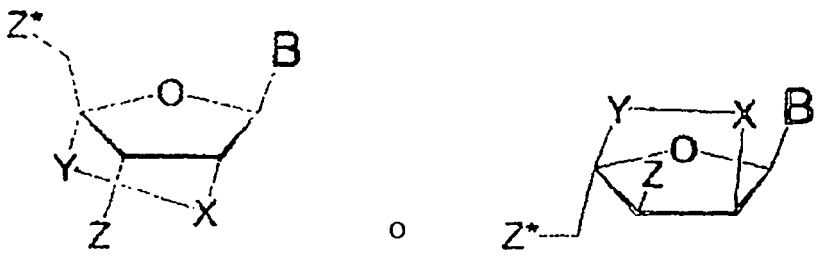
El LNA muestra una propiedades de unión sin precedentes por secuencias de DNA y RNA diana. Además de estas notables propiedades de hibridación, los monómeros de LNA pueden mezclarse y actuar de forma cooperativa con monómeros de DNA y RNA, así como con análogos de nucleótidos, como por ejemplo monómeros de RNA con modificación 2'-O-alquilo. La afinidad de unión sin precedentes de LNA por las secuencias de DNA o RNA diana y la capacidad de mezclarse libremente con monómeros de LNA libremente con monómeros de DNA y RNA y un abanico de análogos de nucleótidos tiene algunas consecuencias importantes de acuerdo con la invención para el desarrollo de compuestos de tipo siRNA eficaces y seguros.

El dsDNA natural existe a pH fisiológico en forma de una hélice de forma B, mientras que el dsRNA existe en forma de una hélice de forma A. Esta diferencia morfológica es debida a la diferencia en las conformaciones preferidas de los azúcares en las desoxirribosas y las ribosas. A temperatura ambiente, el anillo de furanosa de la desoxirribosa existe en equilibrio entre la conformación C2'-endo (tipo S) y C3'-endo (tipo N) con una barrera de energí de ~2 kcal/mol (Fig. 1). La conformación C2'-endo (tipo S) da lugar a la hélice de forma B, mientras que la conformación C3'-endo (tipo N) da lugar a la hélice de forma A. Para la desoxirribosa, la conformación de tipo S tiene una energía menor que la de tipo N y eso explica porqué el DNA se encuentra en la conformación de tipo S. Para la ribosa se prefiere la conformación de tipo S y, por lo tanto, el RNA adopta la hélice de forma A. Es sabido que la hélice de forma A está asociada a una mayor estabilidad de hibridación.

Los monómeros de LNA cierran la conformación del anillo furanosa en una conformación que corresponde a una conformación C3'-endo terminal. Estos monómeros por lo tanto, imitan la conformación del RNA, y se ha demostrado que la estructura de los oligonucleótidos y los dúplex de los monómeros son de tipo RNA (Petersen *et al*., J. Am. Chem. Soc., 2002, 124, 5974-82). Esto quiere decir que la estructura de oligonucleótidos de RNA y los dúplex de RNA/RNA a los que se incorporan los monómeros de LNA no cambian significativamente con respecto a los oligonucleótidos de RNA y los dúplex de RNA/RNA naturales. Se demostró además que los monómeros de LNA indujeron una conformación de tipo RNA cuando se introducían en DNA. Así, los monómeros de LNA imparte, en particular en el extremo 3', un alto grado de conformación C3'-endo (de tipo RNA). Si, por ejemplo, uno de cada dos o uno de cada tres restos en un oligómero de DNA es sustituido por monómeros de LNA, la estructura global del oligonucleótido se parecerá mucho al RNA. Así, el dúplex formado por dichos oligonucleótidos conseguirá una estructura que se parezca a los dúplex de forma A naturales (RNA/RNA). Es parte de esta invención usar esta propiedad de los monómeros de LNA para dirigir la conformación de DNA hacia una estructura de RNA.

Se apreciará que la afinidad sin precedentes del LNA puede usarse para acortar la longitud habitual de un oligonucleótido de siRNA (de 21-35 meros a, por ejemplo, 12-20 meros) sin poner en peligro la afinidad necesaria para la actividad farmacológica. Dado que la especificidad intrínseca de un oligonucleótido es inversamente proporcional a su longitud, un acortamiento así aumentaría significativamente la especificidad del compuesto siLNA por su RNA diana. Un objetivo de la invención es por lo tanto, debido al hecho de que la secuencia del genoma humano está disponible y la anotación de sus genes está progresando rápidamente, identificar las secuencias únicas lo más cortas posibles en el RNAm diana. Además al reducir el tamaño de los oligonucleótidos, y así facilitar el procedimiento de fabricación y reducir los costes de fabricación, se cree que los compuestos de siLNA, como los que se describen en el presente documento, tienen potencial para convertirse en base del tratamiento con RNAi, y de ser un tratamiento comercialmente competitivo que puede ofrecerse para una variedad de enfermedades.

Por consiguiente, en su aspecto más amplio, la presente invención se refiere a un compuesto bicatenario que comprende una hebra codificante y una hebra no codificante, en el que cada hebra comprende 12-35 nucleótidos y en el que dicho compuesto comprende al menos un monómero de ácido nucleico cerrado (LNA), que tiene la estructura



en las que

X se selecciona a partir del grupo constituido por O, S y NR^H, donde R^H es H o alquilo C_{1-4};

Y es CH_2;

B es una nucleobase;

Z y Z* están independientemente ausentes o se seleccionan a partir del grupo constituido por un grupo de enlace internucleosídico, un grupo terminal y un grupo protector; de forma que cuando el monómero de LNA está localizado en el extremo 3', Z es un grupo terminal y Z* es un grupo de enlace internucleosídico; cuando el monómero de LNA está localizado en el extremo 5', Z está ausente y Z* es un grupo terminal; y cuando el monómero de LNA está localizado dentro de la secuencia de nucleótidos, Z está ausente y Z* es un grupo de enlace internucleosídico, y

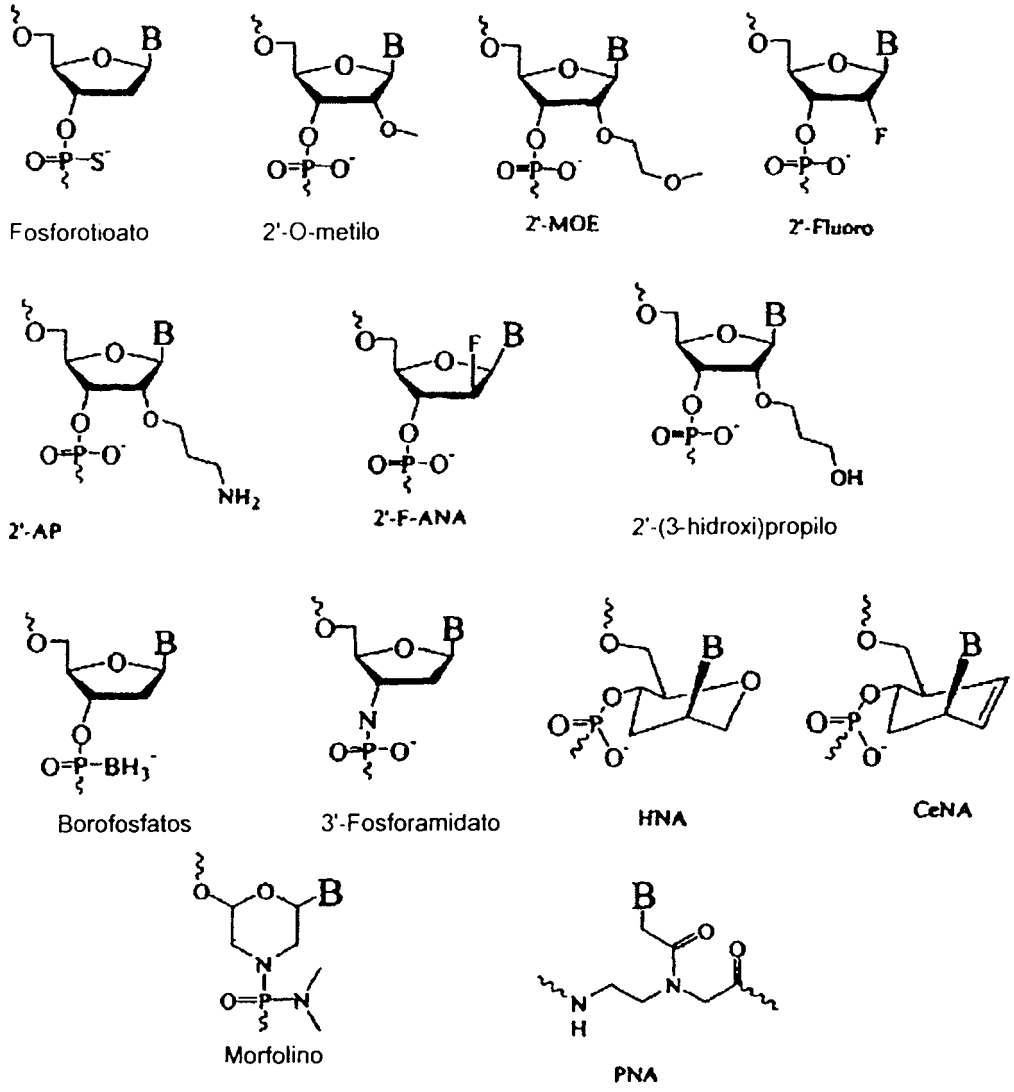
en la que ningún monómero de LNA está localizado en el extremo 5' de la hebra no codificante.

Los compuestos bicatenarios de la invención pueden estar compuestos enteramente de monómeros de LNA o puede estar compuesto por monómeros de LNA en cualquier combinación con monómeros de DNA, monómeros de RNA o análogos nucleotídicos.

Como se ha indicado anteriormente, el término "nucleósido" quiere decir una unidad de 2-desoxirribosa (DNA) o una unidad de ribosa (RNA) que está unida a través de su carbono número uno a una base nitrogenada, como por ejemplo adenina (A), citosina (C), timina (T), guanina (G) o uracilo(U), y que está unida a través de su átomo de carbono número cinco a un grupo de enlace internucleosídico (tal como se define anteriormente) o a un grupo terminal (como se describe más adelante). Así, el término "nucleótido" engloba unidades de RNA (o monómeros) que comprenden una unidad de ribosa que está unida a través de su carbono número uno a una base nitrogenada, como por ejemplo A, C, T, G o U, y que está unida a través de su átomo de carbono número cinco a un grupo fosfato o a un grupo terminal. Como se explica anteriormente, el término "nucleótido" también engloba unidades de DNA (o monómeros) que comprenden una unidad de 2-desoxirribosa que está unida a través de su carbono número uno a una base nitrogenada, como por ejemplo A, C, T, G o U, y que está unida a través de su átomo de carbono número cinco a un grupo fosfato o a un grupo terminal. El término "nucleótido" también cubre variantes o análogos de dichos monómeros de RNA y DNA. Por ejemplo, el grupo 2'-OH (RNA) o 2'-H (DNA) puede sustituirse por -O-CH_3, -O-CH_2-CH_2-OCH_3, -O-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2, -O-CH_2-CH_2-CH_2-OH o F. Otros ejemplos de análogos nucleotídicos son los monómeros de LNA. Además, el grupo de enlace internucleosídico no está limitado a fosfato (-O-P $(O)_2$-O-), sino que puede incluir -O-P(O,S)-O-, -O-P$(S)_2$-O-, -S-P$(O)_2$-O-, -S-P(O,S)-O-, -S-P$(S)_2$-O-, -O-P$(O)_2$-S-, -O-P (O, S)-S-, -S-P$(O)_2$-S-, -O-PO(R^H)-O-, O-PO(OCH_3)-O-, -O-PO(NR^H)-O-, O-PO(OCH_2CH_2S-R)-O-, -O-PO(BH_3)-O-, -OPO (NHR^H)-O-, -O-P$(O)_2$-NR^H-, -NR^H-P$(O)_2$-O-, -NR^H-CO-O-, -NR^H-CO-NR^H-, -O-CO-O-, -O-CO-NR^H-, -NR^H-CO-CH_2-, -O-CH_2-CO-NR^H-, -O-CH_2-CH_2-NR^H-, -CO-NR^H-CH_2-, -CH_2-NR^H-CO-, -O-CH_2-CH_2-S-, -S-CH_2-CH_2-O-, -SCH_2-CH_2-S-, -CH_2-SO_2-CH_2-, -CH_2-CO-NR^H-, -O-CH_2-CH_2-NR^H-CO -, -CH_2-NCH_3-O-CH_2-, donde R^H es hidrógeno o alquilo C_{1-4}. Además, la base nitrogenada no está restringida a A, C, T, G o U, si no que puede incluir otras purinas y pirimidinas, como por ejemplo 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 5-propini-6-fluoroluracilo, 5-metiltiazoluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, 2,6-diaminopurina, 7-propin-7-desazaadenina, 7-propin-7-desazaguanina y 2-cloro-6-aminopurina. Otros ejemplos de variantes y análogos de nucleótidos que entran dentro de la presente definición de "nucleótido" se describen en Freier & Altmann (Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443) y Uhlmann (Curr. Opinion en Drug & Development (2000, 3(2): 293-213). El Esquema 1 siguiente ilustra ejemplos seleccionados de dichas variantes y análogos de nucleótidos. En conclusión, los compuestos de la invención pueden contener cualquiera de los nucleótidos mencionados anteriormente, siempre que el compuesto contenga al menos un monómero de LNA en al menos una de las hebras.

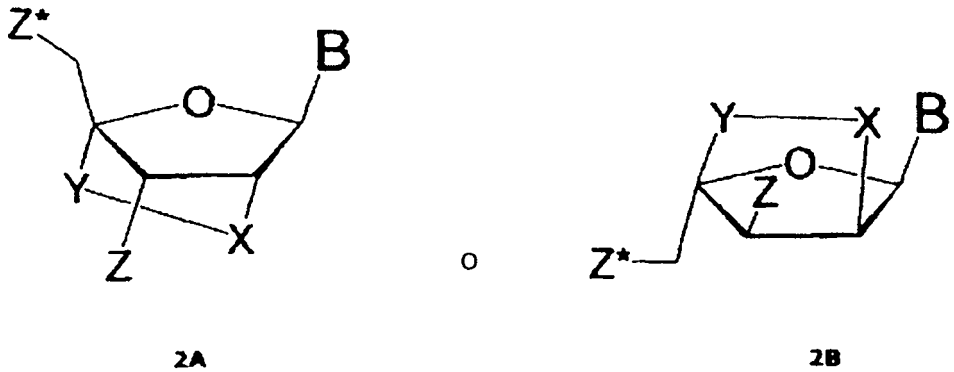
(Esquema pasa a página siguiente)

Esquema 1



Tal como se indica anteriormente, el término "monómero de ácido nucleico cerrado" o "monómero de LNA" se refiere a un análogo nucleotídico bicíclico y tiene la estructura química que se muestra en el Esquema 2 siguiente:

Esquema 2



2A 2B

en las que

X se selecciona a partir del grupo constituido por O, S y NR^H, donde R^H es H o alquilo, como por ejemplo alquilo C_{1-4};

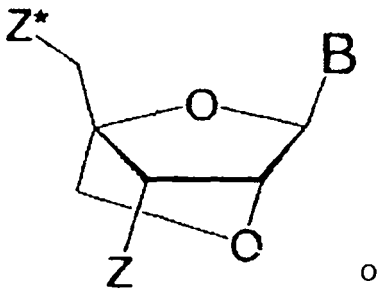
Y es $(-CH_2)_r$, donde r es un número entero de 1-4; con la condición de que cuando X=O entonces r no es 2.

Z y Z* están independientemente ausentes o se seleccionan a partir del grupo constituido por un grupo de enlace internucleosídico, un grupo terminal y un grupo protector; y

B es una nucleobase;

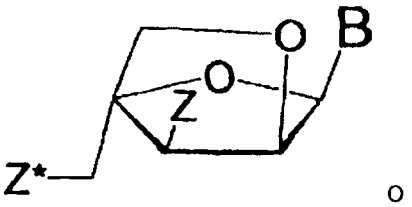
En una realización preferida de la invención, r es 1, es decir un monómero de LNA preferido tiene la estructura química que se muestra en el Esquema 3 siguiente:

Esquema 3



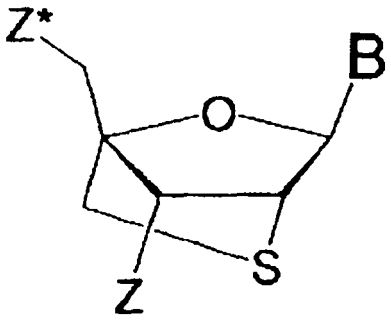
3A

o



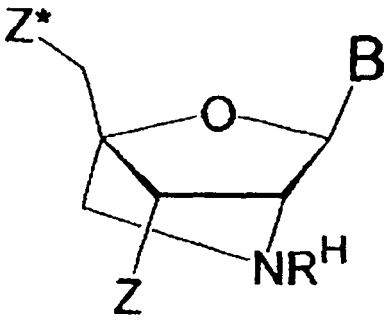
3B

o



3C

o

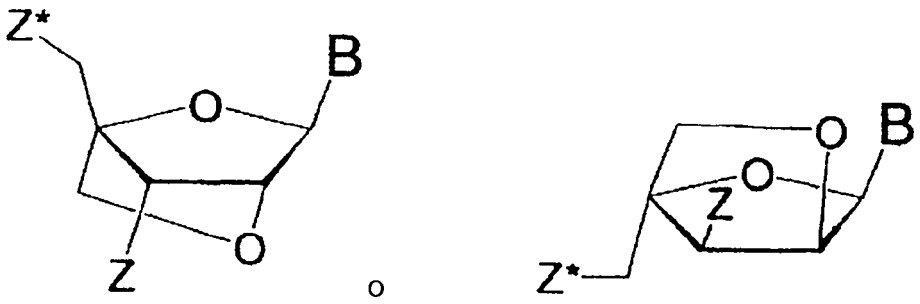


3D

en las que Z, Z*, R^H y B se han definido anteriormente.

En una realización de la invención incluso más preferida, X es O y r es 1, es decir un monómero de LNA incluso más preferido tiene la estructura química que se muestra en el Esquema 4 siguiente:

Esquema 4



3A 3B

en las que Z, Z* y B se han definido anteriormente.

Las estructuras que se muestran en 3A y 3B anteriormente también pueden denominarse “forma beta-D” y “forma alfa-L”, respectivamente. En una realización de la invención muy preferida, el monómero de LNA es la forma beta-D, es decir el monómero de LNA tiene la estructura química que se indica en 3A anteriormente.

Tal como se indica anteriormente, Z y Z*, que actúan como enlace internucleosídico, están independientemente ausentes o se seleccionan a partir del grupo constituido por un grupo de enlace internucleosídico, un grupo terminal y un grupo protector dependiendo de la posición real del monómero de LNA dentro del compuesto. Se entenderá que en las realizaciones en las que el monómero de LNA está localizado en el extremo 3’, Z es un grupo terminal y Z* es un enlace internucleosídico. En las realizaciones donde el monómero de LNA está localizado en el extremo 5’, Z está ausente y Z* es un grupo terminal. En las realizaciones donde el monómero de LNA está localizado dentro de la secuencia de nucleótidos, Z está ausente y Z* es un grupo de enlace internucleosídico.

Los ejemplos específicos de de grupos de enlace internucleosídicos incluyen -O-P(O)$_2$-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)$_2$-O-, -S-P(O)$_2$-O-, -S-P(O,S)-O-, -S-P(S)$_2$-O-, -O-P(O)$_2$-S-, -O-P(O,S)-S-, -S-P(S)$_2$-S-, -O-PO(R^H)-O-, O-PO(OCH$_3$)-O-, -O-PO (NR^H)-O-, -O-PO(OCH$_2$CH$_2$S-R)-O-, -O-PO(BH$_3$)-O-, -O-PO(NHR^H)-O-, -O-P(O)$_2$-NR^H-, -NR^H-P(O)$_2$-O-, -NR^H-CO-O-, -NR^H-CO-NR^H-, -O-COO-, -O-CO-NR^H-, -NR^H-CO-CH$_2$-, -O-CH$_2$-CO-NR^H-, -O-CH$_2$-CH$_2$-NR^H-, -CO-NR^H-CH$_2$-, -CH$_2$-NR^H-CO-, -O-CH$_2$-CH$_2$-S-, -S-CH$_2$-CH$_2$-O-, -S-CH$_2$-CH$_2$-S-, -CH$_2$-SO$_2$-CH$_2$-, -CH$_2$-CO-NR^H-, -OCH$_2$-CH$_2$-NR^H-CO -, -CH$_2$-NCH$_3$-O-CH$_2$-, donde R^H es hidrógeno o alquilo C$_{1-4}$.

En una realización preferida de la invención, el grupo de enlace internucleosídico es un grupo fosfato (-O-P(O)$_2$-O-), un grupo fosforotioato (-O-P(O,S)-O-) o el compuesto puede contener tanto grupos fosfato como fosforotioato.

Los ejemplos específicos de grupos terminales incluyen grupos terminales que se seleccionan a partir del grupo constituido por hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxi, Prot-O-, Act-O-, mercapto, Prot-S-, Act-S-, alquiltio C$_{1-6}$, amino, Prot-N(R^H)-, Act-N(R^H)-, mono- o di(alquil C$_{1-6}$)amino, alcoxi C$_{1-6}$ opcionalmente sustituido, alquilo C$_{1-6}$ opcionalmente sustituido, alquenilo C$_{2-6}$ opcionalmente sustituido, alqueniloxi C$_{2-6}$ opcionalmente sustituido, alquinilo C$_{2-6}$ opcionalmente sustituido, alquiniloxi C$_{2-6}$ opcionalmente sustituido, monofosfato que incluye monofosfato protegido, monotiofosfato que incluye monotiofosfato protegido, difosfato que incluye difosfato protegido, ditiofosfato que incluye ditiofosfato protegido, trifosfato que incluye trifosfato protegido, tritiofosfato que incluye tritiofosfato protegido, donde Prot es un grupo protector para -OH, -SH y -NH(R^H), y Act es un grupo de activación para -OH, -SH, y -NH(R^H), y R^H es hidrógeno o alquilo C$_{1-6}$.

Los ejemplos de grupos protectores de fosfato incluyen S-acetiltioetilo (SATE) y S-pivaloiltioetilo (t-butil-SATE).

Todavía otros ejemplos de grupos terminales incluyen intercaladores de DNA, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos testigo, ligandos, carboxi, sulfono, hidroximetilo, Prot-O-CH$_2$-, Act-O-CH$_2$-, aminometilo, Prot-N(R^H)-CH$_2$-, Act-N(R^H)-CH$_2$-, carboximetilo, sulfonometilo, donde Prot es un grupo protector para -OH, -SH y -NH(R^H), y Act es un grupo de activación para -OH, -SH, y -NH(R^H), y R^H es hidrógeno o alquilo C$_{1-6}$.

Los ejemplos de grupos protectores para los grupos -OH y -SH incluyen tritilo sustituido, como por ejemplo 4,4’-dimetoxitritiloxi (DMT), 4-monometoxitritiloxi (MMT); tritiloxi, 9-(9-fenil)xanteniloxi (pixilo) opcionalmente susti-

tuido, metoxitetrahidropiraniloxi (mthp) opcionalmente sustituido; sililoxi, como por ejemplo trimetilsililoxi (TMS), triisopropilsililoxi (TIPS), terc-butildimetilsililoxi (TBDMS), trietilsililoxi, fenildimetilsililoxi; terc-butiléteres; acetales (que incluyen dos grupos hidroxi); aciloxi, como por ejemplo acetilo o acetilos sustituidos con halógeno, por ejemplo cloroacetiloxi o fluoroacetiloxi, isobutiriloxi, pivaloiloxi, benzoiloxi y benzoílos sustituidos, metoximetiloxi (MOM), benciléteres o benciléteres sustituidos como por ejemplo 2,6-diclorobenciloxi (2,6-Cl_2Bzl). Además, cuando Z o Z* es hidroxilo, pueden protegerse mediante la unión a un soporte sólido opcionalmente a través de un enlazador.

Los ejemplos de grupos protectores de amina incluyen fluorenilmetoxicarbonilamino (Fmoc), terc-butiloxicarbonilamino (BOC), trifluoroacetilamino, aliloxicarbonilamino (alloc, AOC), Z-benciloxicarbonilamino (Cbz), benciloxicarbonilamino sustituido, como por ejemplo 2-clorobenciloxicarbonilamino (2-CIZ), monometoxitritilamino (MMT), dimetoxitritilamino (DMT), ftaloilamino, y 9-(9-fenil)xantenilamino (pixilo).

El grupo de activación preferentemente actúa de mediador en el acoplamiento a otros restos y/o monómeros de nucleótidos y después de que se haya completado el acoplamiento, el grupo de activación habitualmente se convierte en un enlace internucleosídico. Los ejemplos de dichos grupos de activación, incluyen O-fosforamidita opcionalmente sustituida, O-fosfotriéster opcionalmente sustituido, O-fosfodiéster opcionalmente sustituido, H-fosfonato opcionalmente sustituido, y O-fosfonato opcionalmente sustituido. En el presente contexto, el término "fosforamidita" quiere decir un grupo de la fórmula $-P(OR^x)-N(R^y)_2$, en el que R^x designa un grupo alquilo opcionalmente sustituido, por ejemplo metilo, 2-cianoetilo, o bencilo, y cada uno de R^y designa grupos alquilo opcionalmente sustituidos, por ejemplo etilo o isopropilo, o el grupo $-N(R^y)_2$ forma un grupo morfolino ($-N(CH_2CH_2)_2O$). R^x preferentemente designa 2-cianoetilo y los dos R^y son preferentemente idénticos y designan isopropilo. Por consiguiente, una fosforamidita particularmente preferente es N,N-diisopropil-O-(2-cianoetil)fosforamidita.

Tal como se indica anteriormente, B es una nucleobase que puede ser de origen natural o no natural. Los ejemplos específicos de nucleobases incluyen adenina (A), citosina (C), 5-metilcitosina (^{Me}C), isocitosina, pseudoisocitosina, guanina (G), timina (T), uracilo (U), 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 5-propini-6-fluoroluracilo, 5-metiltiazoluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, 2,6-diaminopurina, 7-propine-7-desazaadenina, 7-propin-7-desazaguanina y 2-cloro-6-aminopurina. Las nucleobases preferidas incluyen A, C, ^{Me}C, G, T y U, en particular A, C, ^{Me}C, G y U.

En una realización de la invención, la hebra codificante comprende al menos un monómero de LNA, como por ejemplo 1-10 monómeros de LNA, por ejemplo 1-5 monómeros de LNA. En otra realización de la invención, la hebra no codificante comprende al menos un monómero de LNA, como por ejemplo 1-10 monómeros de LNA, por ejemplo 1-5 monómeros de LNA. En una realización adicional de la invención, la hebra codificante comprende al menos un monómero de LNA y la hebra no codificante comprende al menos un monómero de LNA. Por ejemplo, la hebra codificante habitualmente comprende 1-10 monómeros de LNA, como por ejemplo 1-5 monómeros de LNA, y la hebra no codificante habitualmente comprende 1-10 monómeros de LNA, como por ejemplo 1-5 monómeros de LNA.

Una ventaja particular sobre los compuestos de la invención es su estabilidad mejorada en fluidos biológicos, como por ejemplo suero. Así, una realización de la invención incluye la incorporación de monómeros de LNA a un oligonucleótido de DNA o RNA estándar para aumentar la estabilidad del compuesto de siLNA resultante en los fluidos biológicos por ejemplo aumentando la resistencia contra las nucleasas (endonucleasas y exonucleasas). Por consiguiente, los compuestos de la invención, debido a la incorporación de monómeros de LNA, mostrarán una mayor semivida de circulación como resultado de su mayor temperatura de fusión y/o de su mayor resistencia a nucleasas. La magnitud de la estabilidad dependerá del número de monómeros de LNA que se use, de su posición en los oligonucleótidos y del tipo de monómero de LNA que se use. Comparando con DNA y fosforotioatos, puede establecerse el siguiente orden de capacidad de estabilizar un oligonucleótido contra la degradación nucleolítica: DNA << fosforotioatos, LNA-fosfodiéster < LNA-fosforotioatos.

Por lo tanto, los compuestos de acuerdo con la invención que son particularmente preferentes son los compuestos que, cuando se incuban en suero (por ejemplo suero humano, bovino o murino), como por ejemplo en suero bovino fetal al 10% en una solución salina fisiológica a 37ºC durante 5 horas, se degradan menos que el compuesto de dsRNA correspondiente. Preferentemente, se degrada menos del 25% de la cantidad inicial del compuesto de la invención después de 5 horas, más preferentemente se degrada menos de 50% de la cantidad inicial del compuesto de la invención después de 5 horas, incluso más preferentemente se degrada menos de 75% de la cantidad inicial del compuesto de la invención después de 5 horas. En otra realización, es preferente que se degrade menos de 25% de la cantidad inicial del compuesto de la invención después de 10 horas, e incluso es más preferente que se degrade menos de 50% de la cantidad inicial del compuesto de la invención después de 10 horas.

Considerando el hecho de que el LNA es compatible con la síntesis de RNA/DNA estándar y que los monómeros de LNA se mezclan libremente con muchos análogos de ácidos nucleicos contemporáneos, la resistencia a las nucleasas de los compuestos de siLNA puede mejorarse además de acuerdo con la invención o bien incorporando otros análogos que presenten una mayor estabilidad contra las nucleasas o explotando los enlaces internucleosídicos resistentes a nucleasas por ejemplo los enlaces de fosforomonotioato, fosforoditioato, y metilfosfonato, etc.

Los monómeros de LNA pueden usarse libremente para diseñar siLNA en ambas protuberancias en 3' y el extremo 5' de la hebra codificante con activación total del efecto de siLNA y regulación por disminución de la producción de proteínas (>90% de reducción). Los monómeros de LNA pueden distribuirse bastante libremente sobre la hebra codificante en el siLNA manteniendo una elevada capacidad de regulación por disminución (80% de reducción). El

extremo 5' de la hebra no codificante del siLNA también puede modificarse mediante monómeros de LNA, dando así lugar a una capacidad de regulación por disminución de hasta 50-70%. El uso de una hebra no codificante con muchas sustituciones con monómero de LNA no parece proporcionar un efecto de regulación por disminución, aunque no puede descartarse que un diseño especial de esa combinación pueda provocar un efecto de RNAi. Las sustituciones con monómero de LNA de las protuberancias en 3' junto con el extremo 5' de la hebra codificante del siLNA dan la mayor reducción de los niveles de proteínas. El extremo 5' de la hebra no codificante es el más sensible a la modificación con monómeros de LNA aunque otros muchos sitios de modificación se toleran mejor.

En una realización el compuesto de siLNA se diseña de forma que los monómeros de LNA se incorporen al compuesto de tal forma que refuercen los pares de bases del dúplex en el extremo 5' de la hebra codificante. Por lo tanto, la helicasa puede dirigirse para desenrollar el otro extremo 5' (extremo 5' de la hebra no codificante). De este modo, puede controlarse la incorporación de la hebra no codificante/guía en el RISC. La helicasa comienza a desenrollar el dúplex de siRNA en el extremo con la menor cohesión. El extremo 3' liberado probablemente es objeto de degradación mientras que la hebra que queda se incorpora al RISC. Los siRNA eficaces muestran acumulación de la hebra no codificante/guía y un emparejamiento más débil en el extremo 5' de la hebra no codificante/guía. Posiblemente puedan evitarse efectos secundarios indeseados incorporando únicamente la hebra correcta (la hebra no codificante/guía) al RISC y no la hebra codificante no deseada (no complementaria al RNA diana deseado).

El efecto de incorporar los monómeros de LNA al extremo 5' de la hebra no codificante puede observarse en la Fig. 11. El efecto de impedir el RNAi de un resto de LNA en el extremo 5' puede eliminarse parcialmente incorporando un emparejamiento incorrecto opuesto. En la Fig. 11 se ha demostrado esto para las dianas de Renilla y luciérnaga.

El efecto de impedir el RNAi de un monómero de LNA incorporado en el extremo 5' de la hebra no codificante puede eliminarse casi totalmente eliminando el monómero de LNA una posición de base hacia el extremo 3' (Fig. 12). El desplazamiento del monómero de LNA más hacia el extremo 3' de la hebra no codificante no afecta a la expresión génica, pero cuando el monómero de LNA toma la posición 10 ó 12, se observa un descenso significativo en el efecto de RNAi. El complejo RISC escindirá el mRNA en una posición opuesta a la posición entre 10 y 11 de la hebra no codificante del siRNA y, aparentemente, la incorporación del monómero de LNA sintético a ese sitio impide la escisión por el complejo RISC. Cuando el monómero de LNA se desplaza más lejos en la hebra no codificante, este efecto de impedimento disminuye.

Como se describe anteriormente, la helicasa muestra sesgo de hebra y preferentemente incorpora el siRNA del extremo con la menor cohesión del siRNA. Por lo tanto, en principio, pueden incorporarse ambas hebras al dúplex de siRNA. Esto entre otras propiedades del sistema de RISC+siRNA dará lugar a efectos fuera del objetivo. Una forma de reducir esto es incorporar los monómeros de LNA de afinidad elevada. Para el sitio Ren1, la nucleobase 5' de la hebra no codificante es U que constituye un resto con cohesividad "baja". El complejo RISC por lo tanto leerá de ese lado e incorporará la hebra no codificante (la hebra correcta). Para los sitios Ren2 y Ren3, la nucleobase en 5' es C que constituyen sitios de cohesividad "alta". Para estos sitios, el extremo 5' de la hebra codificante está posicionada mediante una nucleobase A y una U que ambas constituyen sitos de cohesividad "baja". El RISC por lo tanto puede mostrar sesgo de hebra en este caso y leer parcialmente de la hebra codificante (la hebra incorrecta). Al sustituir los restos 5'-adenosina y uridina por los restos de LNA A y U correspondientes, el sesgo de hebra se elimina y la hebra no codificante se incorpora al complejo RISC (Fig. 13). Por consiguiente, los restos de LNA pueden disminuir el sesgo de hebra y aumentar la potencia del dúplex. El siLNA de acuerdo con la presente invención preferentemente tiene una secuencia no codificante, que tenga como mínimo un 70%, más preferentemente 90-100% de identidad de secuencia con la molécula diana.

Tal como se indica anteriormente diversos diseños particulares aumentan la aplicabilidad de la potencia global del siRNA natural:

(a) una "caperuza en el extremo" diana en el siRNA mejora la estabilidad contra las nucleasas (Figs. 2 y 15).

(b) colocar un monómero de LNA hacia el extremo 5' de la hebra codificante mejora la potencia del siLNA relativa a la del siRNA natural ("cierre"). Esto se ilustra por el aumento en la potencia para las dianas de eficacia media (Figs. 13 y 15).

(c) En la "posición del LNA" (Fig. 12) se muestra que situar un monómero de LNA en el sitio de escisión del complejo RISC, por ejemplo en la posición 10, calculada desde el extremo 5' en la hebra no codificante, disminuye la actividad del siRNA ("bloqueo").

Estas observaciones básicas son importantes para mejorar la potencia global del siRNA. En los diseños optimizados los extremos 3' deberían tener "caperuza" de monómeros de LNA asegurando así la resistencia a nucleasas (Figs. 12 y 15). El extremo 5' de la hebra codificante también debería modificarse con LNA para aumentar la unión a la hebra no codificante y así dirigir la helicasa para que incorpore el "lado correcto" del dúplex. Dicho "cierre" del extremo 5' de la hebra codificante y del extremo 3' de las hebras codificante/no codificante del dúplex puede realizarse incorporando al menos un monómero de LNA a cualquier lado del dúplex. Dicho dúplex modificado también puede contener bases con enlaces de hidrógeno LNA-LNA. La observación de que la silenciación génica se reduce cuando el LNA se incorpora en la posición 10 ó 12 de la hebra no codificante puede usarse en el supuesto contrario. Si el complejo RISC incorporara parte de la hebra codificante y por ello produjera efectos indeseados fuera del objetivo, la potencia de la incorporación

indeseada debería reducirse incorporando LNA en la posición 10 y 12 de la hebra codificante ("bloqueando") como se muestra en la Fig. 12.

Por consiguiente, en una realización interesante de la invención, la hebra codificante comprende al menos un monómero de LNA localizado en al menos una (como por ejemplo una) de las posiciones 9-13, contadas a partir del extremo 5'. Preferentemente, la hebra codificante comprende al menos un monómero de LNA localizado en al menos una (como por ejemplo una) de las posiciones 10-12, contadas a partir del extremo 5'. En una realización de la invención particularmente interesante, la hebra codificante comprende un monómero de LNA en la posición 10, en la posición 12 o en ambas posiciones 10 y 12, contadas a partir del extremo 5'. Además, es particularmente preferente que el monómero de LNA, si se incorpora en la posición 10, contenga una base nitrogenada que sea diferente de las bases de RNA naturales, es decir diferentes de A, C, G y U. En una realización particularmente preferida, el monómero de LNA localizado en la posición 10 (contada a partir del extremo 5') contiene la base nitrogenada T.

Es sabido que los monómeros de LNA incorporados en los oligos inducen una estructura de tipo RNA en el oligo y en el híbrido que pudiera formar. También se ha demostrado que los restos de LNA modifican la estructura de los restos de DNA, en particular cuando los restos de LNA se incorporan cerca del extremo 3'. La incorporación de monómeros de LNA cerca del extremo 5' parece tener un efecto menor. Esto quiere decir que es posible modificar las hebras de RNA que contienen monómeros de DNA, y si uno o más restos de LNA flanquean los monómeros de DNA, ellos también tendrán una estructura de tipo RNA. Por lo tanto, el DNA y el monómero de LNA pueden sustituir a los monómeros de RNA y aún así, el oligo tendrá una estructura global de tipo RNA. Dado que los monómeros de DNA son considerablemente más baratos que los monómeros de RNA, más fáciles de sintetizar y más estables contra la degradación nucleófila, dichas modificaciones por lo tanto mejorarán el uso y aplicabilidad globales de los siRNA (véase, por ejemplo, la Fig. 15).

Por consiguiente, se prefiere que al menos un (como por ejemplo un) monómero de LNA esté localizado en el extremo 5' de la hebra codificante. Más preferentemente, al menos dos (como por ejemplo dos) monómeros de LNA están localizados en el extremo 5' de la hebra codificante.

En otra realización preferente de la invención, la hebra codificante comprende al menos un (como por ejemplo un) monómero de LNA localizado en el extremo '3 de la hebra codificante. Más preferentemente, al menos dos (como por ejemplo dos) monómeros de LNA están localizados en el extremo 3' de la hebra codificante.

En una realización particular de la invención, la hebra codificante comprende al menos un (como por ejemplo un) monómero de LNA localizado en el extremo '5 de la hebra codificante y al menos un (como por ejemplo un) monómero de LNA localizado en el extremo 3' de la hebra codificante.. Incluso más preferentemente, la hebra codificante comprende al menos dos (como por ejemplo dos) monómeros de LNA localizados en el extremo 5' de la hebra codificante y al menos dos (como por ejemplo dos) monómeros de LNA localizados en el extremo 3' de la hebra codificante.

Se prefiere que al menos un (como por ejemplo un) monómero de LNA esté localizado en el extremo 3' de la hebra no codificante. Más preferentemente, al menos dos (como por ejemplo dos) monómeros de LNA están localizados en el extremo 3' de la hebra no codificante. Incluso más preferentemente, al menos tres (como por ejemplo tres) monómeros de LNA están localizados en el extremo 3' de la hebra no codificante. En una realización preferente particular de la invención, ningún monómero de LNA está localizado en o cerca (es decir a 1, 2 ó 3 nucleótidos) del extremo 5' de la hebra no codificante.

Así, una realización adicional de la invención, el monómero de LNA puede estar localizado en cualquier posición de las hebras codificante y no codificante, excepto en el extremo '5 de la hebra no codificante.

En una realización muy preferida de la invención, la hebra codificante comprende al menos un monómero de LNA en el extremo 5' y al menos un monómero de LNA en el extremo 3', y la hebra no codificante comprende al menos un monómero de LNA en el extremo 3'. Más preferentemente, la hebra codificante comprende al menos un monómero de LNA en el extremo 5' y al menos un monómero de LNA en el extremo 3', y la hebra no codificante comprende al menos dos monómeros de LNA en el extremo 3'. Incluso más preferentemente, la hebra codificante comprende al menos dos monómeros de LNA en el extremo 5' y al menos dos monómeros de LNA en el extremo 3', y la hebra no codificante comprende al menos dos monómeros de LNA en el extremo 3'. Todavía más preferentemente, la hebra codificante comprende al menos dos monómeros de LNA en el extremo 5' y al menos dos monómeros de LNA en el extremo 3', y la hebra no codificante comprende al menos tres monómeros de LNA en el extremo 3'. Se entenderá que en la realización más preferente, ninguno de los compuestos mencionados anteriormente contiene un monómero de LNA que esté localizado en el extremo 5' de la hebra no codificante.

En una realización interesante adicional de la invención, el monómero de LNA está localizado cerca del extremo 3', es decir en la posición 2, 3 ó 4, preferentemente en la posición 2 ó 3, en particular en la posición 2, calculada desde el extremo 3'.

Por consiguiente, en una realización muy interesante adicional de la invención, la hebra codificante comprende un monómero de LNA localizado en la posición 2, calculada desde el extremo 3'. En otra realización, la hebra codificante comprende monómeros de LNA localizados en la posición 2 y 3, calculada desde el extremo 3'.

En una realización preferente particular de la invención, la hebra codificante comprende al menos un (como por ejemplo un) monómero de LNA localizado en el extremo 5' y un monómero de LNA localizado en la posición 2 (calculada desde el extremo 3'). En una realización adicional, la hebra codificante comprende al menos dos (como por ejemplo dos) monómeros de LNA localizados en el extremo 5' de la hebra codificante, un monómero de LNA localizado en la posición 2 (calculada desde el extremo 3').

Además, se prefiere que la hebra no codificante comprenda un monómero de LNA en la posición 2, calculada desde el extremo 3'. Más preferentemente, la hebra no codificante comprende monómeros de LNA en la posición 2 y 3, calculadas desde el extremo 3'. Incluso más preferentemente, la hebra no codificante comprende monómeros de LNA localizados en la posición 2, 3 y 4, calculadas desde el extremo 3'. En una realización preferente particular de la invención, ningún monómero de LNA está localizado en o cerca (es decir a 1, 2 ó 3 nucleótidos) del extremo 5' de la hebra no codificante.

En una realización muy preferida de la invención, la hebra codificante comprende al menos un monómero de LNA en el extremo 5' y un monómero de LNA en la posición 2 (calculada desde el extremo 3'), y la hebra no codificante comprende un monómero de LNA localizado en la posición 2 (calculada desde el extremo 3'). Más preferentemente, la hebra codificante comprende al menos un monómero de LNA en el extremo 5' y un monómero de LNA en la posición 2 (calculada desde el extremo 3'), y la hebra no codificante comprende monómeros de LNA en la posición 2 y 3 (calculadas desde el extremo 3'). Incluso más preferentemente, la hebra codificante comprende al menos dos monómeros de LNA en el extremo 5' y monómeros de LNA en la posición 2 y 3 (calculadas desde el extremo 3'), y la hebra no codificante comprende monómeros de LNA en la posición 2 y 3 (calculadas desde el extremo 3'). Todavía más preferentemente, la hebra codificante comprende al menos dos monómeros de LNA en el extremo 5' y monómeros de LNA en la posición 2 y 3 (calculadas desde el extremo 3'), y la hebra no codificante comprende monómeros de LNA en la posición 2, 3 y 4 (calculadas desde el extremo 3'). Se entenderá que en la realización más preferente, ninguno de los compuestos mencionados anteriormente contiene un monómero de LNA que esté localizado en el extremo 5' de la hebra no codificante.

Tal como se indica anteriormente, cada hebra comprende 12-35 nucleótidos. Se entenderá que estos números se refieren al número total de nucleótidos naturales, variantes y análogos de nucleótidos, monómeros de LNA, etc., de la hebra. Así, el número total de dichos nucleótidos naturales, variantes y análogos de nucleótidos, monómeros de LNA, etc., no será inferior a 12 y no superará los 35. En una realización interesante de la invención, cada hebra comprende 17-25 nucleótidos, como por ejemplo 20-22 ó 20-21 nucleótidos.

Los compuestos de acuerdo con la invención pueden presentar extremos romos y, en una realización particular, el compuesto de siLNA de la invención es un 19-mero con extremos romos. Más preferentemente, sin embargo, al menos una de las hebras tiene una protuberancia en 3'. Habitualmente, la protuberancia en 3' tendrá 1-7 nucleótidos (o variantes o análogos de nucleótidos o monómeros de LNA), preferentemente de 1-3 nucleótidos. Así, se entenderá que la hebra codificante puede contener una protuberancia en 3', la hebra no codificante puede contener una protuberancia en 3', o tanto la hebra codificante como la no codificante pueden contener protuberancias en 3'.

De forma similar, al menos una de las hebras puede tener una protuberancia en 5'. Habitualmente, la protuberancia en 5' tendrá 1-4 nucleótidos (o variantes o análogos de nucleótidos o monómeros de LNA), preferentemente de 1-3 nucleótidos. Así, se entenderá que la hebra codificante puede contener una protuberancia en 5', la hebra no codificante puede contener una protuberancia en 5', o tanto la hebra codificante como la no codificante pueden contener protuberancias en 5'. Evidentemente, la hebra codificante puede contener una protuberancia en 3' y en 5'. De forma alternativa, la hebra no codificante puede contener una protuberancia en 3' y en 5'.

Habitualmente, los compuestos de la invención contendrán otros restos además de monómeros de LNA. Dichos otros restos pueden ser cualquiera de los restos que se describen con respecto a la definición de "nucleótido" anteriormente, e incluyen, por ejemplo, monómeros de RNA naturales, monómeros de DNA naturales así como variantes y análogos de nucleótidos como por ejemplo los que se mencionan con respecto a la definición de "nucleótido" anteriormente. Los ejemplos específicos de dichas variantes y análogos de nucleótidos incluyen, 2'-F, 2'-O-Me, 2'-O-metoxietilo (MOE), 2'-O-(3-aminopropilo) (AP), ácido hexitol nucleico (HNA), ácido 2'-F-arabino nucleico (2'-F-ANA) y D-ciclohexenil nucleósido (CeNA). Además, el enlace internucleosídico puede ser un enlace internucleosídico fosforodiéster, fosforotioato o N3'-P5' fosforoamidato como se describe anteriormente.

En general, las hebras individuales de los compuestos de la invención contendrán al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15% o al menos aproximadamente 20% monómeros de LNA, con respecto al número total de nucleótidos de la hebra. En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención contendrán al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80% o al menos aproximadamente 90% monómeros de LNA, con respecto al número total de nucleótidos de la hebra.

Por lo que respecta a los monómeros de LNA, se entenderá que cualquiera de los monómeros de LNA que se muestran en el Esquema 2 y 3 son útiles para los fines de la presente invención. Sin embargo, actualmente se prefiere que el monómero de LNA esté en la forma beta-D, correspondiente a los monómeros de LNA que se muestran como compuestos 3A, 3C y 3D. El monómero de LNA actualmente más preferente es el monómero que se muestra como

compuesto 3A en el Esquema 3 y 4 anteriormente, es decir el monómero de LNA actualmente más preferente es la forma beta-D de oxi-LNA.

En una realización adicional de la invención, el compuesto de la invención está ligado a uno o más ligandos formando un conjugado. El/los ligando(s) desempeña(n) el papel de aumentar la captación celular del conjugado con respecto al compuesto no conjugado. Esta conjugación puede darse en las posiciones 5'-OH y/o 3'-OH terminales, pero la conjugación también puede darse en las azúcares y/o las nucleobases. De forma particular, el factor de crecimiento con el que puede conjugarse el oligonucleótido no codificante puede comprender transferrina o folato. Pueden prepararse complejos de transferrina-polilisina-oligonucleótido o complejos de folato-polilisina-oligonucleótido para la captación por las células que expresan niveles elevados de receptor de transferrina o folato. Otros ejemplos de conjugados/ligandos son restos de colesterol, intercaladores bicatenarios como por ejemplo acridina, poli-L-lisina, "caperuza terminal" con uno o más grupos de enlaces resistentes a nucleasas como por ejemplo fosforomonotioato, y similares.

La preparación de complejos de transferrina como vehículos de la captación de los oligonucleótidos en las células es descrita por Wagner *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990). La administración celular de conjugados de folato y macromoléculas mediante endocitosis de los receptores de folato, que incluye la administración de un oligonucleótido no codificante, es descrita por Low *et al*., documento US 5,108,921 y por Leamon *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 5572 (1991).

Los compuestos o conjugados de la invención también pueden conjugarse o conjugarse además con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, una sulfamida, un antidiabético, un agente antibacteriano, un agente quimioterapéutico o un antibiótico.

Las nucleobases de RNA naturales son A, C, G y U. El uso de estas en los monómeros de LNA constituirá una modificación mínima. Sin embargo, las bases ^{Me}C (5' metil citosina) y T (timina) se usan convenientemente como monómeros de LNA y también pueden usarse en forma de dúplex de RNA como se muestra en el presente documento (véase la Fig. 16). Se prevé que la naturaleza de las bases que se usan en los extremos del siLNA no afectará significativamente a la función de la molécula de siRNA en tanto en cuanto mantengan su capacidad de hibridarse con bases complementarias si ocupan una posición con bases pareadas en la molécula. Sin embargo, cuando las modificaciones en el LNA se sitúan en posiciones internas del dúplex, por ejemplo en la posición 10 (calculada desde el extremo 5'), debe preverse que la naturaleza de la nucleobase es importante. Así, las bases naturales, C y U, perturbarán el dúplex en menor grado que las modificaciones de las bases T y ^{Me}C. Esto proporciona sutiles posibilidades de diseño. Por ejemplo, si se quiere "bloquear" la hebra codificante en el sitio de escisión, por ejemplo en la posición 10ª, debería usarse T o ^{Me}C (si fueran complementarias), pero si se quiere modificar la hebra no codificante en el sitio de escisión, por ejemplo en la posición 10, debería usarse U o C (si fueran complementarias). Una realización de la invención por lo tanto, debe incluir una nucleobase modificada. Podría conseguirse impedir la nucleobase usando grupos más voluminosos que el metilo, por ejemplo etilo, propilo, fenilo o grupos testigo como biotina. Así, el reconocimiento diferenciado de las nucleobases por el complejo RISC, u otras enzimas proporciona un nivel adicional de oportunidades de diseño para los siRNA modificados con LNA. Por consiguiente, en una realización interesante de la invención, la posición 10 (calculada desde el extremo 5') comprende T o ^{Me}C.

Para permitir una rápida respuesta a los cambios ambientales y a otros, los sistemas biológicos habitualmente se construyen como sistemas dinámicos, es decir como sistemas en los que el estado de equlibrio se mantiene mediante la acción de activadores y desactivadores. Con respecto al complejo RISC, por lo tanto, puede preverse que el complejo activado (es decir el complejo proteínico que contiene el oligonucleótido intacto que cataliza la destrucción de la diana) se somete a una actividad de desactivación, como por ejemplo una actividad de nucleasa que elimina todo o parte del oligonucleótido inactivando así la función del complejo RISC activado. De forma alternativa, la desactivación del complejo RISC simplemente puede determinarse por la velocidad de disociación del oligonucleótido del complejo RISC que, después de la disociación, puede no ser capaz de volver a asociarse.

Por consiguiente, en un aspecto interesante, la presente invención se refiere al uso de los compuestos que se describen en el presente documento para potenciar la vida útil del complejo RISC activo potenciando así la duración de su acción. En una realización de la invención, esto se logra aumentando la resistencia del componente de RNA del complejo RISC a la degradación mediante la putativa actividad de RNAsa, incorporando el LNA y/u otros análogos de ácidos nucleicos y/o mediante modificaciones químicas. En otra realización de la invención, la deseada mejora de la vida del complejo RISC activo se logra disminuyendo la velocidad de disociación del oligonucleótido de RNA del complejo RISC introduciendo LNA y/u otros análogos de ácidos nucleicos y/o mediante modificaciones químicas que aumentan la afinidad del oligonucleótido por las parejas a las que se une en el complejo RISC.

Cuando se diseñan en forma de inhibidor, los siLNA de la invención se unen al ácido nucleico diana y modulan la expresión de su proteína cognada. Preferentemente, dicha modulación produce una inhibición en la expresión de al menos 10% o al menos 20% comparado con el nivel de expresión normal, más preferentemente al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, o al menos 90% de inhibición comparado con el nivel de expresión normal.

Fabricación

Los compuestos de la invención pueden producirse usando las técnicas de polimerización de la química de los ácidos nucleicos, que son notorias para una persona de experiencia ordinaria en la técnica de la química orgánica. Generalmente, pueden usarse ciclos de oligomerización de la la estrategia de fosforamidita (S. L. Beaucage y R. P. Iyer, Tetrahedron, 1993,49, 6123; S. L. Beaucage y R. P. Iyer, Tetrahedron, 1992, 48,2223), pero también pueden usarse otras reacciones químicas, como por ejemplo la química de H-fosfonato o la química de fosfotriéster.

Para algunos monómeros, puede ser necesario un tiempo de acoplamiento mayor y/o acoplamientos repetidos con reactivos nuevos y/o reactivos de acoplamiento más concentrados. Sin embargo, en las manos de los presentes inventores, las fosforamiditas empleadas se acoplaron con un rendimiento de acoplamiento por etapas satisfactorio >97%. La tiolación del fosfato puede realizarse intercambiando la oxidación normal, es decir la oxidación de yodo/piridina/H_2O por un procedimiento de oxidación usando el reactivo de Beaucage (disponible comercialmente). Como será evidente para el experto en la técnica, pueden emplearse otros reactivos de sulfurización.

La purificación de las hebras individuales puede realizarse usando cartuchos de purificación de fase inversa desechables y/o HPLC de fase inversa y/o precipitación con etanol o butanol. Puede usarse electroforesis en gel, HPLC de fase inversa, EM por MALDI, y EM por IES para verificar la pureza de los oligonucleótidos que contienen LNA sintetizados. Además, los materiales de soporte sólido que tienen inmovilizados sobre ellos un LNA con nucleobases protegidas y con 5'-OH protegido son especialmente interesantes para la síntesis de oligonucleótidos que contienen LNA, en los que hay un monómero de LNA incluido en el extremo 3'. Para este fin, el material de soporte sólido es preferentemente CPG o poliestireno sobre el cual se enlaza un un monómero de LNA opcionalmente con una nucleobase protegida y opcionalmente con 5'-OH protegido. El monómero de LNA puede unirse al soporte sólido usando las condiciones descritas por el suministrador para ese material de soporte sólido particular.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento novedoso para la síntesis de los compuestos de la invención, que se caracteriza porque los monómeros individuales, por ejemplo los monómeros de LNA y los monómeros de RNA, se acoplan usando 1H-tetrazol o 5-etiltio-1H-tetrazol. Una realización adicional de este aspecto es que el procedimiento conlleva un tiempo de acoplamiento que está en el intervalo de 200-1200 segundos, como por ejemplo en el intervalo de 400-1200 segundos, preferentemente en el intervalo de 600-900 segundos.

Las dianas a modificar de acuerdo con la presente invención pueden ser dianas implicadas en un número de mecanismos biológicos básicos que incluyen proliferación de glóbulos rojos, proliferación celular, metabolismo iónico, metabolismo de glucosa y energía, regulación del pH y metabolismo de matriz. La invención que se describe en el presente documento engloba un procedimiento de prevenir o tratar cáncer que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de siRNA que modula una diana a un ser humano que necesite dicha terapia.

Tratamiento y composiciones farmacéuticas

Como se ha explicado inicialmente, los compuestos de la invención constituirán fármacos adecuados con propiedades mejoradas. El diseño de un fármaco RNAi potente y seguro requiere el ajuste de diversos parámetros como por ejemplo la afinidad/especificidad, estabilidad en fluidos biológicos, captación celular, modo de acción, propiedades farmacocinéticas y toxicidad.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la invención y un diluyente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Todavía en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un compuesto de acuerdo con la invención para usar como medicamento.

Como se comprenderá, la dosis depende de la gravedad y de la respuesta del estado de enfermedad a tratar, y el ciclo de tratamiento dura de varios días a varios meses, o hasta que se consigue la curación o una disminución del estado de enfermedad. Las pautas de administración óptimas pueden calcularse midiendo la acumulación del fármaco en el cuerpo del paciente. Las dosis óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los siLNA individuales. Generalmente puede estimarse basándose en las CE_{50} que se encuentre que son eficaces *in vitro* y en los modelos animales *in vivo*. En general, la dosis es de 0,01 μg a 1 g por kg de peso corporal, y puede administrarse una o más veces al día, semanalmente, mensualmente o anualmente o incluso una vez cada 2 a 10 años o mediante infusión continua durante de horas hasta varios meses. Las tasas de repetición para la administración pueden estimarse basándose en los tiempos de permanencia y concentraciones del fármaco medidos en fluidos o tejidos corporales. Tras el tratamiento con éxito, puede ser deseable hacer que el paciente se someta a una terapia de mantenimiento para evitar la reaparición del estado de enfermedad.

Composición farmacéutica

Debería entenderse que la invención también se refiere a una composición farmacéutica, que comprende al menos un compuesto de la invención como principio activo. Debería entenderse que la composición farmacéutica de acuerdo con la invención opcionalmente comprende un vehículo farmacéutico, y que la composición farmacéutica opcional-

mente comprende otros compuestos, como por ejemplo compuestos quimioterapéuticos, compuestos antiinflamatorios, compuestos antivirales y/o compuestos inmunomoduladores.

El compuesto oligomérico comprendido en esta invención puede emplearse en una variedad de sales farmacéuticamente aceptables. Tal como se usa en el presente documento, el término se refiere a sales que mantienen la actividad biológica deseada de los compuestos que se identifican en el presente documento y exhiben efectos toxicológicos indeseados mínimos. Los ejemplos no limitantes de dichas sales pueden formarse con sales de adición de aminoácidos orgánicos y de bases que se forman con cationes metálicos como por ejemplo cinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio, sodio, potasio, y similares, o con un catión formado por amoniaco, N,N-dibenciletilen-diamina, D-glucosamina, tetraetilamonio, o etilendiamina.

En una realización de la invención el compuesto oligomérico o conjugado puede estar en forma de profármaco. Los oligonucleótidos son por su propia naturaleza iones con carga negativa. Debido a la naturaleza lipófila de las membranas celulares, la captación celular de oligonucleótidos es reducida comparada con los equivalentes neutros o lipófilos. Este "impedimento" de la polaridad puede evitarse usando la estrategia de los profármacos (véase por ejemplo Crooke, R. M. (1998) en Crooke, S. T. Antisense research and Application. Springer-Verlag, Berlín, Alemania, vol. 131, páginas 103-140). En esta estrategia, los oligonucleótidos se preparan de forma protegida de forma que el oligo sea neutro cuando se administra. Estos grupos de protección se diseñan de tal forma que puedan eliminarse cuando el oligo es captado por las células. Los ejemplos de dichos grupos de protección son S-acetiltioetilo (SATE) o S-pivaloiltioetilo (t-butil-SATE). Estos grupos de protección son resistentes a nucleasas y se eliminan de forma selectiva intracelularmente.

Los agentes de enlace y adyuvantes farmacéuticamente aceptables pueden formar parte del fármaco formulado. Las cápsulas, comprimidos y píldoras, etc. pueden contener por ejemplo los siguientes compuestos: celulosa microcristalina, goma o gelatina como aglutinantes; almidón o lactosa como excipientes; estearatos como lubricantes; diversos agentes edulcorantes o aromatizantes. Para las cápsulas, la monodosis puede contener un vehículo líquido como aceites grasos. Del mismo modo, los recubrimientos de azúcar o agentes entéricos pueden ser parte de la monodosis. Las formulaciones de oligonucleótidos también pueden ser emulsiones de los principios farmacéuticos activos y un lípido que forme una emulsión de micelas. Un compuesto de la invención puede mezclarse con cualquier material que no impida la acción deseada, o con un material que suplemente la acción deseada. Estos podrían incluir otros fármacos que incluyen otros compuestos nucleotídicos. Para la administración parenteral, subcutánea, intradérmica o tópica, la formulación puede incluir un diluyente estéril, tampones reguladores de la tonicidad y antibacterianos. El compuesto activo puede prepararse con vehículos que protejan contra la degradación o la eliminación inmediata del cuerpo, que incluyen implantes o microcápsulas con propiedades de liberación controladas. Para la administración intravenosa los vehículos preferidos son solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato.

Preferiblemente, un compuesto oligomérico está incluido en una formulación unitaria como por ejemplo en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz sin provocar efectos secundarios graves al paciente tratado.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de numerosas formas dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área a tratar. La administración puede ser (a) oral (b) pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo un nebulizador; intratraqueal, intranasal, (c) tópica que incluye epidérmica, transdérmica, oftálmica y a las membranas mucosas que incluyen administración vaginal y rectal; o (d) parenteral que incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o intraventricular. En una realización, la composición farmacéutica se administra por vía IV, IP, oral, tópica o en forma de inyección embolada o se administra directamente al órgano diana. Las composiciones farmacéuticas y formulaciones para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, pulverizadores, supositorios, líquidos y polvos. Pueden ser deseables o necesarios los vehículos farmacéuticos convencionales, las bases acuosas, en polvo u oleosas, los espesantes y similares. También pueden ser útiles condones y guantes recubiertos, y similares. Las formulaciones incluyen aquellas en las que los compuestos de la invención están mezclados con un agente de administración tópica como por ejemplo lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Las composiciones y formulaciones para la administración oral incluyen, pero sin restricción, polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o en medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobrecitos, comprimidos o minicomprimidos. Las composiciones y formulaciones para la administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados como por ejemplo, pero sin limitación, potenciadores de la penetración, compuestos transportadores y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero sin limitación, soluciones, emulsiones, y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una variedad de componentes que incluyen, pero sin limitación, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes. La administración de un fármaco al tejido tumoral puede potenciarse mediante la administración mediada por vehículos que incluyen, pero sin limitación, liposomas catiónicos, ciclodextrinas, derivados de porfirina, dendrímeros de cadena ramificada, polímeros de polietilenimina, nanopartículas y microesferas (Dass CR. J Pharm Pharmacol 2002; 54(1):3-27). Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse convenientemente en forma monodosis, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales notorias en la industria farmacéutica.

Dichas técnicas incluyen la etapa de asociar los principios activos con el vehículo(s) o excipiente(s) farmacéutico(s). En general las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima los principios activos con los vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente fraccionados o ambos; y después, si fuera necesario, dando forma al producto. Las composiciones de la presente invención pueden formularse en cualquiera de las muchas formas farmacéuticas posibles como por ejemplo, pero sin limitación, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos y supositorios. Las composiciones de la presente invención también pueden formularse en forma de suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes. Los compuestos de la invención también pueden conjugarse con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, una sulfamida, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

En otra realización, las composiciones de la invención pueden contener uno o más compuestos de siLNA, dirigidos contra un primer ácido nucleico y uno o más compuestos de siLNA adicionales dirigidos contra un segundo ácido nucleico diana. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o de forma secuencial.

Los compuestos que se describen en el presente documento son útiles para un número de aplicaciones terapéuticas como se indica anteriormente. En general, los procedimientos terapéuticos de la invención incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un siLNA a un mamífero, particularmente un ser humano. En una cierta realización, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen (a) uno o más compuestos de la invención y (b) otro u otros agentes quimioterapéuticos. Cuando se usan con los compuestos de la invención, dichos agentes quimioterapéuticos pueden usarse de forma individual, secuencial, o combinados con otro u otros agentes quimioterapéuticos de ese tipo o combinados con radioterapia. Todos los agentes quimioterapéuticos conocidos por una persona experta en la técnica se incorporan aquí como tratamientos combinados con compuestos de acuerdo con la invención. Otros agentes activos, como por ejemplo los fármacos antiinflamatorios, que incluyen pero sin limitación fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, fármacos antivirales y fármacos inmunomoduladores también pueden combinarse en composiciones de la invención. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o de forma secuencial.

Cáncer

Todavía en otro aspecto más, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer. En otro aspecto la presente invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento, o la profilaxis del cáncer, comprendiendo dicho procedimiento administrar un compuesto de la invención o una composición farmacéutica de la invención a un paciente que lo necesite.

Dichos cánceres pueden incluir neoplasia linforreticular, leucemia linfoblástica, tumores cerebrales, tumores gástricos, plasmacitomas, mieloma múltiple, leucemia, tumores del tejido conectivo, linfomas y tumores sólidos.

En el uso de un compuesto de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, dicho cáncer de forma adecuada puede estar en forma de un tumor sólido. De forma análoga, en el procedimiento para tratar cáncer que se describe en el presente documento dicho cáncer puede, de forma adecuada, estar en forma de un tumor sólido.

Además, dicho cáncer de forma adecuada también es un carcinoma. El carcinoma habitualmente se selecciona a partir del grupo constituido por melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de ovarios, carcinoma de mama, cáncer de pulmón amicrocítico, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga, carcinoma de vejiga superficial recurrente, carcinoma de estómago, carcinoma de próstata, carcinoma pancreático, carcinoma de pulmón, carcinoma de cuello de útero, displasia de cuello de útero, papilomatosis laringea, carcinoma de colon, carcinoma colorrectal y tumores carcinoides. Más habitualmente, dicho carcinoma se selecciona a partir del grupo constituido por melanoma maligno, cáncer de pulmón amicrocítico, carcinoma de mama, carcinoma de colon y carcinoma de células renales. El melanoma maligno habitualmente se selecciona a partir del grupo constituido por melanoma de extensión superficial, melanoma nodular, melanoma lentiginoso maligno, melagnoma acral, melanoma amelanótico y melanoma desmoplástico.

De forma alternativa, el cáncer de forma adecuada puede ser un sarcoma. El sarcoma habitualmente está en la forma que se selecciona a partir del grupo constituido por osteosarcoma, sarcoma de Ewing, condrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, fibrosarcoma y sarcoma de Kaposi.

De forma alternativa, el cáncer de forma adecuada puede ser un glioma.

Una realización adicional se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, en el que dicho medicamento además comprende un agente quimioterapéutico que se selecciona a partir del grupo constituido por adrenocorticosteroides, como por ejemplo prednisona, dexametasona o decadron; altretamina (hexalen, hexametilmelamina (HMM)); amifostina (etiol); aminoglutetimida (cytadren); amsacrina (M-AMSA); anastrozol (arimidax); andrógenos, como por ejemplo testosterona; asparraginasa (eispar); calmete-gurina de bacilo; bicalutamida (casodex); bleomicina (blenoxano); busulfán (mileran); carboplatina (paraplatina); carmustina (BCNU, BICNU); clorambucilo (leukeran); clorodesoxiadenosina (2-CDA, cladribina, leus-

tatina); cisplatina (platinol); citosina arabinosida (citarabina); dacarbazina (DTIC); dactinomicina (actinomicina-D, cosmegen); daunorrubicina (cerubidina); docetaxel (taxotere); doxorrubicina (adriomicina); epirrubicina; estramustina (emcyt); estrógenos, como por ejemplo dietilstilbestrol (DES); etopósida (VP-16, VePesid, etopofos); fludarabina (fludara); flutamida (eulexin); 5-FUDR (floxuridina); 5-fluorouracilo (5-FU); gemcitabina (gemzar); goserelina (zodalex); herceptina (trastuzumab); hidroxiurea (hidrea); idarrubicina (idamicina); ifosfamida; IL-2 (proleucina, aldesleucina); interferón alfa (intrón A, roferón A); irinotecán (camptosar); leuprolida (lupron); levamisol (ergamisol); lomustina (CCNU); mecloratamina (mustargen, mostaza nitrogenada); melfalán (alkeran); mercaptopurina (purinetol, 6-MP); metotrexato (mexato); mitomicina-C (mutamucina); mitoxantrona (novantrona); octreótida (sandostatina); pentostatina (2-desoxicoformicina, nipent); plicamicina (mitramicina, mitracina); prorocarbazina (matulano); estreptozocina; tamoxifina (nolvadex); taxol (paclitaxel); tenipósida (vumon, VM-26); tiotepa; topotecán (hicamtina); tretinoina (vesanoid, ácido holo-trans retinoico); vinblastina (valban); vincristina (Oncovina) y vinorelbina (navelbina). De forma adecuada, el agente quimioterapéutico adicional se selecciona a partir de taxanos como por ejemplo Taxol, Paclitaxel o Docetaxel.

De forma similar, la invención se refiere además al uso de un compuesto de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, en el que dicho tratamiento además comprende la administración de otro agente quimioterapéutico que se selecciona a partir del grupo constituido por adrenocorticosteroides, como por ejemplo prednisona, dexametasona o decadron; altretamina (hexalen, hexametilmelamina (HMM)); amifostina (etiol); aminoglutetimida (cytadren); amsacrina (M-AMSA); anastrozol (arimidax); andrógenos, como por ejemplo testosterona; asparraginasa (elspar); calmete-gurina de bacilo; bicalutamida (casodex); bleomicina (blenoxano); busulfán (mileran); carboplatina (paraplatina); carmustina (BCNU, BICNU); clorambucilo (leukeran); clorodesoxiadenosina (2-CDA, cladribina, leustatina); cisplatina (platinol); citosina arabinosida (citarabina); dacarbazina (DTIC); dactinomicina (actinomicina-D, cosmegen); daunorrubicina (cerubidina); docetaxel (taxotere); doxorrubicina (adriomicina); epirrubicina; estramustina (emcyt); estrógenos, como por ejemplo dietilstilbestrol (DES); etopósida (VP-16, VePesid, etopofos); fludarabina (fludara); flutamida (eulexin); 5-FUDR (floxuridina); 5-fluorouracilo (5-FU); gemcitabina (gemzar); goserelina (zodalex); herceptina (trastuzumab); hidroxiurea (hidrea); idarrubicina (idamicina); ifosfamida; IL-2 (proleucina, aldesleucina); interferón alfa (intrón A, roferón A); irinotecán (camptosar); leuprolida (lupron); levamisol (ergamisol); lomustina (CCNU); mecloratamina (mustargen, mostaza nitrogenada); melfalán (alkeran); mercaptopurina (purinetol, 6-MP); metotrexato (mexato); mitomicina-C (mutamucina); mitoxantrona (novantrona); octreótida (sandostatina); pentostatina (2-desoxicoformicina, nipent); plicamicina (mitramicina, mitracina); prorocarbazina (matulano); estreptozocina; tamoxifina (nolvadex); taxol (paclitaxel); tenipósida (vumon, VM-26); tiotepa; topotecán (hicamtina); tretinoina (vesanoid, ácido holo-trans retinoico); vinblastina (valban); vincristina (Oncovina) y vinorelbina (navelbina). De forma adecuada, dicho tratamiento comprende además la administración de un agente quimioterapéutico adicional que se selecciona a partir de taxanos, como por ejemplo Taxol, Paclitaxel o Docetaxel.

Explicado de forma alternativa, el compuesto de la invención o la composición farmacéutica de la invención pueden usarse en un procedimiento para tratar cáncer, comprendiendo dicho procedimiento administrar un compuesto de la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención a un paciente que lo necesite y que además comprende la administración de un agente quimioterapéutico adicional. Dicha administración adicional puede ser tal que el agente quimioterapéutico adicional esté conjugado con el compuesto de la invención, esté presente en la composición farmacéutica, o se administre en una formulación separada.

Enfermedades infecciosas

En una realización interesante particular de la invención, los compuestos de siLNA de acuerdo con la invención se usan para dirigirlos contra el síndrome respiratorio agudo grave (SARS), que apareció primero en China en noviembre de 2002. De acuerdo con la OMS, más de 8.000 personas han sido infectadas en todo el mundo, provocando más de 900 muertes. Un coronavirus anteriormente desconocido ha sido identificado como agente causal de la epidemia de SARS (Drosten C *et al*. N Engl J Med 2003, 348, 1967-76; y Fouchier RA *et al*. Nature 2003, 423, 240). La identificación del SARS-CoV vino seguida de una rápida secuenciación del genoma vírico de múltiples cepas aisladas (Ruan *et al*. Lancet 2003, 361, 1779-85; Rota PA *et al*. Science 2003, 300, 1394-9; y Marra MA *et al*. Science 2003, 300, 399-404). Esta información sobre la secuencia inmediatamente posibilitó el desarrollo de antivirales contra SARS mediante técnicas de inactivación basadas en ácidos nucleicos como por ejemplo siRNA. La secuencia de nucleótidos que codifica la RNA polimerasa (Pol) dependiente de RNA del SARS-CoV está muy conservada en toda la familia de coronavirus. El producto génico de Pol se traduce desde el RNA genómico como parte de una poliproteína, y usa el RNA genómico como plantilla para sintetizar RNA de hebra no codificante y posteriormente mRNA subgenómico. La proteína Pol por lo tanto se expresa temprano en el ciclo vital vírico y es crucial para la replicación vírica (véase la Fig. 10).

Por consiguiente, en otro aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de síndrome respiratorio agudo grave (SARS), así como a un procedimiento para tratar síndrome respiratorio agudo grave (SARS), comprendiendo dicho procedimiento administrar un compuesto de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención a un paciente que lo necesite.

Se contempla que los compuestos de la invención pueden tener una amplia aplicación en un amplio abanico de enfermedades infecciosas, como por ejemplo difteria, tétanos, tos ferina, polio, hepatitis B, *Haemophilus influenza*, sarampión, paperas y rubéola.

Por consiguiente, todavía en otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad infecciosa, así como a un procedimiento para tratar una enfermedad infecciosa, comprendiendo dicho procedimiento administrar un compuesto de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención a un paciente que lo necesite.

Enfermedades inflamatorias

La respuesta inflamatoria es un mecanismo esencial de defensa del organismo contra el ataque de agentes infecciosos, y también está implicada en la patogénesis de muchas enfermedades agudas y crónicas, que incluyen trastornos autoinmunitarios. A pesar de ser necesaria para luchar contra los patógenos, los efectos de un brote inflamatorio pueden ser devastadores. Por lo tanto, a menudo es necesario restringir la sintomatología de la inflamación usando fármacos antiinflamatorios. La inflamación es un procedimiento complejo normalmente desencadenado por lesiones tisulares que incluye la activación de una gran variedad de enzimas, el aumento de la permeabilidad vascular y la extravasación de fluidos corporales, migración celular y liberación de mediadores químicos, todos con la finalidad de destruir y reparar el tejido lesionado.

Todavía en otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, así como a un procedimiento para tratar una enfermedad inflamatoria, comprendiendo dicho procedimiento administrar un compuesto de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención a un paciente que lo necesite.

En una realización preferente de la invención, la enfermedad inflamatoria es una enfermedad reumática y/o una enfermedad de los tejidos conjuntivos, como por ejemplo artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (SLE) o lupus, esclerodermia, polimiositis, enfermedad inflamatorios del intestino, dermatomiositis, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, vasculitis, artritis soriásica, dermatitis soriásica exfoliante, pénfigo vulgar y síndrome de Sjorgren, en particular enfermedad inflamatoria del intestino y enfermedad de Crohn.

De forma alternativa, la enfermedad inflamatoria puede ser una inflamación no reumática, como bursitis, sinovitis, capsulitis, tendinitis y/u otras lesiones inflamatorias de origen traumático o deportivo.

Otros usos

Los compuestos de siRNA de la presente invención también pueden utilizarse como reactivos de investigación para el diagnóstico, terapia y profilaxis. En la investigación, los siRNA pueden usarse para inhibir específicamente la síntesis de los genes diana en las células y en los animales experimentales facilitando así el análisis funcional de la diana o la valoración de su utilidad como diana para la intervención terapéutica. En el diagnóstico, los siRNA pueden usarse para detectar y cuantificar la expresión de la diana en las células y tejidos mediante transferencia Northern, hibridación *in situ* o técnicas similares. Para la terapia, un animal o un ser humano, que se sospeche que tiene una enfermedad o trastorno, que puede tratarse modulando la expresión de diana se trata mediante la administración de compuestos de siRNA de acuerdo con esta invención. Además se proporcionan procedimientos de tratar a un animal en particular ratones y ratas y tratar a un ser humano, que se sospecha que tiene o que tiene predisposición a una enfermedad o afección, asociada a la expresión de la diana mediante la administración una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más de los compuestos o composiciones de siRNA de la invención.

La invención se ilustra adicionalmente de forma no limitante mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Abreviaturas

DMT: Dimetoxitritilo

DCI: 4,5-Dicianoimidazol

DMAP: 4-Dimetilaminopiridina

DCM: Diclorometano

DMF: Dimetilformamida

THF: Tetrahidrofurano

DIEA: N,N -diisopropiletilamina

PyBOP: Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio

Bz: Benzoílo

Ibu: Isobutirilo

Beaucage: 1,1-dióxido de 3H-1,2-Benzoditiol-3-ona

GL3+: 5'-cuuacgcugaguacuucga$_d$t$_d$t-3',

GL3-: 5'-ucgaaguacucagcguaag$_d$t$_d$t-3'

NPY+: 5'-ugagagaaagcacagaaaa$_d$t$_d$t-3'

NPY-: 5'-uuuucugugcuuucucuca$_d$t$_d$t-3'

RL+: 5'-aucugaagaaggagaaaaa$_d$t$_d$t-3'

RL-: 5'-uuuuucuccuucuucagau$_d$t$_d$t-3'

Minúsculas sin prefijo: monómero de RNA

Minúsculas con prefijo "d": monómero de DNA

Ejemplo 1

Síntesis de monómeros

La preparación de monómeros de LNA se describe con gran detalle en las referencias Koshkin *et al*., J. Org. Chem., 2001, 66, 8504-8512, y Pedersen *et al*., Synthesis, 2002, 6, 802-809 así como en las referencias que se citan en ellos. Cuando los grupos protectores Z y Z* eran oxi-N,N-diisopropil-O-(2-cianoetil)fosforamidita y dimetoxitritiloxi, dichos compuestos se sintetizaron tal como se describe en el documento WO 03/095467; Pedersen *et al*., Synthesis 6, 802-808, 2002; Sørensen *et al*., J. Am. Chem. Soc., 124, 2164-2176, 2002; Singh *et al*., J. Org. Chem. 63, 6078-6079, 1998; y Rosenbohm *et al*., Org. Biomol. Chem. 1, 655-663, 2003. Todos los monómeros que contienen citosina se sustituyeron por monómeros de 5-metil-citosina para todos los acoplamientos. Todos los monómeros de LNA que se usaron fueron beta-D-oxi LNA (compuesto 3A).

Ejemplo 2

Síntesis de oligonucleótidos

Todas las síntesis se realizaron a escala de 1 μmol en una plataforma MOSS Expedite instrument. Los procedimientos de síntesis se realizaron esencialmente como se describe en el manual del aparato.

Preparación del hemiéster succinílico de LNA

Se disolvieron monómero de 5'-O-DMT-3'-hidroxi-LNA (500 mg), anhídrido succínico (1,2 eq.) y DMAP (1,2 eq.) en DCM (35 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. Después de la extracción con NaH_2PO_4, 0,1 M, pH 5,5 (2x), y salmuera (1x), la fase orgánica se secó además con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó. Se obtuvo el derivado hemiéster con un rendimiento del 95% y se usó sin purificación adicional.

Preparación de LNA-CPG (Vidrio poroso controlado)

El derivado hemiéster preparado anteriormente (90 μmol) se disolvió en una cantidad mínima de DMF. Se añadieron DIEA y piBOP (90 μmol) y se mezclaron durante 1 min. Esta mezcla preactivada se combinó con LCAA-CPG (500 Å, tamaño de malla de 80-120, 300 mg) en un sintetizador manual y se agitó. Después de 1,5 h agitando a temperatura ambiente, el soporte se eliminó por filtración y se lavó con DMF, DCM y MeOH. Después de secar, se determinó que la carga era de 57 μmol/g (véase Tom Brown, Dorcas J.S.Brown, Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis. En: F.Eckstein, editor. Oligonucleotides and Analogues A Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1991: 13-14).

Ciclos de fosforotioato

5'-O-DMT (A(bz), C(bz), G(ibu) o T) ligados a CPG se desprotegieron usando una solución de ácido tricloroacético al 3% (v/v) en diclorometano. El CPG se lavó con acetonitrilo. Se realizó el acoplamiento de fosforamiditas (A(bz), G(ibu), 5-metil-C(bz)) o T-β-cianoetil-fosforamidita) usando una solución 0,08 M de la amidita protegida con 5'-O-DMT en acetonitrilo y la activación se realizó usando DCI (4,5-dicianoimidazol) en acetonitrilo (0,25 M). La reacción de acoplamiento se realizó durante 2 min. La tiolación se realizó usando reactivo de Beaucage (0,05 M en acetonitrilo) y se dejó reaccionar durante 3 min. El soporte se lavó cuidadosamente con acetonitrilo y la posterior adición de la caperuza se realizó usando soluciones estándar (CAP A) y (CAP B) para añadir la caperuza a los grupos hidroxilo sin reaccionar en 5'. La etapa de adición de la caperuza se repitió después y el ciclo se terminó lavando con acetonitrilo.

Ciclos de unidades de LNA

5'-O-DMT (A(bz), C(bz), G(ibu) o T) ligado a CPG se desprotegió usando el mismo procedimiento que se describe anteriormente. El acoplamiento se realizó usando 5'-O-DMT-A(bz), C(bz), G(ibu) o T-β-cianoetilfosforamidita (0,1 M en acetonitrilo) y la activación se logró mediante DCI (0,25 M en acetonitrilo). La reacción de acoplamiento se realizó durante 7 min. La adición de la caperuza se realizó usando soluciones estándar (CAP A) y (CAP B) durante 30 s. El triéster de fosfito se oxidó al triéster de fosfato más estable usando una solución estándar de I_2 y piridina en THF durante 30 s. El soporte se lavó con acetonitrilo y se repitió la etapa de adición de la caperuza. El ciclo concluyó con un lavado cuidadoso con acetonitrilo.

Escisión y Desprotección

Los oligonucleótidos se escindieron del soporte y el grupo protector de β-cianoetilo se eliminó tratando el soporte con 35% de NH_4OH durante 1 h a temperatura ambiente. El soporte se eliminó mediante filtración y los grupos protectores básicos se eliminaron elevando la temperatura a 65ºC durante 4 horas. Después el amoníaco se eliminó por evaporación.

Purificación

Los oligos se purificaron o bien mediante HPLC de fase inversa (RP-HPLC) o mediante cromatografía de intercambio aniónico (AIE):

RP-HPLC:

Columna: VYDAC™, n.º de cat. 218TP1010 (vydac)

RP-HPLC:

Caudal: 3 ml/min

Tampón: A (acetato de amonio 0,1 M, a pH 7,6)

B (acetonitrilo)

Gradiente:

Tiempo	0	10	18	22	23	28
B% 0	5	30	100	100	0	

A/E:

Columna: Resource™ 15Q (Amersham Pharmacia Biotech)

Caudal: 1,2 ml/min

Tampón: A (0,1 M NaOH)

B (0,1 M NaOH, 2,0 M NaCl)

Gradiente:

Tiempo	0	1	27	28	32	33
B% 0	25	55	100	100	0	

Medición de T_f

Las curvas de fusión se registraron en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS lambda 40 en línea con un sistema PTP-6 Peltier. Los oligonucleótidos se disolvieron en tampón salino (tampón fosfato 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM, a pH 7,0) a una concentración de 1,5 μM y usando cubetas de 1 cm de longitud de recorrido. Las muestras se desnaturalizaron a 95ºC durante 3 min y lentamente se enfriaron 20ºC antes de las mediciones. Las curvas de fusión se registraron a 260 nm usando a velocidad de calentamiento de 1ºC/min, una ventana de 2 nm y una respuesta de 0,2 s. Los valores de T_f se obtuvieron del máximo del primer derivado de las curvas de fusión.

Ejemplo 3

Síntesis de oligonucleótidos de LNA/RNA

Síntesis

Los oligonucleótidos de LNA/RNA se sintetizaron sin DMT a una escala de 1,0 μmol usando un sintetizador de ácidos nucleicos automatizados (MOSS Expedite 8909) y usando reactivos estándar. Se usaron 1H-tetrazol o 5-etiltio-1H-tetrazol como activadores. La concentración de LNA A^{Bz}, G^{IBu} y T fosforamidita era de 0,1 M en acetonitrilo anhidro. El $^{Me}C^{Bz}$ se disolvió en 15% de THF en acetonitrilo. El tiempo de acoplamiento para todos los acoplamientos de monómeros fue de 600 s. Las RNA fosforamiditas (Glen Research, Sterling, Virginia) estaban protegidas con N-acetilo y 2'-O-triisopropilsililoximetilo (TOM). La concentración de monómero era de 0,1 M (acetonitrilo anhidro) y el tiempo de acoplamiento era de 900 s. El tiempo de oxidación se fijó en 50 s. El soporte sólido era DMT-LNA-CPG (1000Å, 30-40 μmol/g).

Tratamiento y purificación

La escisión de la resina y la desprotección de la nucleobase/fosfato se realizó en un tubo estéril mediante tratamiento con 1,5 ml de una solución de metilamina (1:1, 33% de metilamina en etanol: 40% de metilamina en agua) a 35ºC durante 6 h o se dejó hasta la mañana siguiente. El tubo se centrifugó y la solución de metilamina se transfirió a un segundo tubo estéril. La solución de metilamina se evaporó en una centrifugadora a vacío. Para eliminar los grupos protectores de 2'-O, el resto se disolvió en 1,0 ml de TBAF 1,0 M en THF y se calentó a 55ºC durante 15 min. y se dejó a 35ºC hasta la mañana siguiente. El THF se evaporó en una centrifugadora a vacío dejando una goma amarillo claro, que se neutralizó con aprox. 600 μl (volumen total de la muestra: 1,0 ml) de Tris-tampón 1,0 M sin RNasas (pH 7). La mezcla se homogeneizó agitando y calentando a 65ºC durante 3 min. La desalación de los oligonucleótidos se realizó en columnas NAP-10 (Amersham Biosciences, véase más adelante). El filtrado de la etapa 4 (véase más adelante) se recogió y se analizó mediante MALDI-TOF y electroforesis en gel (gel de secuenciación de acrilamida al 16% (1 mm), 0,9% de tampón de TBE [Tris: 89 mM, ácido bórico: 89 mM, EDTA: 2 mM, pH 8,3], durante 2 h a 20 W como parámetro limitante. El gel se tiñó con CyberGold (Molecular Probes, 1:10000 en 0,9xTBE) durante 30 min seguido de escaneado en un Bio-Rad FX Imager). La concentración del oligonucleótido se midió mediante espectrometría UV a 260 nm.

Esquema A, *Desalación en columnas NAP-10*:

Etapa	Reactivo	Operación	Volumen	Comentarios
1	-	Tampón de almacenamiento vacío	-	Desechar
2	H_2O (sin RNasas)	Lavar	2 x volumen completo	Desechar
3	Oligo en tampón (sin RNasas)	Cargar	1,0 ml	Desechar
4	H_2O (sin RNasas)	Elución	1,5 ml	Recoger - contiene oligo
5	H_2O (sin RNasas)	"Elución"	0,5 ml	Recoger - contiene sal + pequeña cantidad de oligo

Como apreciará el experto, los temas más importantes en la síntesis de los oligos de LNA/RNA con respecto a los procedimientos estándar son que i) son necesarios tiempos de acoplamiento mayores para lograr una buena eficacia de acoplamiento, y ii) el tiempo de oxidación tiene que ser mayor para minimizar la formación de fragmentos con deleciones. Además, el acoplamiento de fosforamiditas protegidas a 2'-O-TOM fue mejor que a 2'-O-TBDMS. Tomando esto en cuenta, los oligonucleótidos en bruto fueron de una calidad tal que pudo evitarse la purificación posterior. Debería realizarse un análisis de EM después de eliminar los grupos TOM.

Ejemplo 4

Estabilidad mejorada de siLNA con respecto a siRNA

La estabilidad mejorada de siLNA con respecto a siRNA se muestra en la Fig. 2. Tanto loa siRNA con pocas modificaciones como los que tenían más mostraron una estabilidad mejorada. La estabilidad se evaluó en suero bovino fetal al 10% diluido en una solución salina fisiológica. Los siRNA y siLNA se incubaron en el suero a 37ºC. Se extrajeron muestras a diferentes tiempos y se analizaron en geles de TBE de poliacrilamida al 15% y se tiñeron con SYBR-oro (Molecular probes). Las bandas se cuantificaron y se representaron en una gráfica. Para el compuesto de siRNA no modificado, puede observarse una acumulación de una banda intermedia (entre dsRNA y ssRNA) que ha sido identificada como un 19-mero bicatenario, es decir siRNA con protuberancias en 3' degradadas. Esto no se observó para los siLNA correspondientes.

Ejemplo 5

Prueba de diseño de siLNA en un sistema con testigo de mamífero

Primero se evaluó la eficacia de diferentes diseños y combinaciones de siLNA en un sistema con testigo de luciferasa en un cultivo celular de mamífero. Los oligonucleótidos que se usaron se muestran en la Tabla 1. Los oligonucleótidos codificantes y los no codificantes correspondientes se hibridaron generando hebras bicatenarias, es decir siRNA o siLNA.

Las células que se usaron eran las líneas celulares de riñón embrionario humanas (HEK) 293. Las células HEK 293 se mantuvieron en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina, estreptomicina y glutamina (Invitrogen, Paisely, Reino Unido). Los plásmidos que se usaron fueron pGL3-Control que codificaba la luciferasa de luciérnaga controlada por el promotor y el potenciador de SV40 y pRL-TK que codificaba la luciferasa de Renilla controlada por el promotor de HSV-TK (Promega, Madison, WI, Estados Unidos).

Transfección

Un día antes de la transfección, las células se sembraron 500 μl de medio en placas de 24 pocillos para que se adhirieran y alcanzaran una confluencia de 70 a 90% en el momento de la transfección. Las células se sembraron en el medio sin antibióticos y se cambiaron a 500 μl de Opti-MEM I justo antes de añadir la mezcla de transfección a las células. Se preparó una mezcla estándar de cotransfección para pocillos triplicados añadiendo por separado 510 ng de pGL3-Control, 51 ng de pRL-TK y 340 ng de siRNA a 150 μl de Opti-MEM I (Invitrogen) y 3 μl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) a otros 150 μl de Opti-MEM I. Las dos soluciones se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 20-30 minutos antes de añadir a las células. Se añadieron 100 μl de la mezcla de transfección a cada uno de los tres pocillos. El volumen final del medio más la mezcla de transfección fue de 600 μl. La concentración de siLNA o siRNA correspondió a aproximadamente 13 nM. Las células se incubaron con la mezcla de transfección durante 4 horas y después el medio se sustituyó por DMEM con suplemento total.

Ensayo dual con testigo de luciferasa (Promega)

Las células se recogieron en tampón de lisis pasiva y se ensayaron de acuerdo con el protocolo (Promega) usando un luminómetro con formato de 96 pocillos de NovoSTAR con dispensador de sustrato (BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania). Se aplicaron 10 μl de muestra a cada pocillo de una placa de 96 pocillos y el luminómetro añadió 50 μl de reactivo Luciferase Assay II (sustrato para la luciferasa de luciérnaga) a un pocillo y se cuantificó. Después, se añadieron 50 μl de Stop and Glow (solución de terminación para la luciferasa de luciérnaga y sustrato para la luciferasa de Renilla) y se cuantificó. Se usó la media de las actividades de luciferasa medidas durante 10 s. para calcular las proporciones entre la luciferasa de luciérnaga y Renilla o al revés.

Ejemplo 6

Modelo <u>in vitro</u>; evaluación de la eficacia en una diana endógena

Las células que se usaron eran feocromocitomas suprarrenanes de rata, líneas celulares PC12. Las PC12 se mantuvieron en DMEM suplementado con suero de caballo al 10%, suero bovino fetal al 5%, penicilina, estreptomicina y glutamina. El protocolo de transfección con SiLNA o siRNA contra genes endógenos (como NPY en las células PC12) sigue el mismo procedimiento que se describe anteriormente pero sin los plásmidos de luciferasa y sólo añadiendo siRNA contra NPY (dado que el gen NPY se expresa de forma endógena en las células PC12). Las concentraciones finales de luciferasa variaban de 1 a 100 nM. Las células habitualmente se recogían de 24 a 48 horas después de la transfección y se extraía el mRNA. Los niveles de mRNA se cuantificaban con PCR en tiempo real. La regulación por disminución del NPY diana en PC12 se muestra en la Fig. 3.

Ejemplo 7

Modelo in vitro: Análisis de la inhibición de la diana

Expresión mediante PCR en tiempo real

La silenciación génica de una diana mediante SiLNA o siRNA puede evaluarse de una variedad de formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden cuantificarse los niveles de RNAm de la diana, por ejemplo, por análisis mediante transferencia Northern, reacción en cadena de la polimerasa competitiva (PCR), o PCR en tiempo real. Actualmente se prefiere la PCR cuantitativa en tiempo real. El análisis por RNA puede realizarse sobre el RNA o RNAm celular total. Los procedimientos de aislamiento del RNA y de análisis del RNA, como por ejemplo análisis por transferencia Northern, son rutinarios en la técnica y se enseñan, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons.

Las células se recolectaron y se extrajo el mRNA. Se usaron protocolos de PCR en tiempo real para amplificar los genes diana de mRNA con cebadores génicos específicos junto con un par cebador de un gen doméstico como control interno (como por ejemplo ciclofilina). La regulación por disminución se expresó en términos de proporción de la cantidad de mRNA diana y la cantidad de mRNA de control. La PCR cuantitativa en tiempo real puede realizarse convenientemente usando el sistema iQ Multi-Color Real Time PCR Detection System de BioRAD disponible comercialmente.

Ejemplo 8

Análisis in vitro: Inhibición mediante siRNA de la expresión de la diana testigo mediante oligonucleótidos de siLNA

Los monómeros de LNA podrían usarse para modificar ambos extremos de la hebra codificante de siRNA con un efecto mantenido con respecto a siRNA (>90% de inhibición de la expresión de la luciferasa de luciérnaga con respecto a las muestras sin tratar). La hebra no codificante también podría modificarse en el extremo 3' sin pérdida de eficacia mientras que una modificación en el extremo 5' de la hebra no codificante reducía el efecto a una inhibición del 25-50%. Al sustituir todos los restos que contienen uracilo por timinas en LNA en la hebra codificante se reduciría el efecto a una inhibición del 80%. Una modificación similar en la hebra no codificante anulaba el efecto (Fig. 4). La fosforilación del extremo 5' de la hebra no codificante del siLNA no mejoró la reducción (20-30% de reducción, no se muestran datos). Experimentos similares dirigidos contra la luciferasa de Renilla mostraron que podían modificarse ambos extremos de la hebra codificante con monómeros de LNA, mientras que la hebra no codificante tolera la modificación con monómeros de LNA en el extremo 3' (95% de inhibición en todos los casos), pero mostró menos inhibición con una modificación con LNA en los extremos 3' y 5'. Aún así, se observó una inhibición del 75% (Fig. 5). Se midió la estabilidad de LNA/RNA en todos los oligos con uracilo en RNA a timidina en LNA (2189) en suero de rata al 100%, donde la estabilidad fue similar a los oligos de DNA desnudos. En tiempo cero ya se habían degradado una hebra monocatenaria de RNA no modificada (GL3-) y una hebra bicatenaria no modificada (GL3+/-) (Fig. 6).

Ejemplo 9

Análisis in vitro: Inhibición mediante siRNA de una diana endógena mediante siLNA

Inhibición de la citotoxicidad

Las células se transfectaron con 85 nM del siRNA o siLNA respectivo (SARS 1-4, véase la Fig. 7) o con siRNA de control dirigido contra el gen de la luciferasa de luciérnaga (Luc) o el gen del neuropéptido Y (NPY) de rata. Las células con transfección simulada se trataron con Lipofectamine 2000 sólo y se usaron como control positivo. Las células no infectadas se incluyeron como control negativo. Las células transfectadas se infectaron con 60.000, 6.000 o 600 $DICT_{50}$ de SARS-CoV. Después de 50 horas desde la infección, se midió el CPE y la citotoxicidad. Se encontró una diferencia notable en CPE entre las células tratadas con el siRNA más eficaz, SARS 1, y las células con transfección simulada (Fig. 8). La citotoxicidad se determinó en términos de porcentaje de liberación de LDH de las células tratadas comparada con las células de control con transfección simulada. La inhibición porcentual de la citotoxicidad se calculó como una citotoxicidad del 100% en la muestra tratada con siRNA. Los siRNA y siLNA específicos de Pol presentaron diversos efectos sobre la citotoxicidad (Fig. 9). Los siRNA y siLNA más eficaces fueron los dirigidos contra el sitio SARS 1, que redujeron la citotoxicidad y con hasta un 65% a una $DICT_{50}$ de 600. El sitio SARS 3 presentó una eficacia media usando siRNA a las tres dosis de virus. Sin embargo SARS 3 se convirtió en un sitio igual de eficaz que SARS 1 usando siLNA, también con las tres dosis de virus. Los sitios SARS 2 y SARS 4 no mostraron ningún efecto debido a siRNA ni a siLNA a ninguna dosis de virus. Los datos representan la media y la desviación típica determinadas mediante tres experimentos independientes por cuadruplicado.

Virus y células

Se usaron células Vero para todos los experimentos en células. Las células se cultivaron en MEM de Eagle sin rojo fenol que contenía 5% de FCS y 1% de PEST a 37ºC y 5% de CO_2. La cepa aislada Frankfurt 1 (número de acceso de GenBank AY291315, graciosamente donada por el Dr. H. W. Doerr) se cultivó con titulaciones elevadas en células Vero. Se juntaron los sobrenadantes de dos matraces de cultivo de células T225 y se congelaron a -80ºC en viales de

1 ml y constituían la solución madre de virus. La solución madre de virus se identificó como SARS-CoV mediante PCR con transcriptasa inversa de diagnóstico usando los cebadores BNIoutS2 y BNIoutAs[11] y los cebadores Cor-p-F2 y Cor-p-R1[2]. La solución madre de virus se usó en diluciones de factor diez o a una dilución fija para infectar células Vero en placas de cultivo celular de 96 pocillos. La solución madre de virus se diluyó 600.000 veces (determinado mediante el procedimiento de Reed-Muench) para alcanzar la $DICT_{50}$ en placas de cultivo celular de 96 pocillos.

Los oligonucleótidos de siLNA se produjeron produced como se describe anteriormente. La secuencia se muestra en la Fig. 7.

Transfecciones

Se usó Lipofectamine2000 (Invitrogen) para transfectar las células con siRNA y siLNA. La eficacia de la transfección fue elevada y se transfectaron la mayoría de las células. El medio de transfección se cambió por MEM de Eagle sin rojo fenol después de cuatro horas, y las células se cultivaron hasta la mañana siguiente formando una monocapa confluente.

Citopatogenia y citotoxicidad

Se detectó el efecto citopatogénico (CPE) en células infectadas por el abombamiento de las células y separación de la placa de cultivo. El CPE se puntuó con un microscopio óptico. La citotoxicidad se midió usando un kit de detección de la citotoxicidad (LDH) (Roche, Alemania). Las células con transfección simulada tratadas sólo con Lipofectamine 2000 se consideraron como 100% de citotoxicidad provocada por la infección vírica a cada dilución de virus. Las células no infectadas se usaron para determinar la citotoxicidad de fondo. La citotoxicidad porcentual se determinó mediante [((Abs490 muestra - fondo)/(Abs490 controles con transfección simulada - fondo)) x100]. La inhibición de la citotoxicidad se calculó mediante [(1-(Abs490 muestra - fondo)/(Abs490 controles con transfección simulada - fondo))100].

Ejemplo 10

Reducción de los efectos fuera de la diana

La inhibición de la diana codificante/no codificante de SARS en 3'UTR de la luciferasa de luciérnaga se realizó a 1,6 nM de siRNA/siLNA con los plásmidos: pS3Xs (pGL3 con SARS codificante diana), pS3Xas (pGL3 con SARS no codificante diana), y pGL3 (sin SARS diana).

La secuencia diana SARS 3 se clonó en dirección codificante (secuencia correspondiente al mRNA de SARS) y no codificante (secuencia complementaria al mRNA de SARS) en 3' UTR de luciferasa de luciérnaga, entre la región codificante de la luciferasa y poli A en pGL3. pGL3 se digirió con Xba I (entre el codón de terminación de luc y poli A) y un oligo bicatenario de DNA de la secuencia diana SARS S3 con protuberancias Xba I.

(Oligo bicatenario de DNA de la diana SARS 3 (posición genómica 14593 de SARS) con protuberancias Xba I)

5'-ctagcaaactgtcaaacccggtaattttt-3' (codificante, igual que el mRNA)

3'-atttgacagtttgggccattaaaaagatc-5' (no codificante, complementario al mRNA)

El ligado del oligo bicatenario produjo dos productos plasmídicos con diana codificante o no codificante (pS3Xs: diana en dirección codificante, pS3Xas: diana en dirección no codificante). Los dos plásmidos diferentes se transfectaron en cultivos de células HEK293 diferentes junto con plásmido de control pRL-TK y siRNA dirigido contra SARS3 o siLNA dirigido contra SARS3 (concentración final de 1,6 nM), de acuerdo con el protocolo que se describe en el Ejemplo 5. Las células se incubaron durante 24 horas, las células se recogieron y se midió la actividad de la luciferasa como se describe en el Ejemplo 5.

El siLNA puede inactivar la hebra codificante no deseada y a la vez mantener el efecto total en la hebra no codificante. El siRNA muestra el efecto de ambas hebras. La secuencia diana de SARS 3 se clonó tanto en dirección codificante como no codificante después de lo cual se ensayaron siLNA y siRNA para determinar los efectos de inhibición en los dos plásmidos diferentes.

El siRNA muestra la regulación por disminución de la diana codificante (parte de la secuencia de mRNA de SARS, ~90% de reducción de la actividad de la luciferasa) así como de la diana no codificante (secuencia complementaria al mRNA de SARS) (~50% de reducción). Por lo tanto, la hebra codificante y la no codificante del siRNA tienen ambas un efecto de regulación por disminución. Sin embargo, el siLNA SARS 3 muestra un efecto igual de bueno en la regulación por disminución de la diana codificante (~90% de reducción) pero no tiene actividad sobre la diana no codificante (0% de reducción). Por lo tanto, la hebra no codificante de siLNA mantiene el efecto total mientras que se anula el efecto de la hebra codificante no deseado. Esto quiere decir que siLNA puede minimizar las dianas no objetivo de la hebra codificante al inactivarla con respecto a la maquinaria de interferencia de RNA (Fig. 17).

Ejemplo 11

Eficacia in vivo de siLNA

El fin de este estudio era analizar la eficacia *in vivo* de dos siRNA contra eGFP que se habían modificado incorporando monómeros de LNA. Los compuestos empleados fueron 3029/3031 y 3030/3031.

Resumiendo, se inyectó a ratones atímicos hembra (NMRI nu/nu, Charles River Netherlands, Maastricht, Holanda) xenoinjertos de 15PC3 y Miapaca. Las células 15PC3 y las células Miapaca expresan eGFP como describe Fluiter *et al*. (2002) Cancer Research 62, 2024-2028.

Después de dos semanas de crecimiento tumoral, se implantó a los ratones minibombas osmóticas por vía subcutánea (Alzet 1007D, n.º de lote 10052-02 (bombas de 7 días) (Durect Corporation, Cupertino, CA)). Estas bombas se cargaron con 3029/3031 o 3030/3031 dando una dosis de 0,5 mg/kg/día. Los ratones se trataron durante 5 días. El 5º día, los ratones se sacrificaron y se obtuvieron imágenes de la fluorescencia en el tumor y se cuantificó usando un analizador de imágenes luminiscente LAS3000 (Fujifilm). La fluorescencia se cuantificó usando el programa AIDA (Raytest GmbH, Straubenhardt, Alemania). Después de obtener imágenes, los tumores se extrajeron y se almacenaron para el análisis proteínico (transferencia Western). Los resultados obtenidos para 15PC3 se muestran en la Fig. 18. Como puede observarse, el compuesto de siLNAs tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento tumoral. Con el modelo de xenoinjerto con Miapaca se obtuvieron resultados similares.

El siLNA se comprobó antes del implante y después del experimento (los restos presentes en la bomba) usando el análisis por MALDI-TOF. El siLNA se purificó mediante intercambio iónico sobre las placas de purificación del kit de genotipado Nucleave (Waters, Milford, MA, Estados Unidos) y se analizó usando espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF) en un MALDI Biflex III (Brucker instruments, Leipzig, Alemania). Los datos se muestran en la Fig. 20.

TABLA 1

N.º	Secuencia (5'→3')	Conc. (µM)	Pureza
2184	cuuacgcugaguacuucgaTT	440	~80%
2185	^{Me}CuuacgcugaguacuucgaT7	320	~70%
2186	ucgaaguacucagcguaagTT	380	~65%
2187	TcgaaguacucagcguaagTT	340	~60%
2187phos	Phos-TcgaaguacucagcguaagTT	350	~80%
2188	^{Me}CTcgcTagTacTTcgaTT	410	~50%
2189	TcgaagTacTcagcgTaagTT	390	~55%
2189phos	Phos-TcgaagTacTcagcgTaagTT	330	~80%
2699-1	uuuuucuccuucuucagauTT	400	~80%
2700-1	aucugaagaaggagaaaaaTT	400	~80%
2701-1	TuuuucuccuucuucagauTT	360	~80%
2702-1	AucugaagaaggagaaaaaTT	430	~80%
2703-1	^{Me}CTTacgcTgagTacTrcgaTT	500	~80%

Mayúsculas: BetaDoxi monómero de LNA

Minúsculas: monómero de RNA

Phos: 5'fosfato

^{Me}C: 5metilcitosina

TABLA 2

N.º	Secuencia (5'→3')
2780	^{Me}CTTA^{Me}CG^{Me}CTGAGTA^{Me}CTT^{Me}CGATT
2781	dCTdtAdCGdCTdgAdgTda^{Me}CdtTdCGdaTT
2782	dCTdtda^{Me}CdgdCTdgdaGdtda^{Me}Cdtdt^{Me}CdgdaTT
2783	^{Me}CuuAcGcuGaGua^{Me}Cuu^{Me}CgaTT
2784	^{Me}CdUdUAdcGdCduGdaGdUda^{Me}CdUdU^{Me}CdgdaTT
2785	u^{Me}CGAAGTA^{Me}CT^{Me}CAG^{Me}CGTAAGTT
2786	u^{Me}CdgAdaGdtAdcTdcAdg^{Me}CdgTdaAdgTT
2787	u^{Me}CdgdaAdgdtAdCdt^{Me}Cdadg^{Me}CdgdtAdadgTT
2788	ucGaaGua^{Me}CucAgcGuAagTT
2789	u^{Me}Cgaaguacucagcguaag TT
2790	ucGaaguacucagcguaagTT
2792	ucgaAguacucagcguaagTT
2793	ucgaaGuacucagcguaagTT
2794	ucgaaguAcucagcguaagTT
2795	TgAgAgaaAgcAcAgaAaaTT
2796	Tgagagaaagcacagaaaa TT
2797	Tuuucugugcuuucucuca TT

Mayúsculas: BetaDoxi monómero de LNA
Minúsculas sin prefijo: monómero de RNA
Minúsculas con prefijo "d": monómero de DNA
^{Me}C: 5metilcitosina

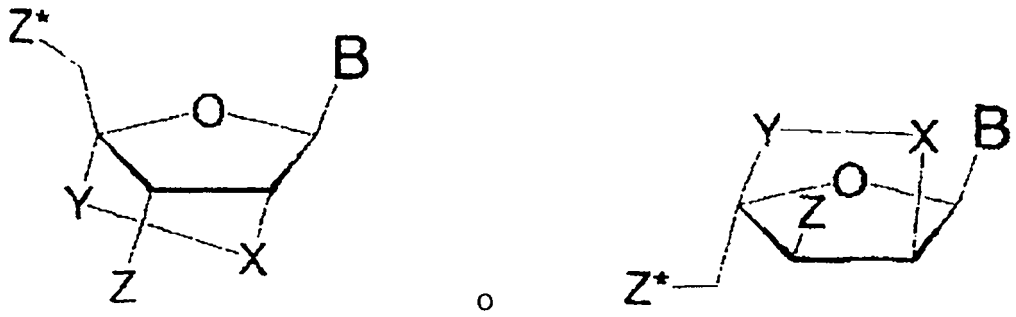
TABLA 3

N.º	Secuencia (5'→3')
2842-1	GgaugaggaaggcaauuuaTT
2843-1	uaaauugccuuccucauccTT
2872-1	CugguacgauuucggugauTT
2845-1	aucaccgaaaucguaccagTT
2846-1	AcugucaaacccgguaauuTT
2847-1	aauuaccggguuugacaguTT
2848-1	GacaacuccuauucguaguTT
2849-1	acuacgaauaggaguugucTT
2862-1	UccagaacaaaccaaacggTT
2863-1	AaacaugcagaaaaugcugTT
2864-1	ucgaagua^{Me}CucagcguaagTT
2865-1	ucgaaguacTcagcguaagTT
2866-1	ucgaaguacu^{Me}CagcguaagTT
2867-1	ucgaaguacucAgcguaagTT
2865U	ucgaaguacAcagcguaagTT
3029	GcugacccugaaguucaucTT
3030	G^{Me}CTgac^{Me}CcuGaagTTcaucTT
3031	gaugaacuucagggucagcTT
Mayúsculas: BetaDoxi monómero de LNA Minúsculas sin prefijo: monómero de RNA ^{Me}C: 5-metilcitosina	

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto bicatenario que comprende una hebra codificante y una hebra no codificante,

en el que cada hebra comprende 12-35 nucleótidos y en el que dicho compuesto comprende al menos un monómero de ácido nucleico cerrado (LNA) que tiene la estructura



en las que

X se selecciona a partir del grupo constituido por O, S y NR^H, donde R^H es H o alquilo C_{1-4};

Y es CH_2;

B es una nucleobase;

Z y Z* están independientemente ausentes o se seleccionan a partir del grupo constituido por un grupo de enlace internucleosídico, un grupo terminal y un grupo protector; de forma que cuando el monómero de LNA está localizado en el extremo 3', Z es un grupo terminal y Z* es un grupo de enlace internucleosídico; cuando el monómero de LNA está localizado en el extremo 5', Z está ausente y Z* es un grupo terminal; y cuando el monómero de LNA está localizado dentro de la secuencia de nucleótidos, Z está ausente y Z* es un grupo de enlace internucleosídico, y

en el que ningún monómero de LNA está localizado en el extremo 5' de la hebra no codificante.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la hebra codificante comprende 1-10 monómeros de LNA.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que al menos un monómero de LNA está localizado en el extremo 5' de la hebra codificante.

4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, en el que al menos dos monómeros de LNA están localizados en el extremo 5' de la hebra codificante.

5. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos un monómero de LNA está localizado en el extremo 3' de la hebra codificante.

6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, en el que al menos dos monómeros de LNA están localizados en el extremo 3' de la hebra codificante.

7. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la hebra no codificante comprende al menos un monómero de LNA.

8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la hebra no codificante comprende 1-10 monómeros de LNA.

9. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que al menos un monómero de LNA está localizado en el extremo 3' de la hebra no codificante.

10. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 9, en el que al menos dos monómeros de LNA están localizados en el extremo 3' de la hebra no codificante.

11. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 10, en el que al menos tres monómeros de LNA están localizados en el extremo 3' de la hebra no codificante.

12. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la hebra codificante comprende al menos un LNA y la hebra no codificante comprende al menos un monómero de LNA.

13. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la hebra codificante comprende 1-10 monómeros de LNA y la hebra no codificante comprende 1-10 monómeros de LNA.

14. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13, en el que la hebra codificante comprende al menos un monómero de LNA en el extremo 5' y al menos un monómero de LNA en el extremo 3', y en el que la hebra no codificante comprende al menos un monómero de LNA en el extremo 3'.

15. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la hebra codificante comprende al menos un monómero de LNA en el extremo 5' y al menos un monómero de LNA en el extremo 3', y en el que la hebra no codificante comprende al menos dos monómeros de LNA en el extremo 3'.

16. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la hebra codificante comprende al menos dos monómeros de LNA en el extremo 5' y al menos dos monómeros de LNA en el extremo 3', y en el que la hebra no codificante comprende al menos dos monómeros de LNA en el extremo 3'.

17. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la hebra codificante comprende al menos dos monómeros de LNA en el extremo 5' y al menos dos monómeros de LNA en el extremo 3', y en el que la hebra no codificante comprende al menos tres monómeros de LNA en el extremo 3'.

18. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la hebra codificante comprende al menos un monómero de LNA en al menos una de las posiciones 9-13 contadas a partir del extremo 5'.

19. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 18, en el que la hebra codificante comprende un monómero de LNA en la posición 10.

20. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 18 ó 19, en el que la hebra codificante comprende un monómero de LNA en la posición 11.

21. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-20, en el que la hebra codificante comprende un monómero de LNA en la posición 12.

22. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que cada hebra comprende 17-25 nucleótidos.

23. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 22, en el que cada hebra está formada por 20-22 nucleótidos.

24. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos una de las hebras tiene una protuberancia en 3'.

25. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 24, en el que la hebra codificante tiene una protuberancia en 3'.

26. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 24 ó 25, en el que la hebra no codificante tiene una protuberancia en 3'.

27. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24-26, en el que las protuberancias en 3' son de 1-3 nucleótidos.

28. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 27, en el que tanto la hebra codificante como la no codificante comprenden dichas protuberancias en 3', en el que cada hebra comprende 17-25 nucleótidos; en el que la hebra codificante tiene uno o dos monómeros de LNA en el extremo 5' y uno o dos monómeros de LNA en el extremo 3'; y en el que la hebra no codificante tiene uno o dos monómeros de LNA en el extremo 3'.

29. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en el que ningún monómero de LNA está localizado a 1, 2 ó 3 nucleótidos del extremo 5' de la hebra no codificante.

30. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que X se selecciona a partir del grupo constituido por O, S y NH.

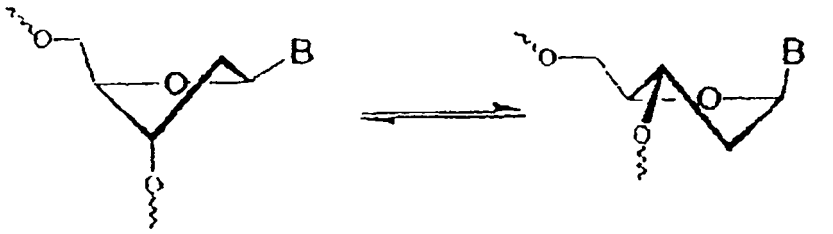
31. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 30, en el que X es O.

32. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho monómero de LNA está en la forma beta-D.

33. Un conjugado que comprende el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-32 enlazado a uno o más ligandos.

34. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-32 o el conjugado de acuerdo con la reivindicación 33, y un diluyente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

35. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-32 o el conjugado de acuerdo con la reivindicación 33, para usar como medicamento.



C2'-endo (tipo S) C3'-endo (tipo N)

Fig. 1

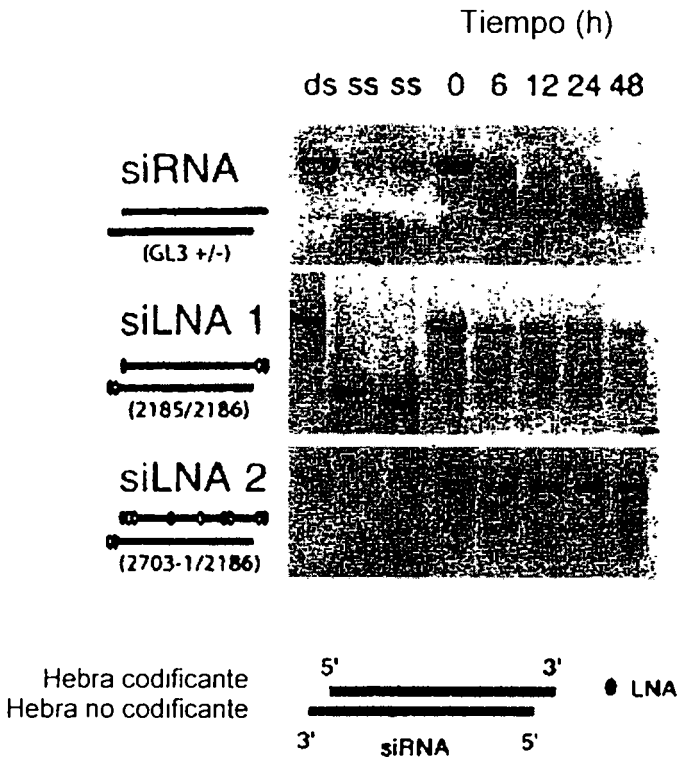

Tiempo (h)
ds ss ss 0 6 12 24 48
siRNA
(GL3 +/-)
siLNA 1
(2185/2186)
siLNA 2
(2703-1/2186)
Hebra codificante
Hebra no codificante
5'
3'
LNA
3'
siRNA
5'
Fracción de la cantidad inicial (%)
100
75
50
25
0
0
5
10
15
20
25
Tiempo (h)
siLNA 2
siLNA 1
siRNA

Fig. 2

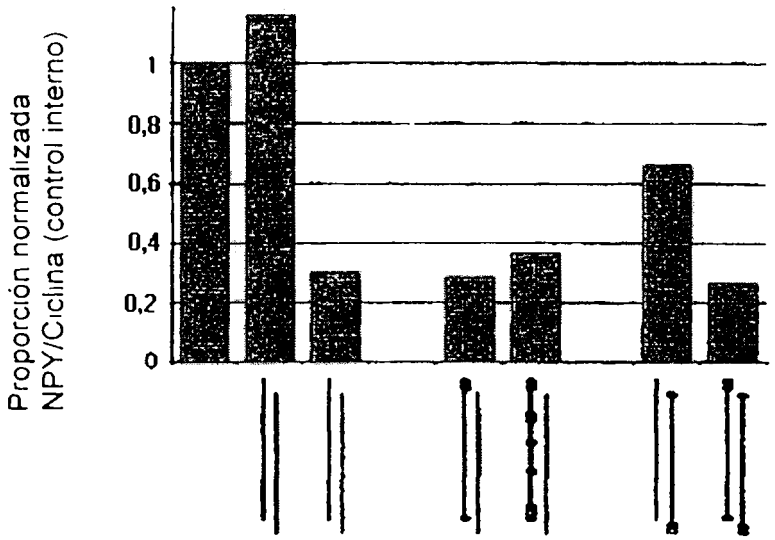

Proporción normalizada
NPY/Ciclina (control interno)
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0

Fig. 3

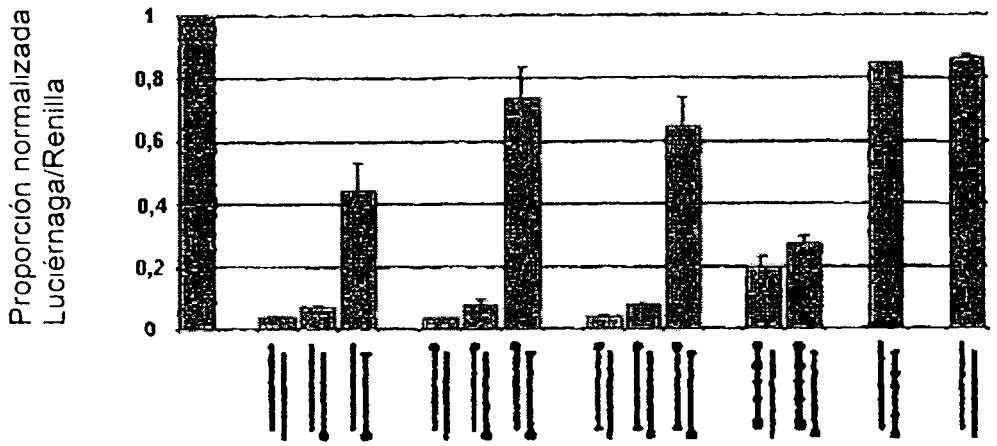


Fig. 4

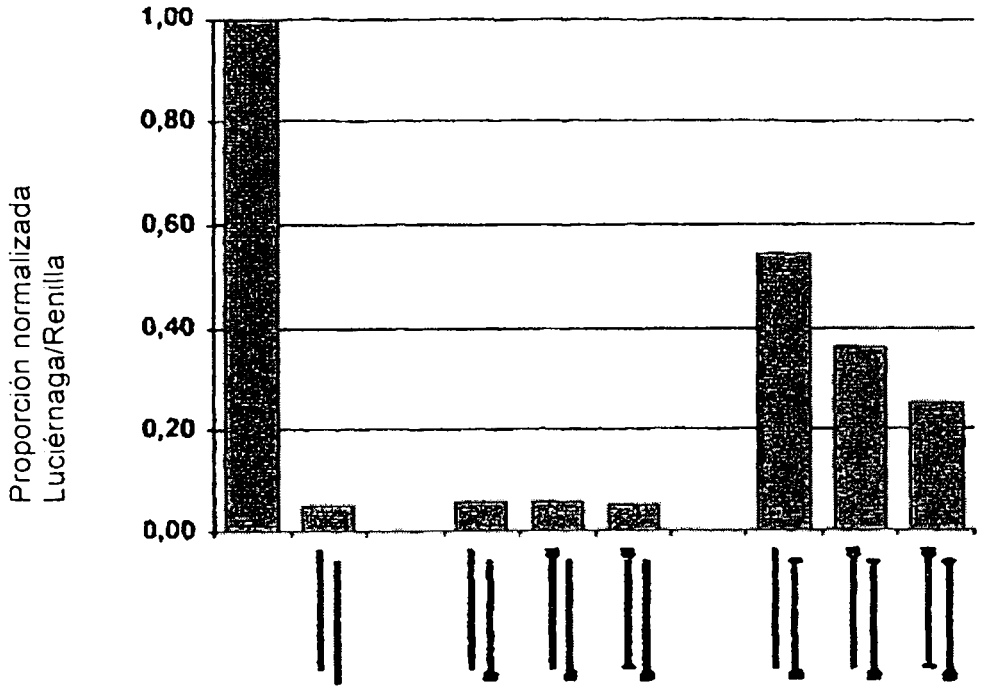

Proporción normalizada
Luciérnaga/Renilla
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00

Fig. 5

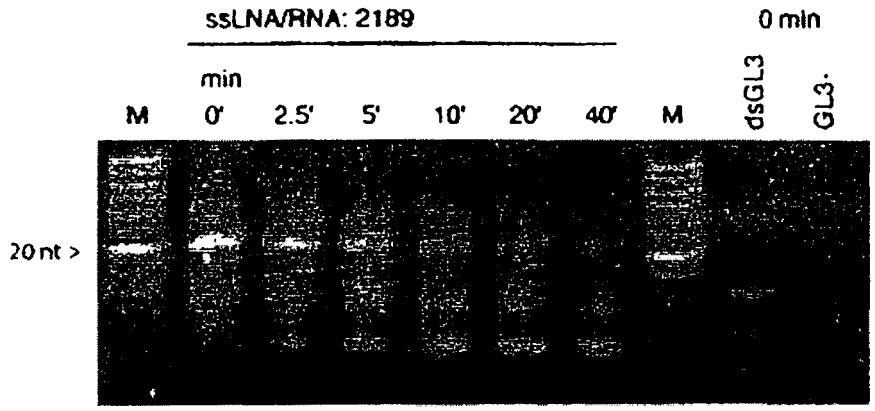
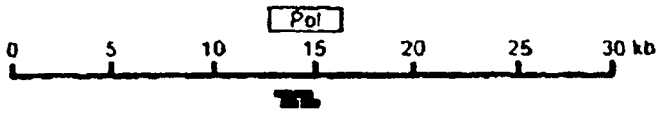


Fig. 6

siRNA/siLNA contra SARS



		Posición inicial		Posición final
siRNA	siRNA SARS 1	13.547	5'-ggaugaggaaggcaauuuatt 3' 3'-ttccuacuccuuccguuaaau-5'	13.567
	siRNA SARS 2	14.015	5'-cugguacgauuucggugautt-3' 3'-ttgaccaugcuaaagccacua-5'	14.035
	siRNA SARS 3	14.595	5'-acugucaaacccgguaauutt-3' 3'-ttugacaguuugggccauuaa-5'	14.615
	siRNA SARS 4	14.770	5'-gacaacuccuauucguagutt-3' 3'-ttcuguugaggauaagcauca-5'	14.790
siLNA	siLNA SARS 1	13.547	5'-Cgaugaggaaggcaauuuatt-3' 3'-TTccuacuccuuccguuaaau-5'	13.567
	siLNA SARS 2	14.015	5'-Cugguacgauuucggugautt-3' 3'-TTgaccaugcuaaagccacua-5'	14.035
	siLNA SARS 3	14.595	5'-Acugucaaacccgguaauutt-3' 3'-TTugacaguuugggccauuaa-5'	14.615
	siLNA SARS 4	14.770	5'-Gacaacuccuauucguagutt-3' 3'-TTcuguugaggauaagcauca-5'	14.790

Fig. 7

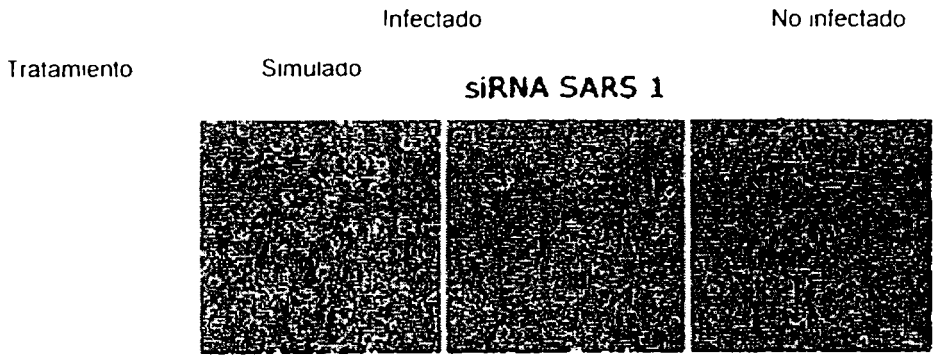


Fig. 8

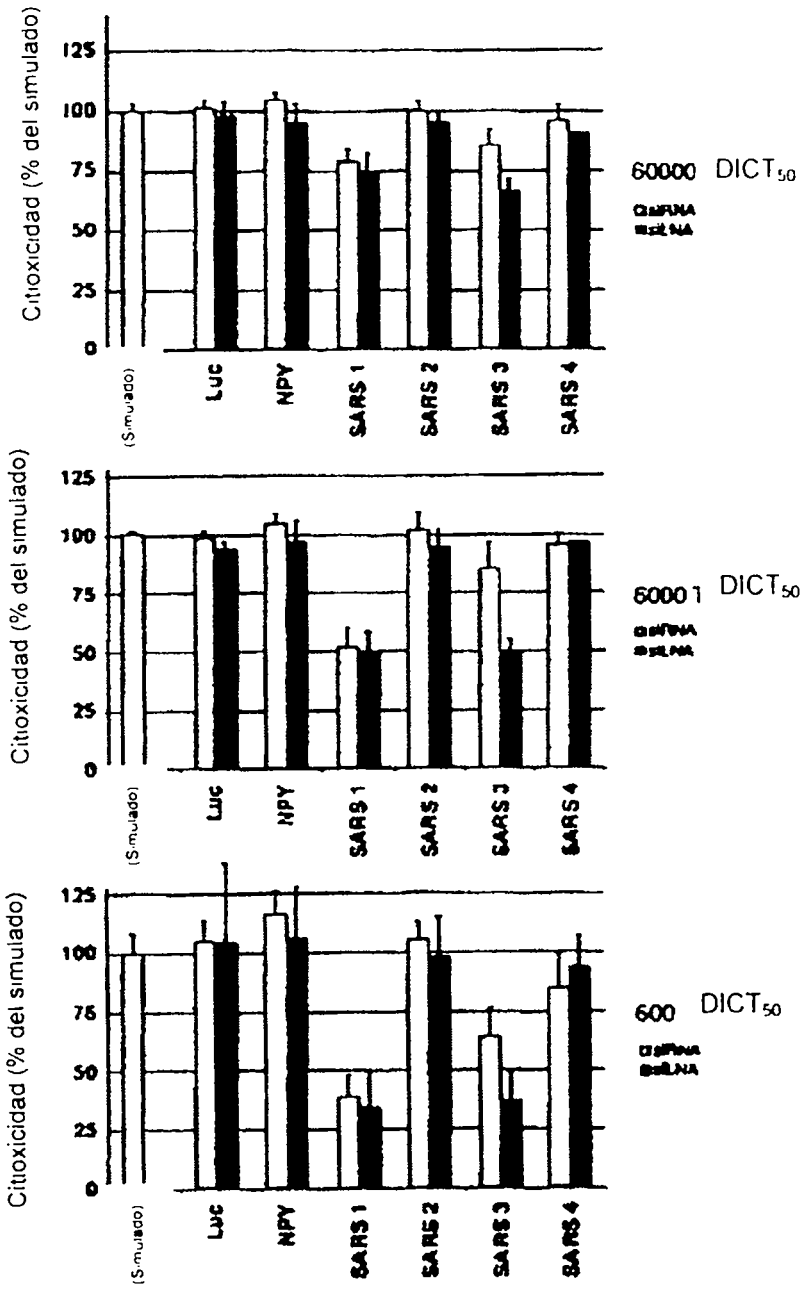

Citioxicidad (% del simulado)
125
100
75
50
25
0
(Simulado)
Luc
NPY
SARS 1
SARS 2
SARS 3
SARS 4
60000 DICT50
Citioxicidad (% del simulado)
125
100
75
50
25
0
(Simulado)
Luc
NPY
SARS 1
SARS 2
SARS 3
SARS 4
6000 1 DICT50
Citioxicidad (% del simulado)
125
100
75
50
25
0
(Simulado)
Luc
NPY
SARS 1
SARS 2
SARS 3
SARS 4
600 DICT50

Fig. 9

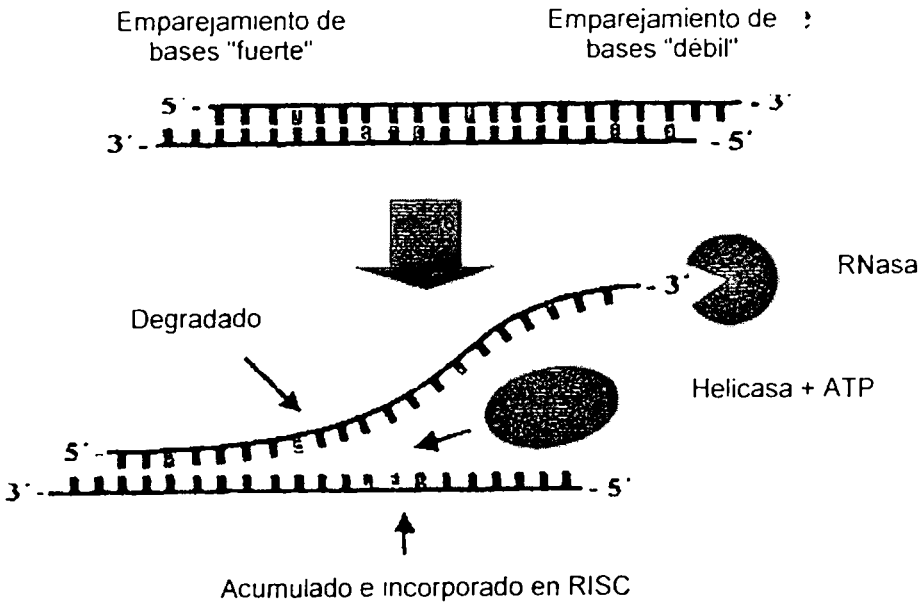

Emparejamiento de bases "fuerte"
Emparejamiento de bases "débil"
5'
3'
3'
5'
RNasa
Degradado
Helicasa + ATP
5'
3'
5'
Acumulado e incorporado en RISC

Fig. 10

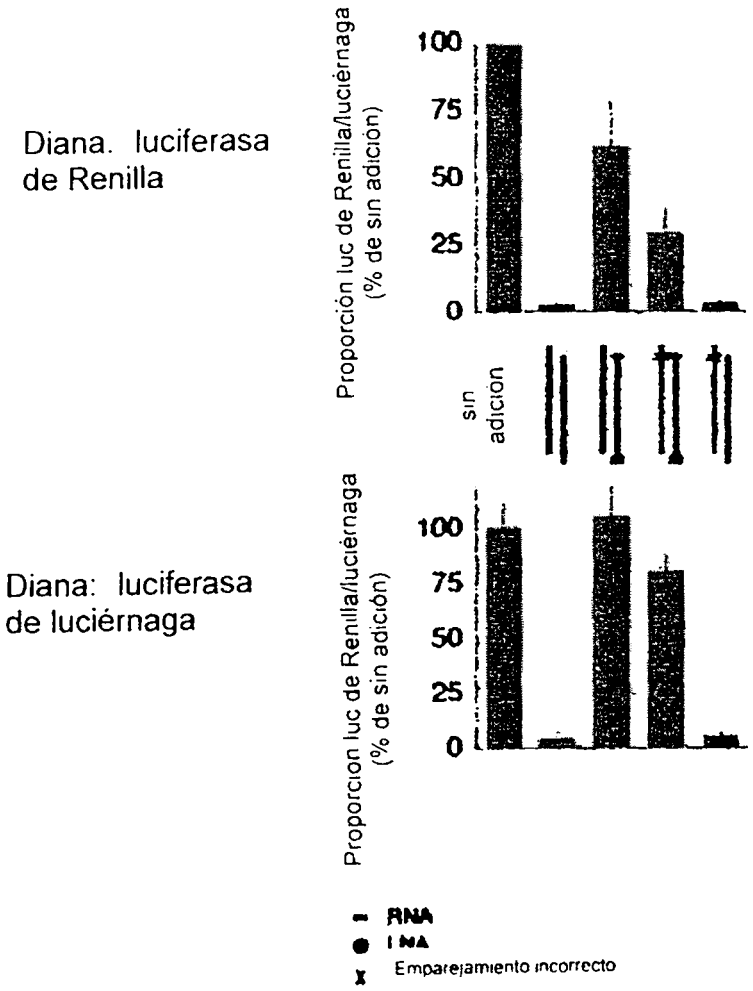

Diana. luciferasa de Renilla
Proporción luc de Renilla/luciérnaga (% de sin adición)
100
75
50
25
0
sin adicion
Diana: luciferasa de luciérnaga
Proporcion luc de Renilla/luciérnaga (% de sin adición)
100
75
50
25
0
RNA
DNA
Emparejamiento incorrecto

Fig. 11

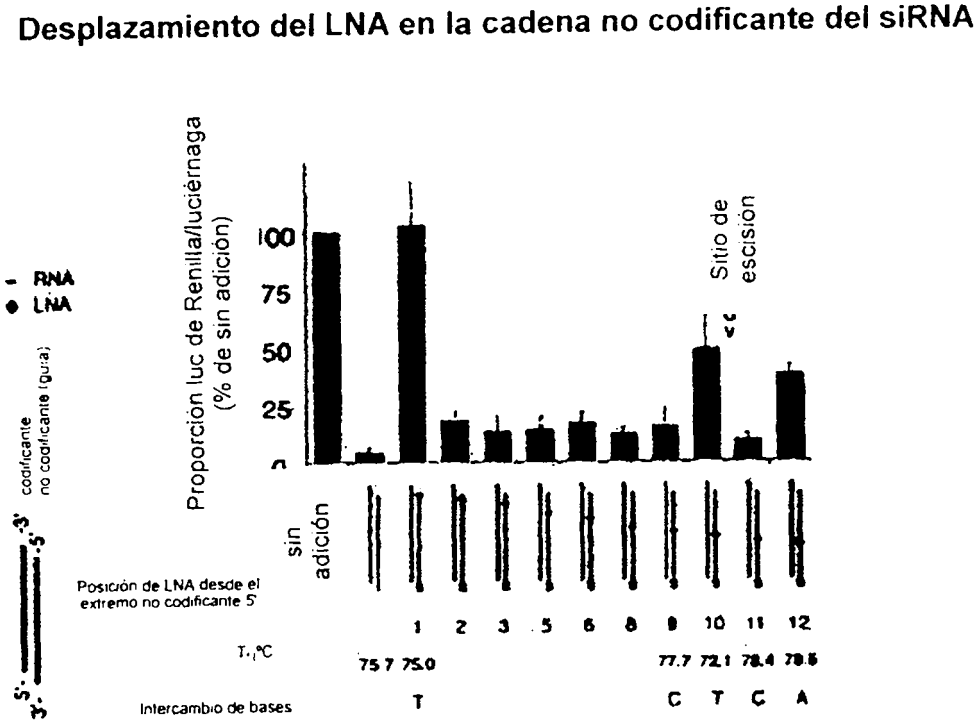

Desplazamiento del LNA en la cadena no codificante del siRNA
RNA
LNA
codificante
no codificante (guía)
5'
3'
3'
5'
Proporción luc de Renilla/luciérnaga
(% de sin adición)
100
75
50
25
0
Sitio de escisión
sin adición
Posición de LNA desde el extremo no codificante 5'
1 2 3 5 6 8 9 10 11 12
T, °C
75.7 75.0 77.7 72.1 78.4 78.5
Intercambio de bases
T C T C A

Fig. 12

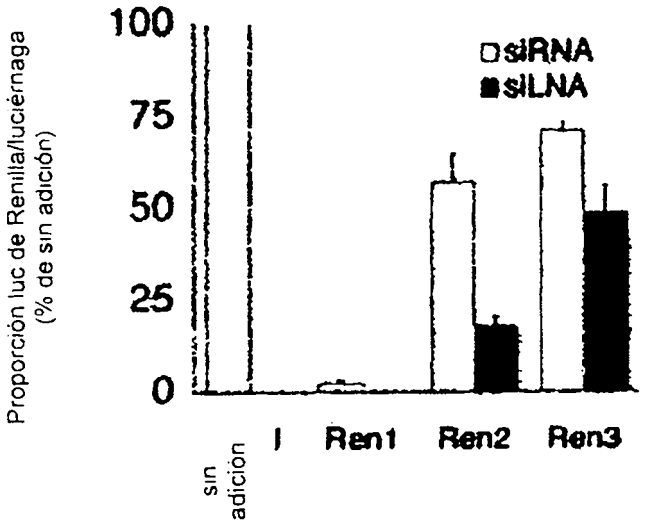
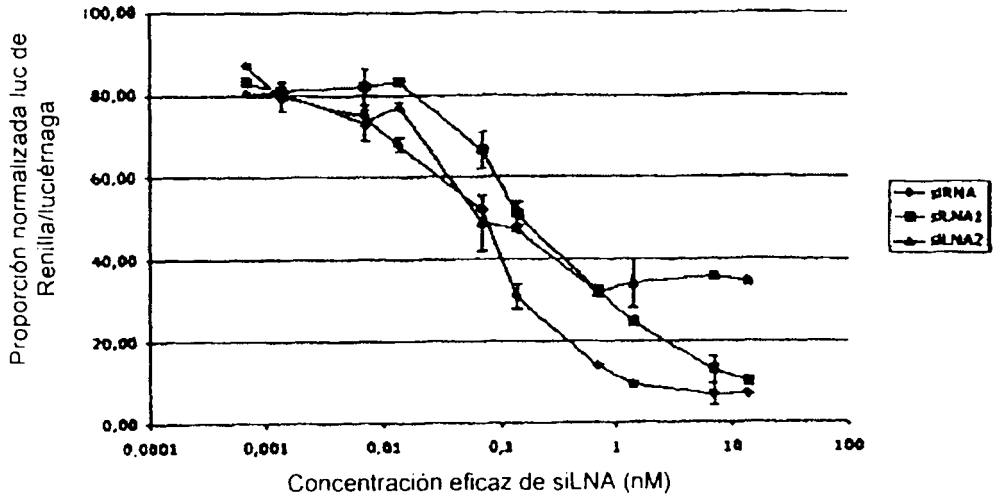

Proporción luc de Renilla/luciérnaga
(% de sin adición)
100
75
50
25
0
siRNA
siLNA
sin adición
I
Ren1
Ren2
Ren3

Fig. 13



siRNA:
5′-cuuacgcugaguacuucgatt-3′
3′-ttgaaugcgacucaugaagcu-5′

siLNA1:
5′-CuuacgcugaguacuucgaTT-3′
3′-TTgaaugcgacucaugaagcu-5′

siLNA2:
5′-CTTacgcTgagTacTTcgaTT-3′
3′-TTgaaugcgacucaugaagcu-5′

Fig. 14

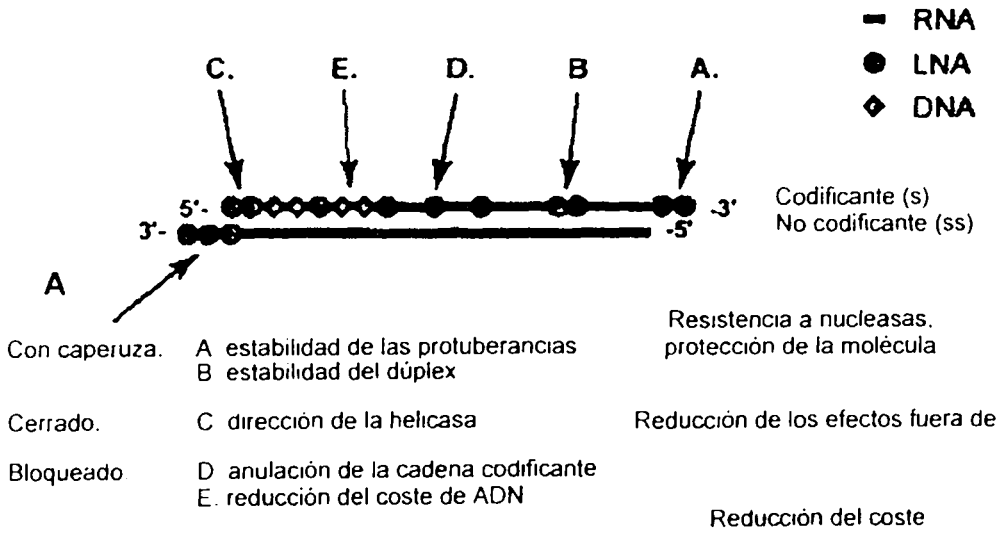

RNA
LNA
DNA
C.
E.
D.
B
A.
5'-
-3'
3'-
-5'
Codificante (s)
No codificante (ss)
A
Con caperuza.
A estabilidad de las protuberancias
B estabilidad del dúplex
Resistencia a nucleasas.
protección de la molécula
Cerrado.
C dirección de la helicasa
Reducción de los efectos fuera de la diana
Bloqueado
D anulación de la cadena codificante
E. reducción del coste de ADN
Reducción del coste

Fig. 15

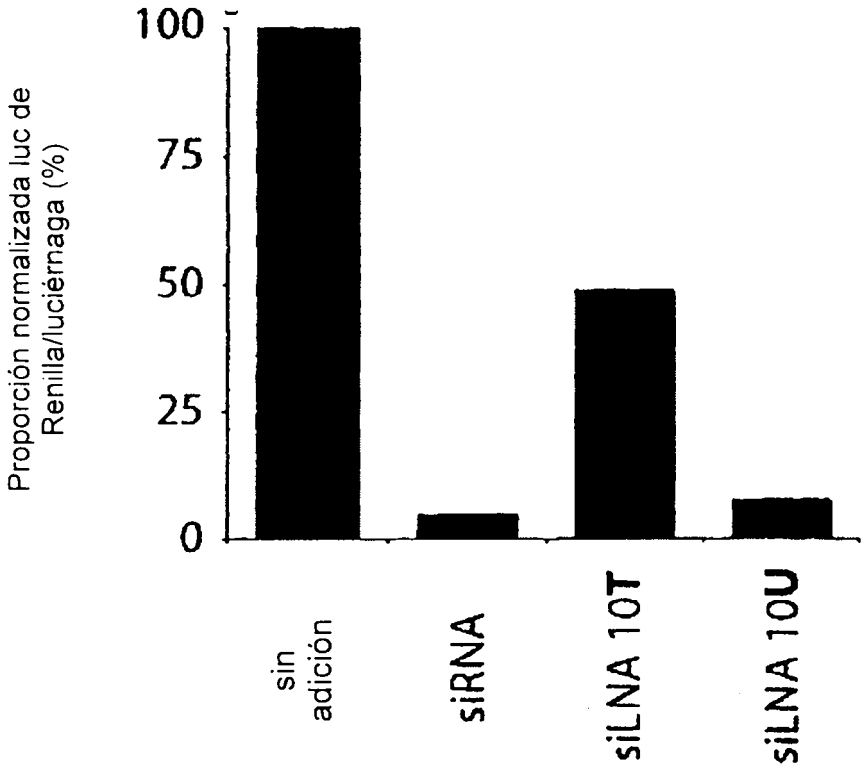

Proporción normalizada luc de Renilla/luciérnaga (%)
100
75
50
25
0
sin adición
siRNA
siLNA 10T
siLNA 10U

Fig. 16

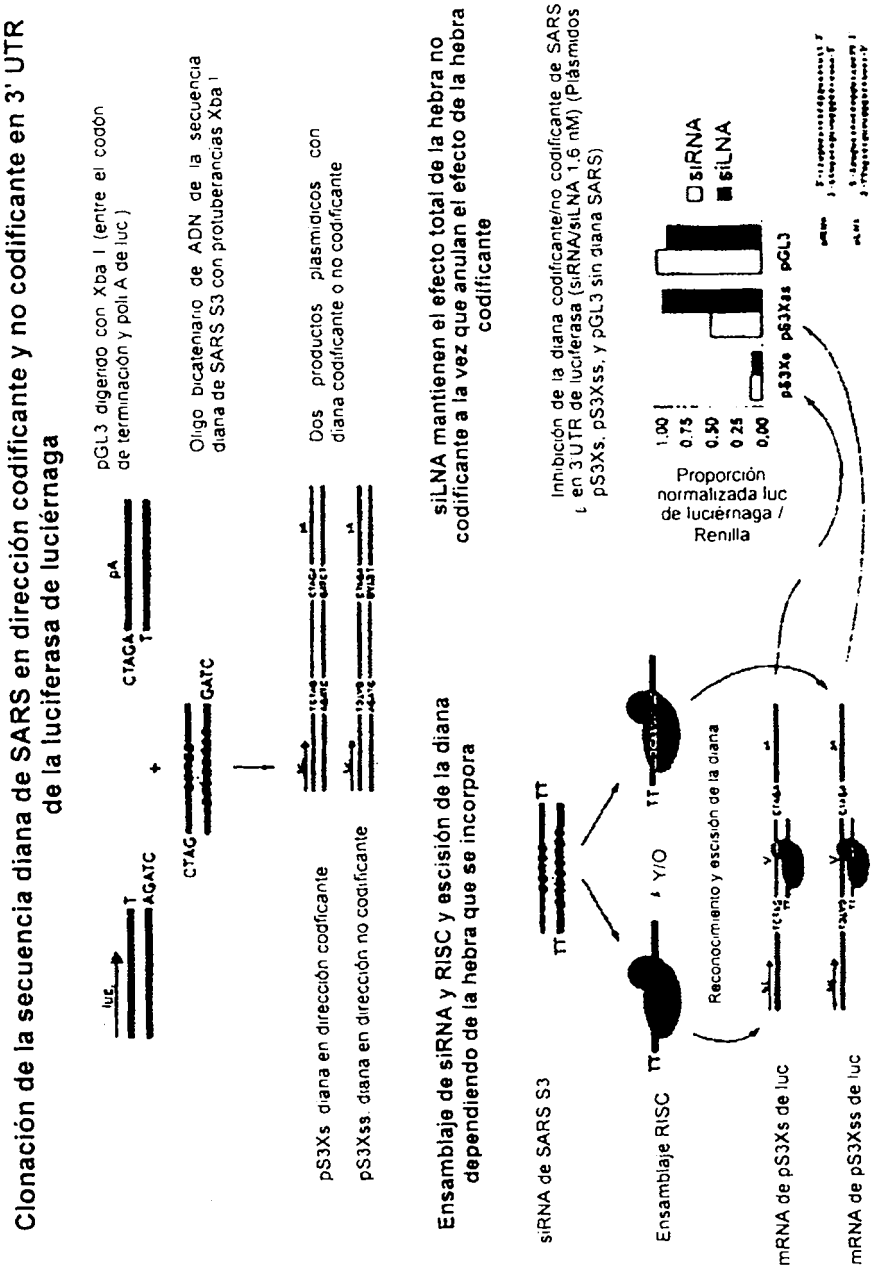
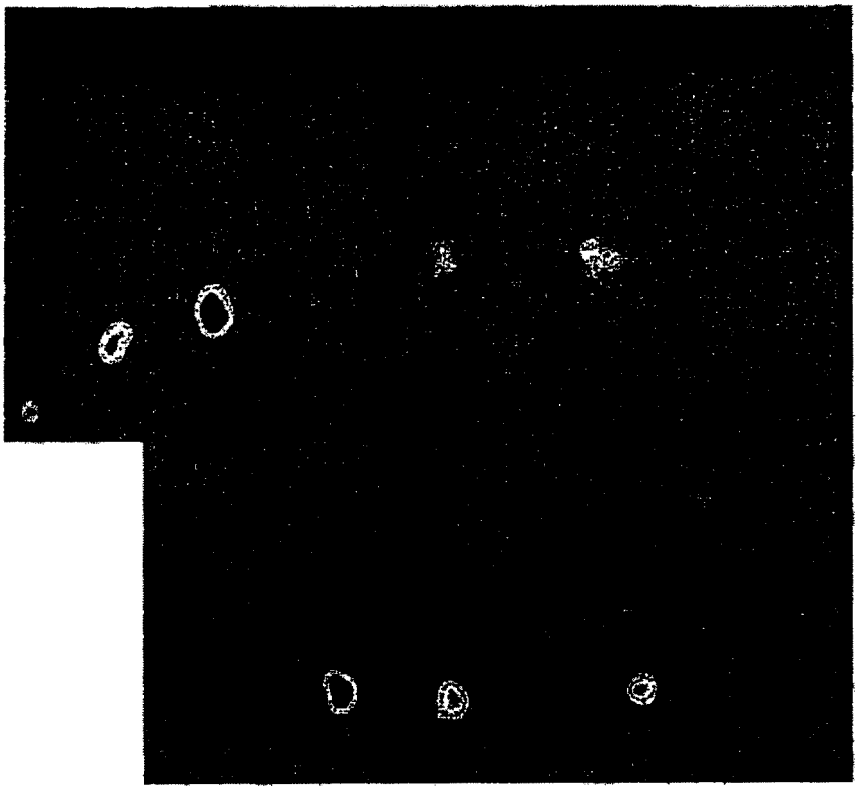

Clonación de la secuencia diana de SARS en dirección codificante y no codificante en 3' UTR de la luciferasa de luciérnaga
pGL3 digerido con Xba I (entre el codón de terminación y poli A de luc)
Oligo bicatenario de ADN de la secuencia diana de SARS S3 con protuberancias Xba I
Dos productos plasmídicos con diana codificante o no codificante
pS3Xs diana en dirección codificante
pS3Xss diana en dirección no codificante
Ensamblaje de siRNA y RISC y escisión de la diana dependiendo de la hebra que se incorpora
siLNA mantienen el efecto total de la hebra no codificante a la vez que anulan el efecto de la hebra codificante
siRNA de SARS S3
Ensamblaje RISC
Reconocimiento y escisión de la diana
mRNA de pS3Xs de luc
mRNA de pS3Xss de luc
Inhibición de la diana codificante/no codificante de SARS en 3'UTR de luciferasa (siRNA/siLNA 1.6 nM) (Plásmidos pS3Xs, pS3Xss, y pGL3 sin diana SARS)
Proporción normalizada luc de luciérnaga / Renilla
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
pS3Xs
pS3Xss
pGL3
siRNA
siLNA

Fig. 17



Fluorescencia del xenoinjerto con 15PC3-eGFP

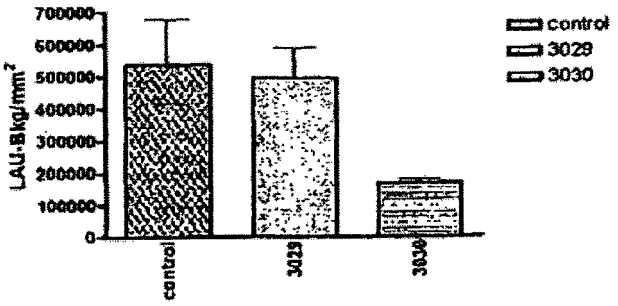


Fig. 18

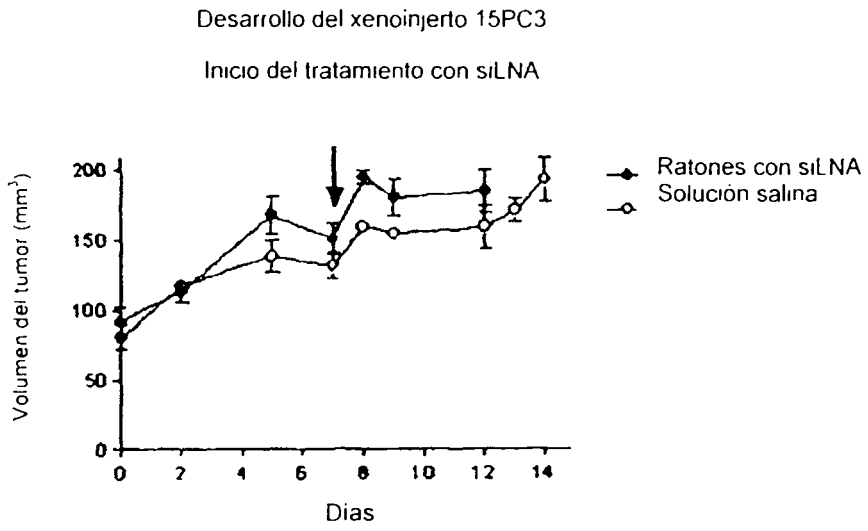

Desarrollo del xenoinjerto 15PC3
Inicio del tratamiento con siLNA
Volumen del tumor (mm³)
200
150
100
50
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Dias
Ratones con siLNA
Solución salina

Fig. 19

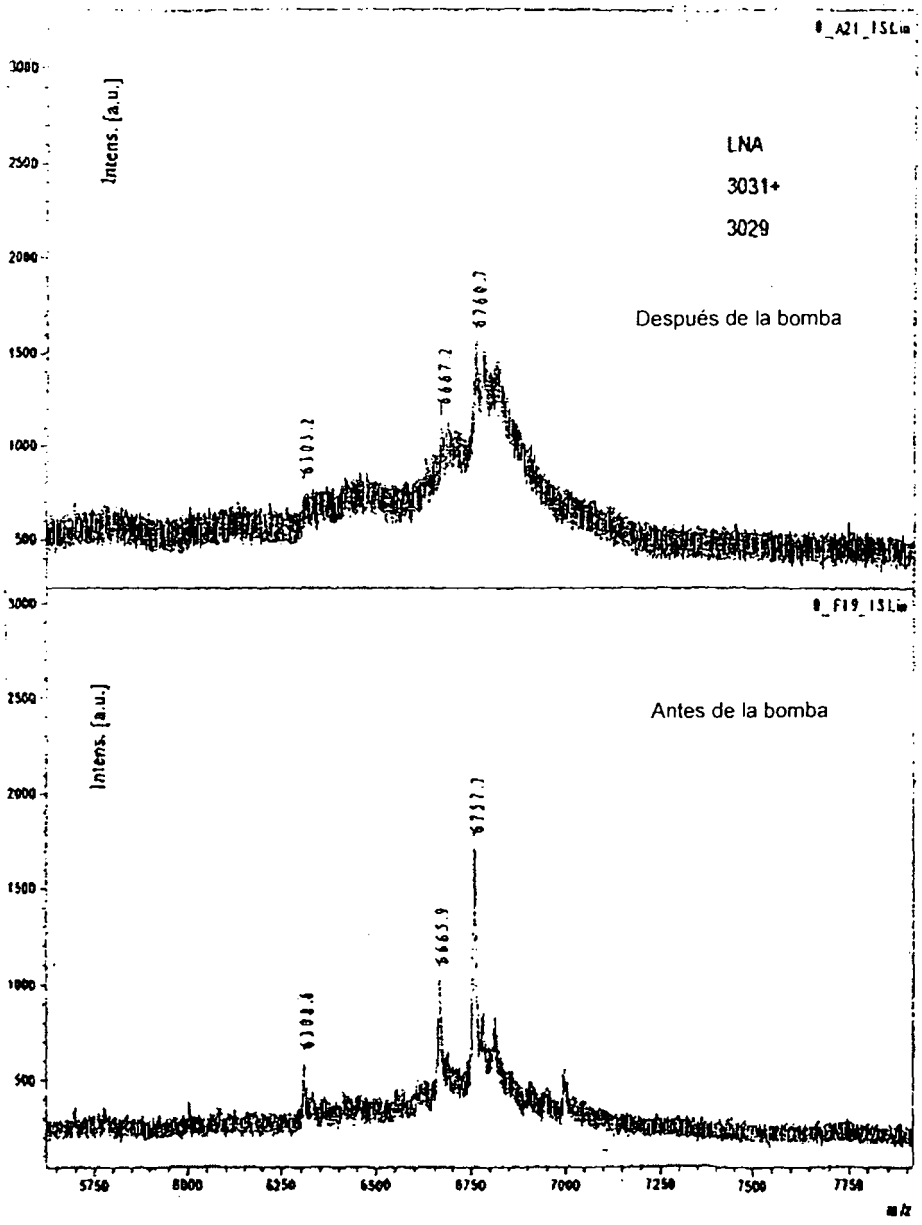

Intens. [a.u.]
LNA
3031+
3029
Después de la bomba
Antes de la bomba
Intens. [a.u.]
5750
6000
6250
6500
6750
7000
7250
7500
7750
m/z

Fig. 20

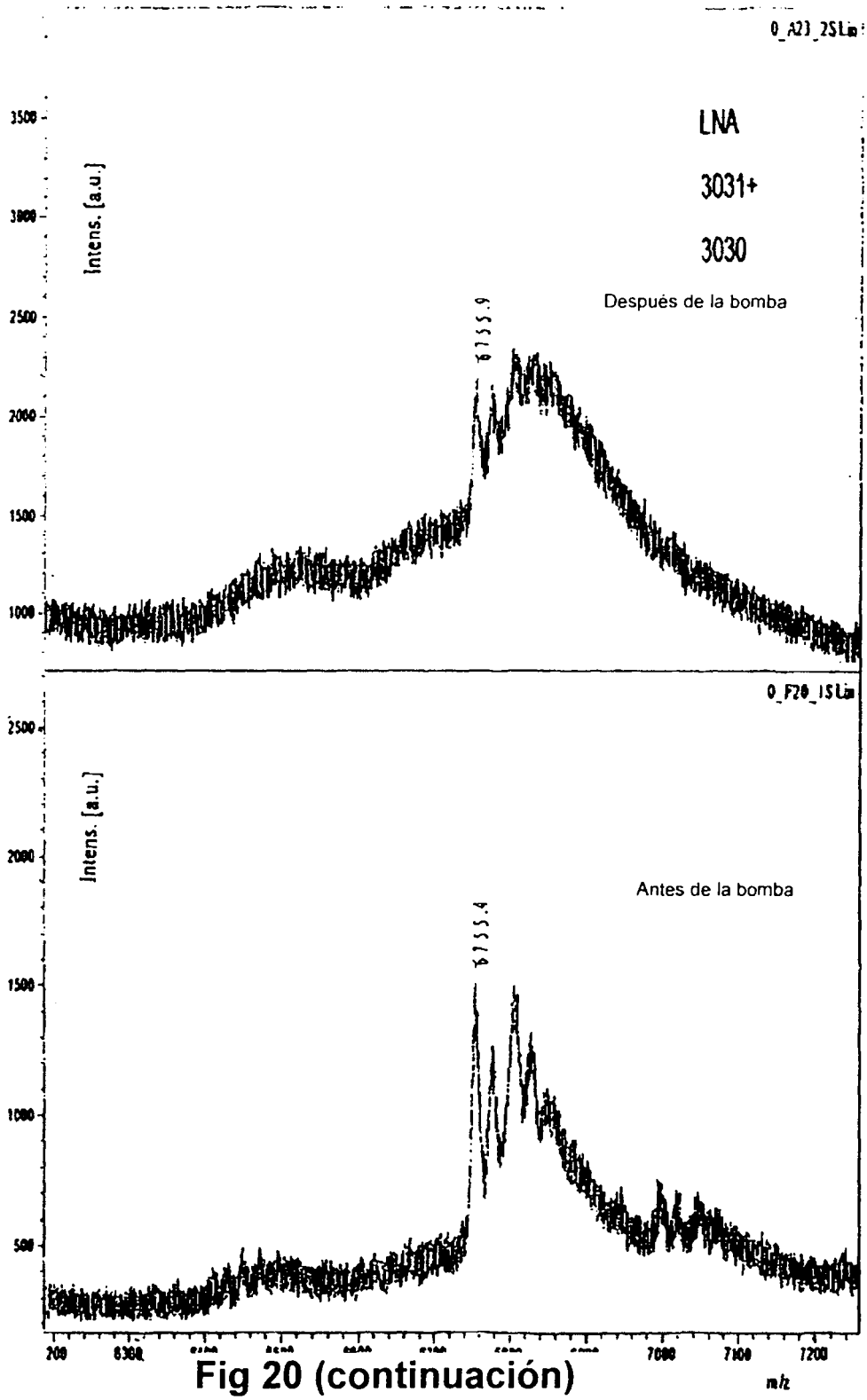


Fig 20 (continuación)