

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 201**

51 Int. Cl.:
C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06758231 .2**
96 Fecha de presentación: **31.03.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1866414**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.12.2007**

54 Título: **Inhibidores de la subunidad 2 de la ribonucleótido-reductasa y utilizaciones de los mismos**

30 Prioridad:
31.03.2005 US 667362 P
30.06.2005 US 695931 P
02.12.2005 US 742100 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.05.2012

73 Titular/es:
Calando Pharmaceuticals, Inc.
225 South Lake Avenue, 3rd Floor
Pasadena, CA 91101, US

72 Inventor/es:
DAVIS, Mark, E.;
HEIDEL, Jeremy, D. y
ROOSI, John, J.

74 Agente/Representante:
Aznárez Urbieto, Pablo

ES 2 381 201 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de la subunidad 2 de la ribonucleótido-reductasa y utilizaciones de los mismos.

SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad de las solicitudes provisionales US nº 60/667.362 presentada el 31 de marzo de 2005, 60/695.931 presentada el 30 de junio de 2005 y 60/742.100 presentada el 2 de diciembre de 2005.

ANTECEDENTES

- 10 La ribonucleótido-reductasa (RNR) cataliza la reacción que produce 2'-desoxirribonucleótidos a partir de sus 5'-difosfato-ribonucleósidos correspondientes. Esta reacción es un paso limitante en la ruta de producción de 2'-desoxirribonucleósido-5'-trifosfatos y es necesaria para la replicación del ADN. La RNR humana consiste en dos subunidades, R1 y R2, siendo necesaria para la actividad enzimática la expresión de ambas proteínas. Las proteínas R1 y R2 son codificadas por genes diferentes en cromosomas independientes y, lo más importante, sus ARNm son expresados de forma diferenciada durante todo el ciclo celular. La proteína R1 es estable durante todo el ciclo celular, mientras que la R2 sólo es expresada durante la fase tardía G1/temprana S cuando se produce la replicación de ADN (Engstrom y col., 1985).
- 15 La inhibición de la R2 ha sido un objetivo de las terapias contra el cáncer y antivirales. No obstante, sería deseable disponer de nuevos inhibidores de la R2 dirigidos para el tratamiento de trastornos de proliferación celular tales como el cáncer o de infecciones por agentes patógenos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA SOLICITUD

- 20 Así, la presente solicitud proporciona inhibidores de la R2 y métodos y composiciones relacionados con los mismos que pueden lograr la inhibición de R2 en células diana. Las células diana incluyen en particular aquellas que experimentan una proliferación no deseada, como células cancerosas o tumorales, células que experimentan un crecimiento y/o proliferación excesivo asociado a determinadas enfermedades o estados (por ejemplo células T en enfermedades autoinmunes o rechazos en trasplantes) y agentes patógenos. Los inhibidores de la R2 de la solicitud pueden inhibir la R2 reduciendo la expresión de la R2 o una función biológica de la R2 (por ejemplo una actividad enzimática de la R2).
- 25 Un inhibidor de la R2 puede ser un ácido nucleico, una molécula pequeña, un péptido que incluye un anticuerpo, un derivado peptídico o un péptido mimético.

- 30 Ciertas realizaciones se refieren a inhibidores de R2 que son ácidos nucleicos. La invención proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden al menos una parte que se hibrida en un transcritto de R2 bajo determinadas condiciones (por ejemplo fisiológicas o intracelulares) y reduce la expresión del gen diana en una célula. El transcritto del gen diana puede ser cualquier transcritto previo al corte y empalme (es decir, incluye intrones) o posterior al corte y empalme, así como cualquier variante de corte y empalme. El transcritto del gen diana puede tener cualquiera de las secuencias indicadas como SEQ ID NO: 1-3. Ejemplos de categorías de ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, constructos de ARNi y constructos de ácido nucleico catalíticos. El ácido nucleico puede ser mono- o bicatenario. El ácido nucleico bicatenario también puede incluir regiones protuberantes (overhang) o de no complementariedad, donde una u otra cadena es monocatenaria. Un ácido nucleico monocatenario puede incluir regiones de autocomplementariedad, lo que significa que el compuesto forma una, así llamada, estructura de "horquilla" o de "tallo-bucle", con una región de estructura helicoidal doble. El ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos complementaria a una región consistente en no más de 1.000, no más de 500, no más de 250, no más de 100 o no más de 50 nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos del gen diana, tal como cualquiera de las designadas como SEQ ID NO: 1-3 (Figuras 1-2) o cualquier homólogo (por ejemplo ortólogos y parólogos) o variante de las mismas. La región de complementariedad tendrá preferentemente al menos 8 nucleótidos y opcionalmente al menos 10, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos. Una región de complementariedad puede estar situada dentro de un intrón, una secuencia codificadora o una secuencia no codificadora del transcritto del gen diana. En general, el ácido nucleico tendrá una longitud de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 500 nucleótidos o pares de bases, opcionalmente dicha longitud será de aproximadamente 14 a aproximadamente 50 nucleótidos. El ácido nucleico puede ser un ADN, un ARN o un híbrido ARN:ADN. Cualquiera de las cadenas puede incluir una mezcla de ADN y ARN y también formas modificadas que no se pueden clasificar fácilmente como ADN o como ARN. Del mismo modo, el ácido nucleico bicatenario puede ser ADN:ADN, ADN:ARN o ARN:ARN y cualquier cadena también puede incluir una mezcla de ADN y ARN además de formas modificadas que no se pueden clasificar fácilmente como ADN o como ARN. El ácido nucleico puede incluir cualquiera de múltiples modificaciones, incluyendo una o más modificaciones del esqueleto (la parte azúcar-fosfato en un ácido nucleico natural, incluyendo enlaces internucleótido) o en la parte base (la parte purina o pirimidina de un ácido nucleico natural). El ácido nucleico tendrá preferentemente una longitud de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 nucleótidos y con frecuencia incluirá una o más modificaciones para mejorar características tales como su estabilidad en suero, en una célula o en el lugar donde es probable que se administre el ácido nucleico, por ejemplo en el estómago en el caso de los ácidos nucleicos administrados vía oral y en los pulmones en caso de los ácidos nucleicos administrados por inhalación. En caso de un constructo de ARNi, la cadena complementaria al transcritto diana será generalmente un ARN o modificaciones del mismo. La otra cadena puede ser ARN, ADN o cualquier otra variación. La parte dúplex del constructo de ARNi con estructura de "horquilla"
- 55

bicatenaria o monocatenaria tendrá preferentemente una longitud de 18 a 30 nucleótidos, opcionalmente de aproximadamente 21 a 27 nucleótidos. Los ácidos nucleicos catalíticos o enzimáticos pueden ser ribozimas o enzimas de ADN y también pueden incluir formas modificadas. Los ácidos nucleicos aquí descritos pueden inhibir la expresión del gen R2 diana aproximadamente en un 50%, 75%, 90% o más cuando entran en contacto con células bajo condiciones fisiológicas y en una concentración donde un control sentido o sin sentido tiene poco o ningún efecto. Las concentraciones preferentes para evaluar el efecto de los ácidos nucleicos son 1, 5 o 10 micromolar. Los ácidos nucleicos aquí descritos también pueden estudiarse en relación con sus efectos sobre los fenotipos celulares. En el caso de ciertas líneas celulares cancerosas, después de administrar los ácidos nucleicos dirigidos se puede medir la muerte celular o la disminución de la tasa de expansión. Preferentemente, la expansión celular se inhibirá en más de un 50% con una concentración experimentalmente significativa del ácido nucleico.

En ciertos aspectos, la solicitud proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los diversos inhibidores de R2, por ejemplo ácidos nucleicos dirigidos a un gen R2 (o ácidos nucleicos dirigidos). En general, una composición farmacéutica incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender un ácido nucleico que se hibrida en el transcripto del gen diana bajo condiciones fisiológicas y disminuye la expresión del gen diana en una célula.

En determinadas secciones, la solicitud describe métodos para inhibir la expresión de un gen R2 en una célula. El método puede incluir poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un ácido nucleico que se hibrida en el transcripto de R2 diana bajo condiciones fisiológicas y disminuye la expresión del gen diana en la célula. En este método se puede utilizar cualquiera de los ácidos nucleicos dirigidos a R2 descritos. La célula puede ser una célula tumoral o cancerosa, una célula patógena o una célula normal. En determinadas realizaciones, la célula normal experimenta una proliferación no deseada que conduce a una determinada enfermedad o condición en un paciente.

En determinadas secciones, la solicitud describe métodos para reducir la tasa de crecimiento tumoral en un sujeto, incluyendo la administración de un inhibidor de R2 aquí descrito en cantidad suficiente para reducir la tasa de crecimiento del tumor. En ciertos aspectos, la solicitud describe métodos para tratar a un paciente que padece de cáncer, los cuales comprenden la administración al paciente de un inhibidor de R2 aquí descrito. El inhibidor de R2 puede ser un ácido nucleico, por ejemplo un ácido nucleico ARNi o un ácido nucleico catalítico, pudiéndose formular con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, el tumor incluirá una o más células cancerosas que expresan el gen al que está dirigido el ácido nucleico. El gen R2 diana puede estar sobreexpresado con respecto a una célula no cancerosa de un tejido comparable. El tumor también puede ser un tumor metastásico. Este tratamiento se puede combinar con al menos un agente quimioterapéutico adicional contra el cáncer que inhiba las células cancerosas de forma aditiva o sinérgica con el ácido nucleico. El ácido nucleico y el agente o los agentes contra el cáncer adicionales se pueden formular con antelación como una formulación combinada o se pueden formular de forma independiente y administrar de tal modo (por ejemplo tiempo de administración, dosificación) que se logre el efecto combinado.

En ciertos aspectos, la solicitud proporciona el uso de un ácido nucleico para producir un medicamento, por ejemplo para el tratamiento del cáncer o de una infección por un agente patógeno.

En determinadas secciones, la solicitud describe métodos para tratar a un paciente de cáncer, los cuales incluyen: (a) identificar en el paciente un tumor que tiene múltiples células cancerosas que expresan el gen de interés; y (b) administrar al paciente, de la forma conveniente, un ácido nucleico dirigido al gen en cuestión. Un método puede incluir, como parte diagnóstica, la identificación en el paciente de un tumor que tiene múltiples células cancerosas con una amplificación génica del gen diana. Las amplificaciones génicas se pueden detectar mediante diversos métodos, incluyendo por ejemplo la hibridación fluorescente *in situ* (*fluorescent in situ hybridization* - FISH) o el análisis de microarrays de oligonucleótidos representativos (*representational oligonucleotide microarray analysis* - ROMA).

En determinadas secciones, la solicitud describe métodos y composiciones para eliminar o reducir un agente patógeno de un paciente infectado o de un objeto contaminado por el agente patógeno.

Otra sección de la presente solicitud describe un producto farmacéutico envasado. Dicho producto farmacéutico envasado comprende: (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor aquí descrito dirigido a un gen de R2; y (ii) instrucciones y/o una etiqueta para la administración del inhibidor de R2 para el tratamiento de pacientes tumorales que expresan el gen R2.

La presente solicitud también describe un desinfectante envasado. El desinfectante envasado puede ser específico contra uno o más agentes infecciosos tales como agentes patógenos. Dicho desinfectante envasado comprende: (i) una cantidad eficaz de un inhibidor de R2 dirigido a un gen de R2 en el agente infeccioso; y (ii) instrucciones y/o una etiqueta para la administración del inhibidor de R2 para eliminar o reducir la cantidad de agente infeccioso.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: secuencia de ADNc de la ribonucleótido-reductasa M2 humana (Nº de Acceso a GenBank NM_001034) (SEQ ID NO 1). Los tres tramos de 11 bases subrayados y en negrita corresponden a las secuencias diana de núcleo representadas por las SEQ ID NO: 4-6.

- Figura 2: secuencias de ADNc de la Subunidad Pequeña de la Ribonucleótido-Reductasa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Figura 2A) (SEQ ID NO 2) y de la Subunidad Pequeña de la Ribonucleótido-Reductasa del Virus Herpes Humano 4 (Figura 2B) (SEQ ID NO 3).
- Figura 3: tinción inmunohistoquímica de R2 en tejido hepático humano normal (Figura 3A) y en tejido de carcinoma hepatocelular (HCC) (Figura 3B). Las imágenes se han tomado con un aumento 400x. La expresión de R2 aumenta de forma detectable en el tejido hepático de HCC. Se fija tejido de HCC humano recién extirpado en paraformaldehído al 4%, se embebe en parafina y se cortan secciones de 2 a 5 µm. Después de desparafinar y rehidratar con alcoholes de grado, los portaobjetos se someten a recuperación de antígenos por microondas (Antigen Unmasking Solution; Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se marcan con anticuerpo antihumano anti-RRM2 de ratón (dilución 1:40, Covance, Philadelphia, PA) y un anticuerpo secundario utilizando IgM de ratón (diluido 1:400, Vector Laboratories). Las imágenes se capturan con una cámara de dispositivo de acoplamiento de carga refrigerado (Magnafire; Olympus, Melville, NY) y se llevan a Adobe Photoshop (Adobe System, Mountain View, CA) como archivos TIFF, se imprimen con una impresora Xerox Phaser 860DP. Se lleva a cabo una tinción con hematoxilina y eosina (H & E) utilizando un protocolo estándar.
- Figura 4: diseño de ARNsi dirigidos a R2. El emplazamiento de los sitios diana dentro del ARNm de R2 humano (hRRM2) se designa A, B y C en el caso de los nuevos sitios diana de acuerdo con la presente solicitud y X, Y y Z en el caso de sitios diana publicados.
- Figura 5: ensayo de desplazamiento en gel donde se analiza la unión de ARNsi a R2 diana. Las rutas 3, 4 y 5 muestran el desplazamiento en gel de R2 utilizando ARNsi dirigidos a las regiones A, B y C, respectivamente, tal como muestra la Figura 4. Las secuencias de los ARNsi utilizados son las SEQ ID NO 7 y 8 (sitio diana A), SEQ ID NO 9 y 10 (sitio diana B) y SEQ ID NO 11 y 12 (sitio diana C). El ARNsi dúplex dirigido al sitio A muestra una fuerte unión (ruta 3).
- Figuras 6A y 6B: muestran que la potencia intracelular de los ARNsi (Figura 6A) se correlaciona con la afinidad de unión de éstos a la diana (Figura 6B). La Figura 6C muestra diversos ARNsi dirigidos a EGFP.
- Figura 7: sub-regulación de R2 en diversas líneas celulares por determinados ARNsi de la solicitud. La Figura 7A muestra un *western blot* del Nivel Proteínico hRRM2 en células HeLa tratadas con diversos ARNsi, según se indica. La Figura 7B muestra los resultados de experimentos *western blot* en lisados de diversos tipos celulares transfectados con ARNsi dirigidos a los sitios A, B y C, un ARNsi control y un oligodesoxinucleótido antisentido contra hRRM2 (GTI-2040).
- Figura 8: constructo de fusión de R2-luciferasa para cribar ARNsi contra R2 ("plásmido pR2Luc"). Las células se pueden cotransfectar con el plásmido pR2Luc y un ARNsi contra R2. La cuantificación del nivel de luciferasa se correlaciona con la reducción de la expresión de R2.
- Figura 9: resultados de experimentos de traslape (*tiling*). Las Figuras 9A, 9B y 9C ilustran los resultados de experimentos de traslape realizados en los sitios diana A, B y C, respectivamente. Para cada sitio diana se sintetizan ocho o más secuencias 21meras diferentes adyacentes (+ o -) a cada uno de los tres sitios diana identificados originalmente (traslape) y se comparan a tres dosis cada una (10 nM, 1 nM y 0,2 nM). La Figura 9D ilustra el diseño experimental de los experimentos de traslape.
- Figura 10: muestra que el uso de pR2Luc en el experimento de traslape conduce al descubrimiento de ARNsi sumamente potentes. siRRM2A, siRRM2B y siRRM2C son ARNsi dirigidos contra el sitio diana A (de SEQ ID NO 7 y 8), el sitio diana B (de SEQ ID NO 9 y 10) y el sitio diana C (de SEQ ID NO 11 y 12), respectivamente; siRRM2B+3 y siRRM2B+5 son dúplex traslapados del sitio diana B que aumentan su potencia en comparación con el ARNsi dúplex del sitio B original; GTI-2040 es un oligodesoxinucleótido antisentido dirigido contra R2; si(GTI-2040) es un ARNsi dirigido al mismo sitio que el oligodesoxinucleótido antisentido GTI-2040; si(JBC, 2004) es un ARNsi contra R2 previamente publicado.
- Figura 11: resultado de experimentos de traslape adicionales utilizando dúplex alrededor del sitio diana B (traslape B+3 a B+10). El dúplex B+5 sigue siendo el dúplex más potente examinado y el dúplex B+9 se revela como el segundo dúplex más potente.
- Figura 12: sub-regulación dosis-dependiente de una proteína de fusión de R2-luciferasa con ARN 21mero y 27mero.
- Figura 13: muestra que la sub-regulación de la fusión de R2-luciferasa inducida por ARNsi se correlaciona con sub-regulación de R2 endógena. Se comprueba que el siRRM2B+5 dúplex es sumamente potente en estudios de cotransfección con pR2Luc. Como muestra la figura, la transfección de siRRM2B+5 dúplex sólo en células Hep3B conduce a un silenciamiento (*knockdown*) específico de la secuencia de R2 endógena 1 día, 2 días y 3 días después de la transfección. Las células se transfectan con 20 nM de siRRM2B+5 o siCON1 (dúplex de control no dirigido #1 de Dharmacon).

- Figura 14: muestra que un ARNsi contra R2 induce la apoptosis en células lipofectadas. Células HCC humanas cultivadas (HepG2) se transfectan con ARNsi contra R2 (siRRM2B+5) o con un ARNsi de control no dirigido (siCON1) y después se analizan en cuanto a la apoptosis 1 día, 2 días o 3 días después de la transfección.
- 5 Figura 15: muestra que un ARNsi contra R2 aumenta la apoptosis farmaco-inducida en células HCC humanas. Células HCC humanas cultivadas (HepG2) se transfectan con ARNsi contra R2 (siRRM2B+5) o con un ARNsi de control no dirigido (siCON1) y después se someten a tratamiento con adriamicina (100 nM) durante 3 días. A continuación se determina el nivel de apoptosis.
- 10 Figura 16: muestra que un ARNsi contra R2 reduce la expresión de R2 *in vivo*. Un plásmido codificador de un gen de fusión de R2-luciferasa (pR2Luc) se inyecta junto con ARNsi contra R2 (siRRM2B+5) o un con ARNsi de control no dirigido (siCON1) en ratones BALB/c. La expresión de los genes de fusión se sigue por imágenes de bioluminiscencia del animal completo. La Figura 16A es una representación gráfica que resume la expresión de los genes de fusión durante 17 días. La Figura 16B muestra imágenes representativas tomadas 2 días después de la inyección.
- 15 Figura 17: muestra que un ARNsi contra R2 (siR2B+5) reduce el potencial de crecimiento de células HCC humanas cultivadas (células Hep3B). Células de carcinoma hepatocelular (HPP) humanas (Hep3B) se diluyen y disponen en placas y después se transfectan con ARNsi de control no dirigido (siCON1) o con ARNsi contra R2 (siR2B+5) (5 nM). Cinco días después de la transfección, las células se fijan, se tiñen (azul de metileno) y se recuentan las colonias (~50 o más células). Como se muestra, el ARNsi contra R2 (siR2B+5) reduce significativamente el potencial de formación de colonias celulares Hep3B en comparación con el ARNsi de control no dirigido (siCON1). Las columnas representan el promedio de n=3 pocillos replicados; las barras de error representan la desviación estándar.
- 20
- Figura 18: muestra que la potencia del ARNsi contra R2 se correlaciona con la capacidad de reducir el potencial de crecimiento celular HCC humanas cultivadas (células Hep3B). Células de carcinoma hepatocelular (HPP) humanas (Hep3B) se diluyen y disponen en placas y después se transfectan con uno de cinco ARNsi (siR2B+3, siR2B+5, siR2B+6, siR2B+7, siR2B+9) (5 nM) que previamente han demostrado tener una potencia variable contra R2 (véase por ejemplo la Figura 11). Cinco días después de la transfección, las células se fijan, se tiñen (azul de metileno) y se recuentan las colonias (~50 o más células). Como se muestra, la capacidad del ARNsi para reducir la formación de colonias (esta figura) tiene gran correlación con su potencia para disminuir R2 (véase la Figura 11), por ejemplo siR2B+3, siR2B+5, siR2B+9 » siR2B+6, siR2B+7. Las columnas representan el promedio de n=3 pocillos replicados; las barras de error representan la desviación estándar.
- 25
- Figura 19: muestra que la reducción del potencial de crecimiento de células Hep3B con un ARNsi contra R2 (siR2B+5) se incrementa por exposición a 5-fluorouracilo (5-FU). Células de carcinoma hepatocelular (HPP) humanas (Hep3B) se diluyen y disponen en placas y después (1) se transfectan con ARNsi dirigido contra luciferasa (Luc105-21) o ARNsi contra R2 (siR2B+5) (5 nM) durante 4 horas y/o (2) se exponen a 5-fluorouracilo (5-FU) 5 mM durante 3 días comenzando 48 horas después de la transfección. Cinco días después de la transfección, las células se fijan, se tiñen (azul de metileno) y se recuentan las colonias (~50 o más células). Como se ha visto previamente, el siR2B+5 reduce las cantidades de colonias en comparación con un control no dirigido a R2 (en este caso Luc105-21). El 5-FU solo (sin exposición a ARNsi) reduce las cantidades de colonias en comparación con células no tratadas y la exposición a 5-FU después de un tratamiento con siR2B+5 disminuye todavía más las cantidades de colonias. Las columnas representan el promedio de n=3 pocillos replicados; las barras de error representan la desviación estándar.
- 30
- Figura 20: muestra que un ARNsi contra R2 reduce los niveles de proteína R2 en tumores Hep3B subcutáneos en ratones. Se administra a ratones con tumores subcutáneos de carcinoma hepatocelular humano (Hep3B) una inyección intratumoral (IT) diaria de 2,5 mg/kg de ARNsi (bien un ARNsi de control no dirigido (siCON1), bien ARNsi contra R2 (siR2B+5)) durante tres días consecutivos con un sistema de suministro polimérico. Dos días después de la tercera inyección, los ratones se sacrifican y los tumores se fijan, se embeben en parafina, se seccionan y se realiza una inmunohistoquímica (IHC) para evaluar los niveles de proteína R2 tumoral. En dos de tres ratones tratados con las formulaciones que contienen ARNsi contra R2, los niveles de proteína R2 tumoral se reducen claramente en comparación con los niveles en ratones tratados con ARNsi de control no dirigido. Esto sugiere que una inyección intratumoral diaria de formulaciones que contienen siR2B+5 durante tres días consecutivos logra una disminución de la proteína R2 en estos tumores. Se califica utilizando la siguiente escala: + = nivel bajo de proteína R2, ++ = nivel moderado de proteína R2, y +++ = niveles altos de proteína R2.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- Figura 21: muestra que un ARNsi contra R2 reduce los niveles de proteína R2 en células de hepatoma de rata cultivadas (McA-RH7777). Las células de hepatoma de rata (McA-RH7777) se disponen en placas y después se transfectan con una molécula antisentido contra R2 (GTI-2040; 1 nM o 20 nM), ARNsi
- 60

contra luciferasa (Luc105-21; sólo 20 nM), un ARNsi 21mero contra R2 (siR2B+5; 1 nM o 20 nM) o un 25/27mero contra R2 (siR2B+5-27; 1 nM o 20 nM). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se someten a lisis y los niveles de proteína R2 se miden por *Western blot* y se cuantifican utilizando el *software* ImageQuant. Todas las moléculas dirigidas contra R2 (GTI-2040 antisentido, siR2B+5 21mero y 25/27mero) muestran reducciones de los niveles de proteína R2 dosis-dependientes que son superiores a las de un control negativo (Luc105-21, ARNsi contra luciferasa). Las reducciones de R2 del siR2B+5 21mero y 25/27mero son comparables entre sí y son superiores a la observada con la molécula antisentido GTI-2040.

5

Figura 22: representación esquemática de un método para preparar partículas modelo para suministrarlas a hepatocitos. La presencia o ausencia del compuesto de galactosa-PEG dan como resultado perlas que contienen galactosa o perlas PEGiladas, respectivamente.

10

Figura 23: granulometría mediante dispersión dinámica de luz (*dynamic light scattering* - DLS) de partículas preparadas para el suministro de un ARNsi. La Figura 23(a) muestra la granulometría de la perla modelo Gal-50. La Figura 23(b) muestra la granulometría de una partícula de ARNsi formulada, formada mediante autoensamblaje con un policatión lineal que contiene ciclodextrina y un modificador basado en PEG que contiene galactosa.

15

Figura 24: muestra la retención en el hígado de las partículas Gal-50, MeO-50, Gal-140 y MeO-140 inyectadas por la vena caudal de ratones 20 minutos después de la inyección.

Figura 25: muestra secciones hepáticas de ratones sometidos a inyecciones de partículas de diferentes tamaños por la vena caudal. La imagen izquierda muestra que las perlas Gal-140 (que tienen un diámetro de 140 nm) prácticamente no están presentes en la sección hepática (Figura 25A). La imagen derecha muestra que las perlas Gal-50 (que tienen un diámetro de 50 nm) están presentes en la sección hepática (Figura 25B).

20

Figura 26: imagen TEM que muestra que las partículas de Gal-140 están localizadas dentro de una célula de Kupffer y no llegan al interior de los hepatocitos.

25

Figura 27: representación esquemática de funcionalización de grupo terminal CDP para producir CDP-im (CDP que contiene imidazol).

Figura 28: muestra el efecto de la hidrofobicidad policatiónica en la toxicidad. Como se muestra, el componente de ciclodextrina en AP5 reduce la citotoxicidad.

Figura 29: CDP-im como vehículo de administración para suministrar ARNsi a células *in vitro*. Células de sarcoma de Ewing humanas (TC-71) cultivadas se exponen a formulaciones que contienen siEFBP2 (secuencia para dirigir a la proteína de fusión EWS-FLI1) preparadas con Oligofectamine (OFA) o policatión que contiene ciclodextrina (CDP-im) durante 4 horas. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se lisan y la proteína celular total se desnaturaliza, se somete a electroforesis y transfiere a una membrana PVDF tratada con anticuerpos para EWS-FLI1 o actina, cuantificándose por análisis *Western blot*. Se determina la intensidad de banda media por densitometría y se calculado la relación entre EWS-FLI1 y la actina. El siEFBP2mut es un ARNsi siEFBP2 aleatorizado utilizado como control negativo.

30

35

Figura 30: imágenes TEM de células poliplex de BHK expuestas a CDP/ADNp (paneles a, c y d) o a CDP-im/ADNp (paneles b, e y f). En (a) y (b), las vesículas intracelulares están cercanas a la membrana celular y no a pH bajo. En (c-f), las vesículas están cercanas a la membrana nuclear y a valores de pH cercanos a f. En (e) y (f) se observa un desempaque complejo, mientras que en (c) y (d) no se observa.

40

Figura 31: representación esquemática de la modificación superficial de poliplex que contiene ciclodextrina (por ejemplo PEGilado o dirigido) y de la formación de complejos de inclusión con conjugados de adamantano (AD)-PEG y β -ciclodextrina. La Figura 31A es una representación esquemática de la modificación superficial de poliplex que contiene ciclodextrina. La Figura 31B es una representación esquemática de la formación de complejos de inclusión con conjugados de adamantano (AD)-PEG (2° componente del sistema) y β -ciclodextrina. El ligando (L) es para interactuar con los receptores de la superficie celular. Las partículas modificadas pueden estar bien definidas y ser estables en las condiciones utilizadas para la transfección *in vitro* y estudios *in vivo*.

45

50

Figura 32: ejemplos de los componentes modificadores ilustrados en la Figura 31. El modificador de glucosa se utiliza como control para investigaciones de la diana galactosa.

Figura 33: muestra la estabilización de las partículas poliplex en una solución salina 50 mM. La estabilización completa se logra con AD-PEG5K (PEG5K es un PEG con un peso molecular de 5000). La adición de PEG5K (control) no produce ninguna estabilización. El aumento de tamaño no se debe a una

55

reestructuración de partículas, sino a una agregación de partículas iniciales de 60 nm (confirmado mediante imágenes TEM).

- Figura 34: muestra el tamaño de las partículas formadas combinando CDP y AD-PEG5000 (AD-PEG5K) antes de la adición de ADN plásmido (ADNp). Las partículas se formulan en una proporción de 1 mg ADN/ml diluido en PBS. La estabilización completa en sal 150 mM con una dilución en un factor superior a 1.000 se logra con AD-PEG5K.
- Figura 35: muestra el suministro del gen luciferasa utilizando diferentes poliplexos tal como se indica. (a) Células HepG2 que contienen el receptor superficial de asialoglicoproteína (ASGP). (b) Células HeLa que no contienen el receptor superficial. Por los receptores superficiales se puede influir en la absorción celular.
- Figura 36: ejemplo de carga superficial ajustable en partículas por el uso de un segmento aniónico en el agente modificador. Un 100% de AD-aniónico-PEG representa una relación molar 1:1 entre el adamantano (AD) y la ciclodextrina (CD) en el sistema.
- Figura 37: representación esquemática de autoensamblaje de partículas poliplex.
- Figura 38: ensayos de turbidez en medios de cultivo (A) o 100% FBS (B) de diversas partículas poliplex después de 1 hora. Los poliplexos no PEGilados forman agregaciones, mientras que los PEGilados no forman agregaciones tal como están formulados ni después de retirar los componentes no ligados.
- Figura 39: muestra que las partículas completamente formuladas no activan el sistema complementario. CDPPEGTf indica una partícula completamente formulada con una relación de carga de 3,18 o 5,3 (+/-).
- Figura 40: muestra que el CDP suministra ARNsi a células en cultivo. La Figura 40A muestra análisis FACS de ARNsi desnudo y formulado con CDP marcado con FITC en células HeLa (el ARNsi 100 mM se expone a células HeLa durante 2 horas). La Figura 40B muestra una imagen confocal del suministro de CDP de ARNsi marcado con FITC en células HeLa (el ARNsi 100 mM se expone a células HeLa durante 4 horas).
- Figura 41: compara los resultados de RT-PCR de ratones BALB/c a los que se inyecta 50 µg de ARNsi en diferentes formulaciones de administración mediante inyección a alta presión en la vena caudal (HPTV; 2 ml de volumen inyectado) o inyección a baja presión en la vena caudal (LPTV; 0,2 ml de volumen inyectado).
- Figura 42: muestra el ensamblaje de partículas dirigidas a transferrina (Tf) para el suministro de ARNsi. La Figura 42A muestra los componentes del sistema de suministro. La Figura 42B muestra el ensamblaje de las partículas dirigidas y no dirigidas.
- Figura 43: muestra el suministro de un ARNsi contra luciferasa por partículas que contienen transferrina (Tf).
- Figura 44: curvas de crecimiento de tumores injertados en ratones NOD/scid sometidos a diferentes tratamientos tal como se indica. Se representa la señal bioluminiscente tumoral integrada mediana (fotones/segundo) para cada grupo de tratamiento [n = 8-10] en función del tiempo después de la inyección (en todos los casos a 50 µg ARNsi). Grupos: (A) D5W control, (B) siEFBP2 desnudo, (C) completamente formulado con una secuencia de control (CON#1), (D) completamente formulado con siEFBP2 y (E) formulado sin ligando de transferrina con siEFBP2.
- Figura 45: inhibición del crecimiento tumoral con un ARNsi formulado en partículas que contienen Tf (imagen izquierda) e inhibición específica de secuencia del ARNm diana con el ARNsi. La Figura 45A muestra la inhibición del crecimiento tumoral en tumores TC-71 establecidos, utilizando tres inyecciones diarias (días 34, 35, 36) de 50 µg de ARNsi para EWS-FRL1 en partículas que contienen Tf. La Figura 45B muestra los datos PCR de tumores después de dos inyecciones diarias, que demuestran la inhibición específica de secuencia de EWS-FLI1-ARNm.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA SOLICITUD

Sinopsis

La subunidad R2 de la ribonucleótido-reductasa (RNR) es una diana terapéutica deseable porque la expresión de R2 se regula durante todo el ciclo celular, la R2 parece ser un gen esencial (Kittler y col. (2004), Nature 432:1036-1040) y la estructura de la proteína R2 ha sido descrita (Cerquería y col. (2005), Curr. Med. Chem. 12:1283). A diferencia de la subunidad R1 de RNR, de la que hay un exceso de un nivel relativamente constante durante todo el ciclo celular, la síntesis de R2 comienza en la fase temprana S y se va acumulando lentamente en la célula hasta la mitosis tardía, momento en que se degrada rápidamente. La expresión de R2 se detecta en diversos tejidos humanos y líneas celulares tumorales (Zhou y col. (2003), Cancer Research 63:6583-6594). En determinados tejidos, la expresión de R2

está por debajo del nivel detectable en células normales de dichos tejidos, pero se hace detectable o aumenta en las células anormales (por ejemplo tumorales o cancerosas) de estos tejidos. Por ejemplo, la expresión de R2 es prácticamente indetectable por *western blot* o inmunotinción en células hepáticas normales, pero se puede detectar en caso de carcinoma de hepatocito (Figura 3). Por tanto, la inhibición de R2 puede resultar útil para tratar enfermedades o trastornos asociados a la proliferación celular, incluyendo, por ejemplo, cáncer, infecciones por agentes patógenos, etc.

La inhibición de R2 se puede lograr inhibiendo la actividad biológica de R2 en una célula, por ejemplo la actividad enzimática. Alternativamente, la inhibición de R2 se puede lograr inhibiendo la expresión de un gen de R2 en una célula. Existen células pequeñas y ácidos nucleicos para disminuir la actividad y/o expresión de R2. Los ejemplos incluyen inhibidores de dimerización que son péptidos o derivados peptídicos (por ejemplo, patente US 6.030.942, o el pentapéptido Val Val Asn Asp Leu tal como se describe en la patente US 4.845.195), inhibidores catalíticos (por ejemplo barredores de radicales libres o quelantes de hierro), moléculas antisentido (por ejemplo GTI-2040, Lorus Therapeutics, Inc.), moléculas de ARNs de acuerdo con la descripción de Lin y col. (2003), J. Biol. Chem. 279:27030, y Duxbury y col. (2004), Oncogene 28:1539. No obstante, sigue siendo deseable disponer de nuevos y mejores inhibidores de R2 como nuevas herramientas para disminuir la R2.

15 *Inhibidores de ácido nucleico de R2*

En determinados aspectos, la solicitud proporciona inhibidores de ácido nucleico de un gen de R2 y métodos para inhibir o reducir la actividad de un gen o proteína R2, por ejemplo reduciendo o disminuyendo la expresión del gen R2. Por "inhibir" o "reducir" se quiere indicar que la expresión del gen o el nivel de ácidos nucleicos o de ácidos nucleicos equivalentes que codifican una o más proteínas o subunidades proteicas se reducen por debajo de lo observado en ausencia de los agentes de ácido nucleico de la solicitud.

Tal como se utilizan aquí, los conceptos "ácido nucleico" o "agente de ácido nucleico" se refieren a cualquier compuesto basado en ácidos nucleicos que contiene nucleótidos y que tiene el efecto deseado en un gen R2. Los ácidos nucleicos pueden ser mono-, bi- o policatenarios y pueden comprender nucleótidos modificados o no modificados o no-nucleótidos o mezclas diversas y combinaciones de éstos. Ejemplos de agentes de ácidos nucleicos de la solicitud incluyen, de forma no exclusiva, ARNs, ARNs y ácidos nucleicos enzimáticos.

En determinadas realizaciones, la solicitud proporciona inhibidores de ácido nucleico dirigidos a un gen de R2 o a un ARNm de una o más especies, incluyendo eucariotas y procariotas. En determinadas realizaciones, los inhibidores de ácido nucleico pueden diseñarse de modo que inhiben específicamente la expresión de un gen de R2 o una secuencia de ARNm de determinadas especies, pero no inhiben la expresión de un gen de R2 o de un ARNm de otras especies. Por ejemplo, un inhibidor de ácido nucleico útil para el tratamiento de una infección por agentes patógenos puede diseñarse de modo que inhibe específicamente la expresión de un gen R2 o de un ARNm en el agente patógeno, pero no inhibe la expresión del gen R2 o ARNm en el huésped. Un inhibidor de ácido nucleico útil para el tratamiento de una infección bacteriana puede inhibir la expresión de un gen de R2 procariota o la expresión de ARNm, pero no inhiben la expresión de un gen R2 eucariota o la expresión de ARNm eucariota. Ejemplos de secuencias de ADNc de R2 de diversas especies se muestran en las figuras 1 y 2.

La base de datos EMBL incluye dos secuencias EST que reflejan una parte de la secuencia SEQ ID NO 1 (véase DATABASE EMBL 12 de agosto de 2002 (12-08-2002), XP002407222 recuperado de la base de datos EBI con el número de acceso BQ670934 y DATABASE EMBL 9 de marzo de 2002 (09-03-2002), Kim y col.: XP002407223 recuperado de la base de datos EBI con el número de acceso BM754277). Sin embargo, la primera entrada de la base de datos sólo da a conocer una EST de 901 nucleótidos que abarca por completo los nucleótidos 422-485 de la SEQ ID NO 1, mientras que la segunda entrada de la base de datos describe una secuencia EST de 122 nucleótidos que se solapa parcialmente con esta región (residuos 422-474 o 422-485). Ni la primera ni la segunda de estas entradas de la base de datos EMBL presentan ninguna secuencia que se hibride en los nucleótidos 422-485.

Además, el documento WO 02/024864 describe un oligonucleótido 20 (SEQ ID NO 129 del documento WO 02/024864) que se hibrida en los residuos 422-485 de la SEQ ID NO 1. Sin embargo, el oligonucleótido representado por la SEQ ID NO 129 de la Tabla 1 del documento WO 02/024864 indica que este oligonucleótido está dirigido a la SEQ ID NO 17 del documento WO 027024864, un gen identificado como "proteína que interacciona con la sintaxina 4". Específicamente, la Tabla 1 indica que este oligonucleótido se hibrida comenzando por la posición de nucleótido 1516 de la SEQ ID NO 17. Aunque parece que el oligonucleótido de SEQ ID NO 129 del documento 02/024864 se debería hibridar en las posiciones 1516-1535 de la SEQ ID NO 17 del documento 02/024864, los Solicitantes no han encontrado ningún tramo de residuos al menos dentro de la región codificadora de la SEQ ID NO 17 (residuos 300-1961) que corresponde a los residuos 422-485 de la SEQ ID NO 1 de la solicitud en cuestión.

Además, Lin, Z. Ping y col. (Lin Z Ping y col.: "Stable suppression of the R2 subunit of ribonucleotide reductase by R2-targeted short interference RNA sensitizes p53(-/-) HCT-116 colon cancer cells to DNA-damaging agents and ribonucleotide reductase inhibitors", 25 de junio de 2004 (25-06-2004), Journal of Biological Chemistry, vol. 279, N° 26, pág.: 27030-27038, XP002407218 ISSN: 0021-9258) y Duxbury Mark S. y col. (Duxbury Mark S. y col.: "RNA interference targeting the M2 subunit of ribonucleotide reductase enhances pancreatic adenocarcinoma chemosensitivity to gemcitabine", 26 de febrero de 2004 (26-02-2004), Oncogene, 26 de febrero de 2004, vol. 23, n° 8, pág.:1539-1548, XP002407219, ISSN: 0950-9232) dan a conocer la supresión de la expresión de la subunidad R2 de la ribonucleótido

reductasa utilizando ARNsi. Sin embargo, ninguno de estos documentos da a conocer o trata de ácidos nucleicos tal como se describen más abajo, en particular oligonucleótidos que corresponden a los residuos 422-485 de la SEQ ID NO 1 de la solicitud en cuestión y son adecuados para reducir la expresión de una subunidad 2 (R2) de la ribonucleótido-reductasa en una célula mediante un mecanismo de interferencia por ARN.

- 5 En determinadas realizaciones, la solicitud proporciona inhibidores de ácido nucleico de un gen de R2 que están dirigidos a una o más regiones específicas dentro de un gen de R2. Ejemplos de regiones dentro del gen de R2 humano incluyen las regiones diana de núcleo mostradas más abajo en la Tabla 1 (véase también la Figura 1). En general, una secuencia diana de núcleo se refiere a una parte del gen de R2 diana, o de ARNm correspondiente, que inhibe eficazmente la expresión de R2 en una unión específica de secuencia mediante un ácido nucleico inhibidor tal como, por ejemplo, un ARNds, un ARNsi o un ácido nucleico enzimático. En general, un inhibidor de ácido nucleico se puede hibridar bajo condiciones estrictas en una región de una proteína R2 que comprende una secuencia diana de núcleo, o una parte de un gen de R2 o un ARNm que comprende 5, 10 o 20 nucleótidos flanqueando uno o los dos extremos de las regiones diana de núcleo dentro del gen de R2 o la secuencia de ARNm, por ejemplo un sitio diana de núcleo ± 5 , ± 10 o ± 20 nucleótidos en uno o en los dos extremos. Las secuencias diana de núcleo mostradas en la Tabla 1 se obtienen de la secuencia R2 humana. No obstante, aquí también se contemplan las regiones equivalentes dentro de las secuencias R2 de otras especies, incluyendo otros eucariotas tales como otros mamíferos.

Tabla 1 Secuencias diana de núcleo de R2

Descripción	Secuencia	SEQ ID N°
RRM2-444 Núcleo	5' cgaguaccaug 3'	SEQ ID NO 4
RRM2-632 Núcleo	5' gauuuagccaa 3'	SEQ ID NO 5
RRM2-928 Núcleo	5' aagaacgagg 3'	SEQ ID NO 6

Constructos de ARNds y ARNi

- 20 En determinadas realizaciones, la solicitud se refiere a ARN bicatenarios (ARNds) y constructos de ARNi. Tal como se utiliza aquí, el término “ARNds” se refiere a una molécula de ARN bicatenario capaz de interferencia en ARN (ARNi), incluyendo ARNsi (véase, por ejemplo, Bass, 2001, Nature, 411, 428-429; Elbashir y col., 2001, Nature, 411, 494-498; y Kreutzer y col., Publicación PCT WO 00/44895; Zernicka-Goetz y col., Publicación PCT WO 01/36646; Fire, Publicación PCT WO 99/32619; Plaetinck y col., Publicación PCT WO 00/01846; Mello y Fire, Publicación PCT WO 01/29058; Deschamps-Depaillette, Publicación PCT WO 99/07409; y Li y col., Publicación PCT WO 00/44914). Además, ARNi es un término aplicado inicialmente a un fenómeno observado en plantas y gusanos, donde un ARN bicatenario (ARNds) bloquea la expresión genética de un modo específico y post-transcripcional. El ARNi constituye un método útil para inhibir o reducir la expresión genética *in vitro* o *in vivo*.

- 30 Tal como se utilizan aquí, los conceptos “ARN interferente pequeño”, “ARNsi” o “ácido nucleico interferente pequeño” se refieren a cualquier ácido nucleico capaz de mediar en el silenciamiento génico o en ARNi cuando se procesa apropiadamente por una célula. Por ejemplo, el ARNsi puede ser una molécula de polinucleótido bicatenaria que comprende regiones sentido y antisentido autocomplementarias, teniendo la región antisentido complementariedad con un gen diana. El ARNsi puede ser un polinucleótido de horquilla monocatenaria que incluye regiones sentido y antisentido autocomplementarias, teniendo la región antisentido complementariedad con un gen diana. El ARNsi puede ser un polinucleótido monocatenario circular que tiene dos o más estructuras de bucle y un tallo que comprende regiones sentido y antisentido autocomplementarias, teniendo la región antisentido complementariedad con un gen diana, y pudiendo ser procesado el polinucleótido circular *in vivo* o *in vitro* para generar un ARNsi activo capaz de mediar en el ARNi. El ARNsi también puede comprender un polinucleótido monocatenario que tiene complementariedad con un gen diana, pudiendo incluir el polinucleótido monocatenario adicionalmente un grupo fosfato terminal, tal como un 5'-fosfato (véase, por ejemplo, Martínez y col., 2002, Cell, 110, 563-574) o un 5',3'-difosfato. En determinadas realizaciones, los ARNsi son ácidos nucleicos no enzimáticos que se unen a un ácido nucleico diana y alteran la actividad del ácido nucleico diana. La unión y/o actividad del ARNsi se pueden facilitar mediante interacción con una o más proteínas o complejos proteínicos, tal como el complejo de silenciamiento inducido por ARN (o RISC - *RNA Induced Silencing Complex*). En determinadas realizaciones, los ARNsi comprenden una secuencia complementaria a una secuencia diana a lo largo de una secuencia contigua simple de una cadena de la molécula de ARNsi.

- Opcionalmente, los ARNsi de la solicitud contienen una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones fisiológicas (por ejemplo en un medio celular) en la secuencia de nucleótidos de al menos una parte del transcrito de ARNm para el gen a inhibir (el gen “diana”). El ARN bicatenario sólo ha de ser lo suficientemente similar al ARN natural como para poder mediar en el ARNi. Así, la solicitud tiene la ventaja de tolerar variaciones de secuencia esperables debido a mutaciones genéticas, polimorfismo de cadena o divergencias evolutivas. La cantidad de desapareamientos de nucleótidos tolerados entre la secuencia diana y la secuencia de ARNsi no es superior a 1 de cada 5 pares de bases o 1 de cada 10 pares de bases o 1 de cada 20 pares de bases o 1 de cada 50 pares de bases. Los desapareamientos en el centro del ARNsi dúplex son sumamente críticos y pueden suprimir esencialmente la segmentación del ARN diana. En

5 cambio, los nucleótidos del extremo 3' de la cadena de ARNsi complementaria al ARN diana no contribuyen de forma significativa a la especificidad del reconocimiento de la diana. La identidad de secuencia se puede optimizar mediante comparación de secuencias y algoritmos de alineación conocidos en la técnica (véase Gribskov y Devereux, Sequence Analysis Primer, Stockton Press, 1991 y las referencias allí citadas) y calculando la diferencia porcentual entre las secuencias de nucleótidos mediante, por ejemplo, el algoritmo Smith-Waterman tal como se ejecuta con el programa de software BESTFIT utilizando parámetros por defecto (por ejemplo, University of Wisconsin Genetic Computing Group). Es preferente una identidad de secuencia entre el ARNsi y la parte del gen diana superior al 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, o incluso una identidad de secuencia del 100%. Alternativamente, la región dúplex del ARN se puede definir funcionalmente como una secuencia de nucleótidos capaz de hibridarse con una parte del transcripto del gen diana bajo condiciones estrictas (por ejemplo, NaCl 400 mM, PIPES 40 mM pH 6,4, EDTA 1 mM, 50°C o 70°C, hibridación durante 12-16 horas seguida de lavado).

15 La estructura bicatenaria del ARNds puede estar formada por una cadena de ARN autocomplementaria, dos cadenas de ARN complementarias o una cadena de ADN y una cadena de ARN complementaria. Opcionalmente se puede iniciar la formación de ARN dúplex dentro o fuera de la célula. El ARN se puede introducir en tal cantidad que permita el suministro de al menos una copia por célula. Dosis mayores (por ejemplo de al menos 5, 10, 100, 500 o 1.000 copias por célula) de material bicatenario pueden producir una inhibición más eficaz, mientras que dosis menores también pueden ser útiles para aplicaciones específicas. La inhibición es específica de secuencia, ya que las secuencias de nucleótidos correspondientes a la región dúplex del ARN son las dianas para la inhibición.

20 Tal como se describen aquí, los ARNsi en cuestión comprenden una región dúplex de aproximadamente 19-30 nucleótidos de longitud, aproximadamente 21-27 nucleótidos de longitud, aproximadamente 21-25 nucleótidos de longitud o aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud. Se entiende que los ARNsi reclutan complejos de nucleasa y guían los complejos al transcripto del gen diana mediante apareamiento a las secuencias específicas. Como resultado, el transcripto del gen diana es degradado por las nucleasas del complejo proteínico. En determinadas realizaciones, las moléculas de ARNsi comprenden un grupo hidroxilo en el extremo 3'. En determinadas realizaciones, los constructos de ARNsi se pueden generar por el procesamiento de ARN bicatenario más largo, por ejemplo en presencia de la enzima Dicer. En una realización se utiliza el sistema *Drosophila in vitro*. En esta realización, el ARNds se combina con un extracto soluble derivado de embrión de *Drosophila*, produciendo así una combinación. La combinación se mantiene bajo condiciones en las que el ARNds se procesa para obtener moléculas de ARN de aproximadamente 21 a aproximadamente 27 nucleótidos. Las moléculas de ARNsi se pueden purificar mediante diversas técnicas conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, para purificar el ARNsi se puede utilizar electroforesis en gel. Alternativamente, para purificar el ARNsi se pueden emplear métodos no desnaturalizantes, tal como cromatografía en columna no desnaturalizante. Además, para purificar el ARNsi también se puede utilizar cromatografía (por ejemplo cromatografía de exclusión por tamaños), centrifugación por gradiente de glicerol o purificación por afinidad con anticuerpo.

35 La producción de los ARNds en cuestión (por ejemplo ARNsi) se puede llevar a cabo mediante métodos de síntesis química o con técnicas de ácidos nucleicos recombinantes. La ARN-polimerasa endógena de la célula tratada puede mediar en la transcripción *in vivo* o se puede utilizar una ARN-polimerasa clonada para la transcripción *in vitro*. Tal como se utilizan aquí, las moléculas de ARNds o ARNsi de la solicitud no se limitan necesariamente a las moléculas que contienen únicamente ARN, sino que además incluyen nucleótidos modificados químicamente y no nucleótidos. Por ejemplo, el ARNds puede incluir modificaciones en el esqueleto azúcar-fosfato o en el nucleósido, por ejemplo para reducir la sensibilidad a las nucleasas celulares, mejorar la biodisponibilidad, mejorar las características de formulación y/o cambiar las propiedades farmacocinéticas. Como ejemplo, los enlaces fosfodiéster del ARN natural se pueden modificar para que incluyan al menos un heteroátomo de nitrógeno o un heteroátomo de azufre. Las modificaciones en la estructura del ARN se pueden adaptar para permitir una inhibición genética específica, evitando al mismo tiempo una respuesta general al ARNds. Del mismo modo, las bases se pueden modificar para bloquear la actividad de la adenosina-desaminasa. Los ARNds se pueden producir enzimáticamente o mediante síntesis orgánica parcial/total. Cualquier ribonucleótido modificado se puede introducir mediante síntesis enzimática u orgánica *in vitro*. Se pueden adaptar los métodos de modificación química de moléculas de ARN para modificar ARNds (véase, por ejemplo, Heidenreich y col. (1997), Nucleic Acids Res, 25:776-780; Wilson y col. (1994), J Mol Recog 7:89-98; Chen y col. (1995), Nucleic Acids Res 23: 2661-2668; Hirschbein y col. (1997), Antisense Nucleic Acid Drug Dev 7:55-61). Sólo a título ilustrativo, el esqueleto de un ARNds o de un ARNsi se puede modificar con fosforotioatos, fosforamidatos, fosfoditioatos, metilfosfonato-fosfodiésteres quiméricos, ácidos nucleicos peptídicos, oligómeros que contienen 3-propinilpirimidina o modificaciones de azúcar (por ejemplo, ribonucleósidos sustituidos en posición 2', configuración a). En determinados casos, los ARNds de la solicitud carecen de nucleótidos que contienen 2'-hidroxi (2'-OH). En determinadas realizaciones, las moléculas de ARNsi comprenden una cadena sentido de fosforotioato. En determinadas realizaciones, las moléculas de ARNsi comprenden una cadena antisentido de fosfodiéster.

60 En una realización específica, al menos una cadena de las moléculas de ARNsi tiene una parte protuberante en el extremo 3' de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 nucleótidos de longitud, de aproximadamente 1 a 5 nucleótidos de longitud, de aproximadamente 1 a 3 nucleótidos de longitud o de aproximadamente 2 a 4 nucleótidos de longitud. En determinadas realizaciones, un ARNsi puede comprender una cadena que tiene una parte protuberante en el extremo 3' y la otra cadena tiene el extremo 3' romo (por ejemplo no tiene parte protuberante en el extremo 3'). En otra realización, un ARNsi puede comprender una parte protuberante en el extremo 3' de las dos cadenas. Las longitudes de la parte protuberante de cada cadena pueden ser iguales o diferentes. Para aumentar adicionalmente la

estabilidad del ARNsi, las partes protuberantes en el extremo 3' se pueden estabilizar contra la degradación. En otra realización, el ARN se estabiliza mediante la inclusión de nucleótidos de purina, por ejemplo de adenosina o guanosina. Alternativamente, también se tolera la sustitución de nucleótidos de pirimidina mediante análogos modificados, por ejemplo la sustitución de partes protuberantes de nucleótidos de uridina en el extremo 3' por 2'-desoxitimidina, lo que no afecta a la eficiencia del ARNsi. La ausencia de un 2'-hidroxilo aumenta significativamente la resistencia a la nucleasa de la parte protuberante en un medio de cultivo de tejidos y puede resultar beneficiosa *in vivo*.

En otra realización específica, el ARNds en cuestión también puede tener la forma de un ARN bicatenario largo. Por ejemplo, el ARNds tiene al menos 25, 50, 100, 200, 300 o 400 bases. En algunos casos, el ARNds es de 400-800 bases de longitud. Opcionalmente, los ARNds se digieren intracelularmente, por ejemplo para producir secuencias de ARNsi en la célula. No obstante, el uso de ARN bicatenarios largos *in vivo* no siempre es factible, es de suponer que debido a los efectos perjudiciales que pueden provocarse por la respuesta del ARNds independiente de la secuencia. En estas realizaciones es preferible utilizar sistemas de suministro local y/o agentes que reducen los efectos del interferón o PKR.

En otra realización específica, el ARNds o ARNsi está en forma de una estructura de horquilla (o ARN en horquilla). Los ARN en horquilla se pueden sintetizar de forma exógena o se pueden formar mediante transcripción a partir de promotores de ARN-polimerasa III *in vivo*. Por ejemplo, en Paddison y col., Genes Dev, 2002, 16:948-58; McCaffrey y col., Nature, 2002, 418:38-9; McManus y col., RNA, 2002, 8:842-50; Yu y col., Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99:6047-52, se describen ejemplos de producción y utilización de estos ARN en horquilla para el silenciamiento génico en células de mamífero. Preferentemente, estos ARN en horquilla se crean por ingeniería genética en células o en un animal para asegurar una supresión continua y estable de un gen diana. En la técnica es conocido que se pueden producir ARNsi mediante el procesamiento de un ARN en horquilla en la célula.

La solicitud PCT WO 01/77350 describe un ejemplo de vector para la transcripción bidireccional de un transgén para producir transcritos de ARN tanto sentido como antisentido del mismo transgén en una célula eucariota. Así, en determinadas realizaciones la presente invención proporciona un vector recombinante que presenta las siguientes características únicas: comprende un replicón viral que tiene dos unidades de transcripción solapadas dispuestas en orientación opuesta y flanquean un transgén para un ARNds de interés, proporcionando las dos unidades de transcripción solapadas transcritos de ARN tanto sentido como antisentido a partir del mismo fragmento de transgén en una célula huésped.

En ejemplos de realización, la solicitud proporciona ARNsi dirigidos contra una secuencia diana de núcleo tal como muestra la Tabla 1 más arriba, o una región correspondiente a una región de un gen de R2 o un ARNm correspondiente a una secuencia diana de núcleo con ± 5 , ± 10 o ± 20 nucleótidos flanqueando la secuencia diana de núcleo por uno o por los dos lados. Más abajo, en las Tablas 2-8 se muestran las secuencias de varios ARNsi dúplex.

Tabla 2 ARNsi dúplex dirigidos a los sitios diana A, B y C. Los residuos subrayados representan partes protuberantes del extremo 3'

Descripción	Secuencia	Cadena	SEQ ID NO
siRRM2A	5' cccaucgaguaccaugau <u>auc</u> 3'	Sentido	SEQ ID NO 7
(o RRM2-444)	3' <u>aggggu</u> agcucaugguacuau 5'	Antisentido	SEQ ID NO 8

También se muestran los ARNsi 27meros correspondientes de los tres 21meros arriba indicados en la Tabla 2. Más específicamente, las variantes "27R" y "27L" pueden ser más potentes para reducir la expresión de R2. Véase Kim y col., "Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy.", Nature Biotechnology 23:222-226 (2005); Rose y col., "Functional Polarity is Introduced by Dicer Processing of Short Substrate RNAs.", Nucleic Acids Research, 33(13):4140-56 (2005). El 27mero 'R' ha añadido bases que se extienden hacia la parte derecha de la secuencia diana inicial (3' con respecto a la diana), mientras que el 27mero 'L' ha añadido bases que se extienden hacia la parte izquierda de la secuencia diana inicial (5' con respecto a la diana). La siguiente Tabla 3 muestra ejemplos de los ARNsi 27meros.

Tabla 3 ARNsi 27meros correspondientes a los ARNsi 21meros mostrados en la Tabla 2. Las letras MAYÚSCULAS indican residuos de ADN, las letras minúsculas indican residuos de ARN, [5'phos] representa 5'-fosfato y los residuos subrayados representan partes protuberantes del extremo 3'

Descripción	Secuencia	Cadena	SEQ ID NO
siRRM2A1(o RRM2-444-27R)	5' [5'phos]cccaucgaguaccaugau <u>aucug</u> GC 3'	Sentido	SEQ ID NO 13
	3' <u>aggggu</u> agcucaugguacuauagaccg 5'	Antisentido	SEQ ID NO 14

siRRM2A2" (o "RRM2-444-27L)	5'aucuuccccaucgaguacca <u>g</u> au <u>a</u> uc 3'	Sentido	SEQ ID NO 15
	3' T <u>A</u> gaagggguagcucaug <u>g</u> uac <u>u</u> [5'phos] 5'	Antisentido	SEQ ID NO 16

La solicitud también proporciona ARNsi dirigidos dentro de -20 a +20 bases de una secuencia diana de núcleo o dentro de -10 a +10 bases de un ARNsi de la solicitud. Por ejemplo, las siguientes Tablas 4-8 muestran dúplex 21meros que tienen sitios diana dentro de -5 a +5 bases de cada uno de los tres ARNsi 21meros o de -10 a +10 bases de cada de las tres secuencias diana de núcleo.

Tabla 4 ARNsi dúplex dirigidos contra el sitio diana A y con traslape de -5 a +5 bases del ARNsi dúplex siRRM2A. Los residuos subrayados representan partes protuberantes del extremo 3'

Descripción	Secuencia	Cadena	SEQ ID NO
siRRM2A-5 (o RRM2-439)	5'ucuuccccaucgaguacca <u>g</u> 3'	Sentido	SEQ ID NO 25
	3' <u>g</u> uagaagggguagcucaug <u>g</u> 5'	Antisentido	SEQ ID NO 26
siRRM2A-4 (o RRM2-440)	5' cuuccccaucgaguacca <u>g</u> a 3'	Sentido	SEQ ID NO 27
	3' <u>u</u> agaagggguagcucaug <u>g</u> a 5'	Antisentido	SEQ ID NO 28
siRRM2A-3 (o RRM2-441)	5'uuccccaucgaguacca <u>g</u> au 3'	Sentido	SEQ ID NO 29
	3' <u>a</u> gaagggguagcucaug <u>g</u> uac 5'	Antisentido	SEQ ID NO 30
siRRM2A-2 (o RRM2-442)	5' uccccaucgaguacca <u>g</u> aua 3'	Sentido	SEQ ID NO 31
	3' <u>g</u> aagggguagcucaug <u>g</u> uacu 5'	Antisentido	SEQ ID NO 32
siRRM2A-1 (o RRM2-443)	5' cccaucgaguacca <u>g</u> auau 3'	Sentido	SEQ ID NO 33
	3' <u>a</u> agggguagcucaug <u>g</u> uacua 5'	Antisentido	SEQ ID NO 34
siRRM2A+1 (o RRM2-445)	5' ccaucgaguacca <u>g</u> auau <u>c</u> 3'	Sentido	SEQ ID NO 35
	3' gggguagcucaug <u>g</u> uacuaua 5'	Antisentido	SEQ ID NO 36
siRRM2A+2 (o RRM2-446)	5' caucgaguacca <u>g</u> auau <u>c</u> g 3'	Sentido	SEQ ID NO 37
	3' ggg <u>u</u> agcucaug <u>g</u> uacuauag 5'	Antisentido	SEQ ID NO 38
siRRM2A+3 (o RRM2-447)	5' aucgaguacca <u>g</u> auau <u>c</u> gg 3'	Sentido	SEQ ID NO 39
	3' gguagcucaug <u>g</u> uacuauaga 5'	Antisentido	SEQ ID NO 40
siRRM2A+4 (o RRM2-448)	5' ucgaguacca <u>g</u> auau <u>c</u> ggc 3'	Sentido	SEQ ID NO 41
	3' <u>g</u> uagcucaug <u>g</u> uacuauagac 5'	Antisentido	SEQ ID NO 42
siRRM2A+5 (o RRM2-449)	5' cgaguacca <u>g</u> auau <u>c</u> ggca 3'	Sentido	SEQ ID NO 43
	3' <u>u</u> agcucaug <u>g</u> uacuauagacc 5'	Antisentido	SEQ ID NO 44

En determinadas realizaciones, los agentes de ácido nucleico de la solicitud pueden tener entre 12 y 200 nucleótidos de longitud. En una realización, algunos ejemplos de moléculas antisentido de la solicitud tienen una longitud entre 15 y 75 nucleótidos, incluyendo, por ejemplo, entre 20 y 35 nucleótidos de longitud (véase, por ejemplo, Woolf y col., 1992, PNAS., 89, 7305-7309; Milner y col., 1997, Nature Biotechnology, 15, 537-541). En otra realización, algunos ejemplos de ARNsi de la solicitud tienen entre 20 y 30 nucleótidos de longitud, incluyendo por ejemplo entre 21 y 27 nucleótidos de longitud. El experto en la materia reconocerá que lo único que se requiere es que el agente de ácido nucleico en cuestión tenga una longitud y conformación suficiente y adecuada para la actividad aquí considerada. La longitud de los agentes de ácido nucleico de la presente solicitud no es restrictiva dentro de los límites generales expuestos.

Síntesis de agentes de ácido nucleico

La síntesis de ácidos nucleicos de más de 100 nucleótidos de longitud es difícil con métodos automáticos y el coste terapéutico de estas moléculas es prohibitivo. En esta solicitud se utilizan preferentemente motivos de ácido nucleico pequeños. El término "pequeños" se refiere a motivos de ácido nucleico inferiores a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, preferentemente inferiores a aproximadamente 80 nucleótidos de longitud y de forma especialmente preferente inferiores a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud (por ejemplo constructos de ARNi) para suministro exógeno. La estructura simple de estas moléculas aumenta la capacidad del ácido nucleico para invadir regiones diana de la estructura del ARN.

Algunos ejemplos de moléculas inhibitoras de ácido nucleico de la presente solicitud, incluyendo moléculas de ARN y ADN, se pueden sintetizar químicamente. A título ilustrativo, los oligonucleótidos (por ejemplo ADN) se sintetizan utilizando protocolos conocidos en la técnica, tal como se describen en Caruthers y col., 1992, *Methods in Enzymology* 211,3-19, Thompson y col., *Publicación PCT Internacional WO 99/54459*, Wincott y col., 1995, *Nucleic Acids Res.* 23, 2677-2684, Wincott y col., 1997, *Methods Mol. Bio.*, 74, 59, Brennan y col., 1998, *Biotechnol Bioeng.*, 61, 33-45, y Brennan, *Pat. US 6.001.311*. Para la síntesis de oligonucleótidos se utilizan grupos protectores y de acoplamiento de ácidos nucleicos habituales, por ejemplo dimetoxitritilo en el extremo 5' y fosforoamiditas en el extremo 3'. En un ejemplo no limitativo se llevan a cabo una síntesis a pequeña escala en un sintetizador 394 Applied Biosystems, Inc. con un paso de acoplamiento de 2,5 minutos para los nucleótidos 2'-O-metilados y un paso de 45 segundos para los 2'-desoxinucleótidos. Alternativamente, se puede llevar a cabo la síntesis en un sintetizador de placa de 96 pocillos, tal como el dispositivo de Protogene (Palo Alto, CA) con una modificación mínima del ciclo.

Opcionalmente se pueden sintetizar por separado partes de los presentes ácidos nucleicos para unir las después de la síntesis, por ejemplo por ligación (Moore y col., 1992, *Science* 256, 9923; Draper y col., *Publicación PCT Internacional WO 93/23569*; Shabarova y col., 1991, *Nucleic Acids Research* 19, 4247; Bellon y col., 1997, *Nucleosides & Nucleotides*, 16, 951; Bellon y col., 1997, *Bioconjugate Chem.* 8, 204).

Preferentemente, aquí los ácidos nucleicos se modifican de forma considerable para mejorar la estabilidad por modificación con grupos resistentes a la nucleasa, por ejemplo 2'-amino, 2'-C-alilo, 2'-flour, 2'-O-metilo, 2'-H (para una revisión al respecto, véase Usman y Cedergren, 1992, *TIBS* 17, 34; Usman y col., 1994, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 31,163). Las ribozimas se purifican mediante electroforesis en gel utilizando métodos generales o mediante cromatografía líquida a alta presión (HPLC; véase Wincott y col., *supra*) y se resuspenden en agua.

Optimización de la actividad de los ácidos nucleicos

Se puede prevenir la degradación de los ácidos nucleicos con modificaciones (por ejemplo, base, azúcar y/o fosfato) mediante ribonucleasas séricas y así aumentar su potencia. En la técnica existen diversos ejemplos que describen modificaciones de azúcar, base y fosfato que se pueden introducir en los ácidos nucleicos con un incremento significativo en su estabilidad frente a nucleasas y de su eficacia. Por ejemplo, los oligonucleótidos se modifican para aumentar la estabilidad y/o la actividad biológica por modificación con grupos resistentes a la nucleasa, por ejemplo 2'-amino, 2'-C-alilo, 2'-flour, 2'-O-metilo, 2'-H, modificaciones de base de nucleótido (para una revisión al respecto, véase Usman y Cedergren, 1992, *TIBS*, 17, 34; Usman y col., 1994, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 31,163; Burgin y col., 1996, *Biochemistry*, 35,14090). En la técnica existen amplias descripciones de modificaciones de azúcar de ácidos nucleicos (véase Eckstein y col., *Publicación PCT WO 92/07065*; Perrault y col., *Nature*, 1990, 344, 565-568; Pieken y col., *Science*, 1991, 253, 314-317; Usman y Cedergren, *Trends in Biochem. Sci.*, 1992, 17, 334-339; Usman y col., *Publicación PCT WO 93/15187*; Sproat, *US Pat. 5.334.711* y Beigelman y col., 1995, *J. Biol. Chem.*, 270,25702; Beigelman y col., *Publicación PCT WO 97/26270*; Beigelman y col., *Pat US 5.716.824*; Usman y col., *Pat. US 5.627.053*; Woolf y col., *Publicación PCT WO 98/13526*; Thompson y col., *US 60/082.404*, presentada el 20 de abril de 1998; Karpeisky y col., 1998, *Tetrahedron Lett.*, 39,1131; Earnshaw y Gait, 1998, *Biopolymers (Nucleic acid Sciences)*, 48, 39-55; Verma y Eckstein, 1998, *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 99-134; y Burlina y col., 1997, *Bioorg. Med. Chem.*, 5, 1999-2010). Para modificar los ácidos nucleicos de la presente solicitud se pueden utilizar modificaciones similares.

Aunque la modificación química de enlaces internucleótido de oligonucleótidos con enlaces fosforotioato, fosforotioato y/o 5'-metilfosfonato mejora la estabilidad, una sobre-abundancia de estas modificaciones puede provocar toxicidad. Por consiguiente, cuando se diseñan los ácidos nucleicos, la cantidad de estos enlaces internucleótido ha de evaluarse y reducirse apropiadamente al mínimo. La reducción de la concentración de estos enlaces debería disminuir la toxicidad, conduciendo a un aumento de la eficacia y a una mayor especificidad de estas moléculas.

Los ácidos nucleicos de la solicitud pueden incluir uno o más nucleótidos G-clamp. Un nucleótido G-clamp es un análogo de citosina modificado al que las modificaciones confieren la capacidad de unir por puente de hidrógeno tanto las caras de Watson-Crick como de Hoogsteen de una guanina complementaria con un dúplex, véase por ejemplo Lin y Matteucci, 1998, *J. Am. Soc.*, 120, 8531-8532. Una sustitución de análogo G-clamp simple dentro de un oligonucleótido puede conducir a una mejora considerable de la estabilidad térmica helicoidal y una discriminación de desapareamientos cuando se hibrida en oligonucleótidos complementarios. La inclusión de estos nucleótidos en los ácidos nucleicos de la solicitud conduce a un aumento tanto de la afinidad como de la especificidad con respecto a las dianas de ácido nucleico.

Los ácidos nucleicos de la solicitud pueden incluir uno o más nucleótidos LNA (*locked nucleic acid* - ácido nucleico bloqueado) tal como un 2',4'-C-metilen-biciclo-nucleótido (véase, por ejemplo, Wengel y col., Publicaciones PCT WO 00/66604 y WO 99/14226).

- 5 En otra realización, la solicitud presenta conjugados y/o complejos de ácidos nucleicos dirigidos a un gen R2. Estos conjugados y/o complejos se pueden utilizar para facilitar el suministro de ácidos nucleicos a un sistema biológico, por ejemplo a células. Los conjugados y complejos proporcionados por la presente solicitud pueden impartir actividad terapéutica mediante el transporte o la transferencia de agentes terapéuticos a un tipo de tejido o célula diana, a través de las membranas celulares, por la modificación de la farmacocinética y/o por modulación del emplazamiento de los ácidos nucleicos de la solicitud. Estos conjugados y/o complejos también se describen más abajo.
- 10 La presente solicitud abarca el diseño y la síntesis de nuevos conjugados y complejos para el suministro de moléculas, incluyendo, de forma no exclusiva, moléculas pequeñas, lípidos, fosfolípidos, nucleósidos, nucleótidos, ácidos nucleicos, anticuerpos, toxinas, polímeros de carga negativa y otros polímeros, por ejemplo proteínas, péptidos, hormonas, carbohidratos, polietilenglicoles o poliaminas, a través de las membranas celulares. En general, los transportadores arriba descritos están diseñados para ser utilizados individualmente o como parte de un sistema multicomponente, con o sin enlazantes degradables. Se prevé que estos compuestos mejorarán el suministro y/o el emplazamiento de los ácidos nucleicos de la solicitud dentro de una serie de tipos celulares procedentes de diferentes tejidos, en presencia o ausencia de suero (véase, Sullenger y Cech, Pat. US 5.854.038). Los conjugados de las moléculas aquí descritas se pueden unir a moléculas biológicamente activas mediante enlaces biodegradables, por ejemplo moléculas de enlace a ácido nucleico biodegradables.
- 15 20 Tal como se utiliza aquí, el concepto "molécula de enlace a ácido nucleico biodegradable" se refiere a una molécula de ácido nucleico que está diseñada como un enlace biodegradable para conectar una molécula con otra, por ejemplo una molécula biológicamente activa. La estabilidad de la molécula de enlace de ácido nucleico biodegradable se puede modular utilizando diferentes combinaciones de ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y nucleótidos modificados químicamente, por ejemplo 2'-O-metilo, 2'-fluor, 2'-amino, 2'-O-amino, 2'-C-alilo, 2'-O-alilo y otros nucleótidos 2'-modificados o modificados en una base. La molécula de enlace de ácido nucleico biodegradable puede ser un dímero, trímero, tetrámero o un ácido nucleico más largo, por ejemplo un oligonucleótido de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de longitud, o puede comprender un oligonucleótido simple con un enlace basado en fósforo, por ejemplo un enlace fosforoamidato o fosfodiéster. La molécula de enlace de ácido nucleico biodegradable también puede comprender modificaciones en el esqueleto de ácido nucleico, el azúcar del ácido nucleico o la base del ácido nucleico. Tal como se utiliza aquí, el término "biodegradable" se refiere a la degradación en un sistema biológico, por ejemplo degradación enzimática o química.

Los agentes de ácido nucleico terapéuticos, tales como las moléculas aquí descritas, suministrados de forma exógena son óptimamente estables dentro de las células hasta que la traducción del ARN diana haya sido inhibida durante el tiempo suficiente como para reducir los niveles de la proteína no deseables. Este período de tiempo puede variar de horas a días, dependiendo del estado de la enfermedad. Estos agentes de ácido nucleico han de ser resistentes a las nucleasas para funcionar como agentes terapéuticos intracelulares efectivos. Las mejoras en la síntesis química de los ácidos nucleicos aquí y en la técnica han ampliado la capacidad de modificación de los ácidos nucleicos mediante la introducción de modificaciones que incrementan su estabilidad frente a las nucleasas tal como se describe más arriba.

40 En otro aspecto, los ácidos nucleicos comprenden una estructura *cap* en 5' y/o 3'. El concepto "estructura *cap*" se refiere a modificaciones químicas incorporadas en cualquiera de los dos extremos (véase, por ejemplo, Wincott y col., WO 97/26270). Estas modificaciones terminales protegen al ácido nucleico frente a la degradación por exonucleasas y pueden ayudar al suministro y/o al emplazamiento dentro de una célula. El *cap* puede estar presente en el extremo 5' (5'-*cap*) o en el extremo 3' (3'-*cap*) o puede estar en ambos extremos. En ejemplos no limitativos, el 5'-*cap* incluye un residuo no básico invertido (fracción), 4',5'-metilen-nucleótido; 1-(beta-D-eritrofuranosil)nucleótido, 4'-tio-nucleótido, un nucleótido carbocíclico; 1,5-anhidrohexitol-nucleótido; L-nucleótidos; alfa-nucleótidos; nucleótido de base modificada; enlace fosforoditioato; treopentafuranosil-nucleótido; 3',4'-anhidronucleótido acíclico; 3,4-dihidroxitil-nucleótido acíclico; 3,5-dihidroxipentil-nucleótido acíclico; una fracción de nucleótido 3',3'-invertida; una fracción no básica 3',3'-invertida; una fracción de nucleótido 3',2'-invertida; fracción no básica 3',2'-invertida; 1,4-butanodiol-fosfato; 3'-fosforamidato; hexilfosfato; aminohexilfosfato; 3'-fosfato; 3'-fosforotioato; fosforoditioato; o una fracción metilfosfonato puente o no puente (para más detalles, véase Wincott y col., *supra*). En otros ejemplos no limitativos, el 3'-*cap* incluye, por ejemplo, 4',5'-metilen-nucleótido; 1-(beta-D-eritrofuranosil)-nucleótido; 4'-tio-nucleótido, nucleótido carbocíclico; 5'-aminoalquilfosfato; 1,3-diamino-2-propilfosfato, 3-aminopropilfosfato; 6-aminohexilfosfato; 1,2-aminododecilfosfato; hidroxipropilfosfato; 1,5-anhidrohexitol-nucleótido; L-nucleótido; alfa-nucleótido; nucleótido de base modificada; fosforoditioato; treopentofuranosil-nucleótido; 3',4'-anhidro-nucleótido acíclico; 3,4-dihidroxitil-nucleótido; 3,5-dihidroxipentil-nucleótido, una fracción nucleótido 5',5'-invertida; fracción no básica 5',5'-invertida; 5'-fosforamidato; 5'-fosforotioato; 1,4-butanodiolfosfato; 5'-amino; 5'-fosforamidato puente o no puente, fosforotioato y/o fosforoditioato, metilfosfonato puente o no puente y fracciones 5'-mercapto (para más detalles, véase Beaucage e Iyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925).

Uso de inhibidores de R2

La presente solicitud también describe métodos para inhibir la proliferación no deseada de una o más células, por ejemplo células tumorales o cancerosas o células patógenas. La solicitud también describe métodos para inhibir o reducir el crecimiento tumoral y métodos para tratar a un individuo que padece cáncer. Estos métodos implican la administración al paciente individual de una cantidad eficaz de uno o más inhibidores de R2 (por ejemplo ARNsi) tal como se describen más arriba. La presente solicitud también describe métodos para tratar cáncer metastásico y/o para prevenir las metástasis. Además, la presente solicitud describe métodos para tratar un cáncer resistente a terapias tradicionales, por ejemplo con agentes quimioterapéuticos. Determinados métodos están dirigidos particularmente a tratamientos terapéuticos y/o profilácticos en animales, más particularmente en humanos, y, en dichos métodos, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor o los inhibidores de R2 al paciente animal o humano. La presente invención proporciona además el uso de los inhibidores R2 de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de dichas enfermedades.

El término "tratamiento" incluye tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. El concepto "tratamiento profiláctico o terapéutico" es conocido en la técnica e incluye la administración de una o más de las composiciones en cuestión al huésped. Si se administra antes de la manifestación clínica del estado no deseado (por ejemplo de la enfermedad o de otro estado no deseado del animal huésped), el tratamiento es profiláctico (es decir, protege al huésped contra el desarrollo del estado no deseado), mientras que si se administra después de la manifestación del estado no deseado, el tratamiento es terapéutico (es decir, está destinado a disminuir, mejorar o estabilizar el estado no deseado existente o los efectos secundarios del mismo).

Tal como se describe aquí, un tumor o cáncer incluye un tumor dentro de un individuo, un xenoinjerto tumoral o un tumor cultivado *in vitro*. En particular, los agentes de ácido nucleico de la presente solicitud son útiles para tratar o prevenir un cáncer. Los ejemplos de formas de cáncer que pueden ser tratadas con los métodos en cuestión incluyen, de forma no exclusiva, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer de células pequeñas o de células grandes), cáncer de colon, renal, hepático, de mama, de cuello uterino, de endometrio u otro cáncer uterino, cáncer de ovario, de testículo, de pene, de vagina, de uretra, de vesícula biliar, de esófago o de páncreas. Otros ejemplos de formas de cáncer que pueden ser tratadas con los métodos en cuestión incluyen, de forma no exclusiva, cáncer de músculo esquelético o liso, cáncer de estómago, de intestino delgado, de glándulas salivales, de ano, de recto, de tiroides, de paratiroides, de pituitaria y cáncer nasofaríngeo. Algunos ejemplos adicionales de formas de cáncer que pueden ser tratadas con los inhibidores de R2 de la presente invención incluyen cánceres que comprenden células que expresan *hedgehog*. Otros ejemplos más de formas de cáncer que pueden ser tratadas con los inhibidores de R2 de la presente solicitud incluyen cánceres que comprenden células que expresan R2. En algunos de estos aspectos, las células normales o no cancerosas del mismo tipo de tejido que las células cancerosas pueden no expresar la R2 en un nivel detectable mediante las técnicas actuales; por ejemplo, el tejido hepático normal o los hepatocitos no expresan niveles detectables de R2, a diferencia de la expresión de la R2 en células de carcinoma hepatocito. De acuerdo con la solicitud, los inhibidores de R2 aquí descritos se pueden utilizar solos o se pueden administrar como parte de un régimen de tratamiento general que incluye otra terapéutica y/u otras terapias tradicionales o no tradicionales.

Otros ejemplos de cánceres que pueden ser tratados utilizando los ácidos nucleicos inhibidores de R2 aquí descritos incluyen los siguientes: leucemias tales como, de forma no exclusiva, leucemia aguda, linfoctica aguda; leucemias mielocíticas agudas tales como leucemias mieloblásticas, promielocíticas, mielomonocíticas, monocíticas y eritroleucemias y síndrome mielodisplásico; leucemias crónicas tales como, de forma no exclusiva, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfoctica crónica, leucemia de células pilosas; policitemia vera; linfomas tales como, de forma no exclusiva, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin; mielomas múltiples tales como, de forma no exclusiva, mieloma múltiple quiescente, mieloma no secretorio, mieloma osteoesclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma solitario y plasmacitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenström; gammapatía monoclonal de significancia indeterminada; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de cadena pesada; sarcomas óseos y de tejido conjuntivo tales como, de forma no exclusiva, sarcoma óseo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma óseo, cordoma, sarcoma perióístico, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomasarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales tales como, de forma no exclusiva, glioma, astrocitoma, glioma de tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primario; cáncer de mama, incluyendo, de forma no exclusiva, adenocarcinoma, carcinoma lobular (células pequeñas), carcinoma intraductal, carcinoma medular de mama, carcinoma mucinoso de mama, carcinoma tubular de mama, carcinoma papilar de mama, enfermedad de Paget y carcinoma inflamatorio de mama; cáncer adrenal tal como, de forma no exclusiva, feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cáncer de tiroides tal como, de forma no exclusiva, carcinoma papilar o folicular de tiroides, carcinoma medular de tiroides y carcinoma anaplásico de tiroides; cáncer de páncreas tal como, de forma no exclusiva, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina y tumor carcinoide o de células de los islotes; cánceres pituitarios tales como, de forma no exclusiva, enfermedad de Cushing's, tumor secretor de prolactina, acromegalia y diabetes insípida; carcinomas oculares tales como, de forma no exclusiva, melanoma ocular tal como melanoma de iris, melanoma coroideo y retinoblastoma; cánceres de vagina tales como carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer de vulva tal como carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma y carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres

del cuello del útero tales como, de forma no exclusiva, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma; cánceres de útero tales como, de forma no exclusiva, carcinoma endometrial y sarcoma uterino; cánceres de ovario tales como, de forma no exclusiva, carcinoma epitelial ovárico, tumor de bajo potencial maligno, tumor de células germinales y tumor de estroma; cánceres de esófago tales como, de forma no exclusiva, carcinoma escamocelular, adenocarcinoma, carcinoma adenoide quístico, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoide escamocelular, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrugoso, y carcinoma y carcinoma avenocelular (de células pequeñas); cánceres de estómago tales como, de forma no exclusiva, adenocarcinoma, linfoma maligno fungoso (polipoide), ulcerante, de propagación superficial, de propagación difusa, liposarcoma, fibrosarcoma, y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres de recto; cánceres de hígado tales como, de forma no exclusiva, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma; cánceres de vesícula biliar tales como adenocarcinoma; colangiocarcinomas tales como, de forma no exclusiva, papilar, nodular y difuso; cánceres de pulmón tales como cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón de células pequeñas; cánceres de testículo tales como, de forma no limitativa, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatocítico, no-seminoma, carcinoma embrionario, carcinoma teratoma, coriocarcinoma (tumor de saco vitelino); cánceres de próstata tales como, de forma no exclusiva, adenocarcinoma, leiomiocarcinoma y rhabdomyosarcoma; cánceres de pene; cánceres de boca tales como, de forma no exclusiva, carcinoma de células escamosas; carcinomas de células basales; cánceres de las glándulas salivales tales como, de forma no exclusiva, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoide quístico; cánceres de faringe tales como, de forma no exclusiva, cáncer de células escamosas y verrugoso; cánceres de piel tales como, de forma no exclusiva, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma, melanoma de propagación superficial, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno, melanoma lentiginoso acral; cánceres renales tales como, de forma no exclusiva, carcinoma de células renales, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma, carcinoma de células de transición (pelvis renal y/o uterino); tumor de Wilms; cánceres de vejiga tales como, de forma no exclusiva, carcinoma de células de transición, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endotelioma, linfangioendotelioma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistoadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para una revisión de estas afecciones, véase Fishman y col., 1985, *Medicine*, 2ª Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia y Murphy y col., 1997, *Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery*, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., EEUU).

La solicitud también describe métodos para inhibir la proliferación de células patógenas, por ejemplo, en un paciente que sufre una infección por células patógenas o en/sobre un objeto (por ejemplo equipos médicos o de laboratorio, una encimera de cocina o cualquier objeto sometido a contaminación por patógenos, etc.) contaminado por células patógenas. Los agentes patógenos incluyen, por ejemplo, virus, bacterias, hongos, etc. Existe una amplia información genómica de una gran variedad de agentes patógenos disponible en bases de datos públicas. Dicha información genómica se puede utilizar para diseñar inhibidores de ácido nucleico dirigidos a un gen R2 en diversos agentes patógenos.

Ejemplos de enfermedades causadas por virus a que pueden aplicarse los métodos aquí descritos incluyen: retrovirus (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana, tal como el VIH -1 (también denominado HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, véase Ratner, L. y col., *Nature*, Vol. 313, Pp. 227-284 (1985); Wain Hobson, S. y col., *Cell*, Vol. 40, pp. 9-17 (1985)); VIH-2 (véase Guyader y col., *Nature*, Vol. 328, Pp. 662-669 (1987); Publicación de Patente Europea 0 269 520; Chakraborti y col., *Nature*, Vol. 328, Pp. 543-547 (1987); y Publicación de Patente Europea 0 655 501); y otros aislados tales como VIH-LP (Publicación Internacional WO 94/00562, "A Novel Human Immunodeficiency Virus"); picornavirus (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A, (Gust, L D. y col., *Intervirology*, Vol. 20, Pp. 1-7 (1983)); enterovirus, virus Coxsackie humano, rinovirus, ecovirus); Calciviridae (por ejemplo cepas que provocan gastroenteritis); Togaviridae (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubeola); Flaviridae (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); Coronaviridae (por ejemplo, coronavirus); Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); Filoviridae (por ejemplo, virus Ebola); Paramyxoviridae (por ejemplo, virus de la parainfluenza, virus de paperas, virus del sarampión, virus sincicial respiratorio); Orthomyxoviridae (por ejemplo, virus de la influenza); Bungaviridae (por ejemplo, virus de Hantaan, bungavirus, flebovirus y nairovirus); Arenaviridae (virus de la fiebre hemorrágica); Reoviridae (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); *Bimaviridae*; Hepadnaviridae (virus de la hepatitis B); Parvoviridae (parvovirus); Papovaviridae (virus del papiloma, virus del polioma); Adenoviridae (la mayor parte de los adenovirus); Herpesviridae (virus del herpes simplex (HSV) 1 y 2, virus de la varicela-zoster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes); Poxviridae (virus de la variola, virus de la vaccinia, virus de la viruela); e Iridoviridae (por ejemplo, virus de la peste porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de encefalopatías espongiiformes, el agente de hepatitis delta (considerado como un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis no A, no B (clase 1 = transmitido internamente; clase 2 = transmitido por vía parenteral (es decir, hepatitis C); virus Norwalk y virus relacionados y astrovirus).

Ejemplos de bacterias infecciosas incluyen: *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* sps. (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* del Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del Grupo B), *Streptococcus* (grupo *viridans*), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus (anaerobic sps.)*, *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* sp. patógeno, *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium*

diphtheriae, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira* y *Actinomyces israelii*.

- 5 Ejemplos de hongos infecciosos incluyen: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*. Otros organismos infecciosos (es decir, protistas) incluyen: *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii*.

La información genómica (incluyendo secuencias de nucleótidos, secuencias de aminoácidos, información de expresión de proteínas y/o información de estructura de proteínas) para diversos microorganismos se puede encontrar en las bases de datos mantenidas por The Institute for Genomic Research (TIGR) (www.tigr.org) y/o el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov). Ejemplos de bacterias cuya información genómica está disponible incluyen, por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58 (Cereon) (NC_003062 & NC_003063), *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58 (U. Washington) (NC_003304 & NC_003305), *Aquifex aeolicus* (NC_000918), *Bacillus halodurans* (NC_002570), *Bacillus subtilis* (NC_000964), *Borrelia burgdorferi* (NC_001318), *Brucella melitensis* (NC_003317 & NC_003318), *Buchnera* sp. APS (NC_002528), *Campylobacter jejuni* (NC_002163), *Caulobacter crescentus* --CB15 (NC_002696), *Chlamydia muridarum* (NC_002620), *Chlamydia trachomatis* (NC_000117), *Chlamydomydia pneumoniae* AR39 (NC_002179), *Chlamydomydia pneumoniae* CWL029 (NC_000922), *Chlamydomydia pneumoniae* J138 (NC_002491), *Clostridium acetobutylicum* (NC_003030), *Clostridium perfringens* (NC_003366), *Corynebacterium glutamicum* (NC_003450), *Deinococcus radiodurans* (NC_001263 & NC_001264), *Escherichia coli* K12 (NC_000913), *Escherichia coli* O157:H7 (NC_002695), *Escherichia coli* O157:H EDL933 (NC_002655), *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586 (NC_003454), *Haemophilus influenzae* Rd (NC_000907), *Helicobacter pylori* 26695 (NC_000915), *Helicobacter pylori* J99 (NC_000921), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (NC_002662), *Listeria innocua* (NC_003212), *Listeria monocytogenes* EGD-e (NC_003210), *Mesorhizobium loti* (NC_002678), *Mycobacterium leprae* (NC_002677), *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 (NC_002755), *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (NC_000962), *Mycoplasma genitalium* (NC_000908), *Mycoplasma pneumoniae* (NC_000912), *Mycoplasma pulmonis* (NC_002771), *Neisseria meningitidis* MC58 (NC_003112), *Neisseria meningitidis* (NC_003116), *Nostoc* sp. (NC_003272), *Pasteurella multocida* (NC_002663), *Pseudomonas aeruginosa* (NC_002516), *Ralstonia solanacearum* (NC_003295 & NC_003296), *Rickettsia conorii* (NC_003103), *Rickettsia prowazekii* (NC_000963), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhi* (NC_003198), *Salmonella typhi* (NC_002305), *Salmonella typhimurium* LT2 (NC_003197), *Sinorhizobium meliloti* (NC_003047), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* MW2 (NC_003923), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Mu50 (NC_002758), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* N315 (NC_002745), *Streptococcus pneumoniae* R6 (NC_003098), *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 (NC_003028), *Streptococcus pyogenes* M1 GAS (NC_002737), *Streptococcus pyogenes* MGAS8232 (NC_003485), *Streptomyces coelicolor* A3(2) (NC_003888), *Synechocystis* sp. PCC 6803 (NC_000911), *Thermoanaerobacter tengcongensis* (NC_003869), *Thermotoga maritima* (NC_000853), *Treponema pallidum* (NC_000919), *Ureaplasma urealyticum* (NC_002162), *Vibrio cholerae* (NC_002505 & NC_002506), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* cepa 306 (NC_003919), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* cepa ATCC 33913 (NC_003902), *Xylella fastidiosa* 9a5c (NC_002488), y *Yersinia pestis* (NC_003143).

Ejemplos de *Archaea* cuya información genómica está disponible en TIGR y/o NCBI incluyen, por ejemplo, *Aeropyrum pemix* (NC_000854), *Archaeoglobus fulgidus* (NC_000917), *Halobacterium* sp. NRC-1 (NC_002607), *Methanococcus jannaschii* (NC_000909), *Methanopyrus kandleri* AV19 (NC_003551), *Methanosarcina acetivorans* cepa C2A (NC_003552), *Methanosarcina mazei* Goel (NC_003901), *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (NC_000916), *Pyrobaculum aerophilum* (NC_003364), *Pyrococcus abyssi* (NC_000868), *Pyrococcus furiosus* DSM 3638 (NC_003413), *Pyrococcus horikoshii* (NC_000961), *Sulfolobus solfataricus* (NC_002754), *Sulfolobus tokodaii* (NC_003106), *Thermoplasma acidophilum* (NC_002578) y *Thermoplasma volcanium* (NC_002689).

45 Eucariotas cuya información genómica está disponible en TIGR y/o NCBI incluyen, por ejemplo, *Anopheles gambiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Guillardia theta nucleomorph*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*.

En TIGR y/o NCBI está disponible la información genómica de más de 900 especies virales, incluyendo, por ejemplo, información sobre virus delta, retrovirus, satélites, virus de ADNds, virus de ARNds, virus de ADNss, virus de ARNss cepa negativa, virus de ARNss cepa positiva, bacteriófagos no clasificados y otros virus no clasificados.

50 La solicitud también describe métodos para inhibir la proliferación no deseada de una célula normal (por ejemplo una célula no cancerosa y/o no patógena). Por ejemplo, una célula normal puede ser una célula necesaria para el crecimiento del pelo, pudiéndose tratar el crecimiento de pelo no deseado con un método aquí descrito; la proliferación no deseada de una célula se puede producir en el crecimiento normal del pelo, en caso de tricosis, hipertricosis, hirsutismo o foliculitis incluyendo foliculitis decalvante, foliculitis uleritematosa reticulada, foliculitis queleidea y pseudofoliculitis. En otro ejemplo, una célula normal puede ser un inmunocito implicado en una respuesta inmune no deseable, por ejemplo una respuesta autoinmune, rechazo de transplante, etc. En un ejemplo de realización, una célula normal puede ser una célula T normal, una actividad o proliferación excesiva de células T provoca una serie de enfermedades o afecciones, incluyendo: diabetes mellitus, artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis y artritis psoriásica), esclerosis múltiple, encefalomiелitis, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis autoinmune, dermatitis (incluyendo dermatitis atópica y dermatitis eccematosa), psoriasis, síndrome de Sjögren, enfermedad de Crohn, úlcera aftosa, iritis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, diabetes de tipo I,

- 5 enfermedades intestinales inflamatorias, colitis ulcerosa, asma, asma alérgica, lupus eritematoso cutáneo, esclerodermia, vaginitis, proctitis, alergias medicamentosas, reacciones inversas de lepra, eritema nudoso leproso, uveítis autoinmune, encefalomiелitis alérgica, encefalopatía hemorrágica necrosante aguda, hipoacusia neurosensorial progresiva bilateral idiopática, anemia aplásica, anemia de glóbulos rojos puros, trombocitopenia idiopática, policondritis, granulomatosis de Wegener, hepatitis crónica activa, síndrome de Stevens-Johnson, celiacía idiopática, liquen plano, enfermedad de Graves, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveítis posterior, fibrosis pulmonar intersticial, enfermedad de injerto versus huésped, casos de trasplantes (incluyendo trasplantes utilizando tejidos alogénicos o tejidos xenogénicos), como trasplantes de médula ósea, trasplante de hígado, o trasplante de cualquier órgano o tejido, alergias como alergia atópica y neoplasias de células T tales como leucemias y linfomas.
- 10 En determinados aspectos de los métodos aquí descritos se pueden administrar uno o más inhibidores de ácido nucleico de R2, juntos (simultáneamente) o en momentos diferentes (secuencialmente). Por ejemplo, de acuerdo con los métodos aquí descritos se pueden utilizar dos o más ARNs, ARNs, ácidos nucleicos enzimáticos o combinaciones de los mismos.
- 15 En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos inhibidores en cuestión de la solicitud de pueden utilizar solos. Alternativamente, los ácidos nucleicos inhibidores en cuestión se pueden administrar en combinación con otras terapias contra el cáncer, contra agentes patógenos u otras, dirigidas al tratamiento o la prevención de la proliferación celular no deseada. Por ejemplo, estos métodos se pueden utilizar en la prevención profiláctica del cáncer, la prevención de la recurrencia del cáncer y las metástasis después de cirugía, y como adyuvante de otras terapias contra el cáncer convencionales. La presente solicitud reconoce que la eficacia de las terapias contra el cáncer convencionales (por ejemplo quimioterapia, radioterapia, fototerapia, inmunoterapia y cirugía) se puede incrementar mediante el uso de uno de los agentes de ácido nucleico en cuestión. Cuando se utiliza una terapia combinada que comprende un ácido nucleico inhibidor de R2 y otro agente terapéutico, estos agentes terapéuticos se pueden administrar por separado o de forma conjunta. Las terapias combinadas pueden incluir un ácido nucleico inhibidor de R2 y otro agente terapéutico formulados juntos o administrados como formulaciones independientes.
- 20
- 25 Se ha demostrado que existe una amplia gama de compuestos convencionales que tienen actividad antineoplásica. Estos compuestos se han utilizado como agentes farmacéuticos en la quimioterapia para reducir el tamaño de tumores sólidos, prevenir metástasis y crecimientos posteriores o para disminuir la cantidad de células malignas en tumores malignos leucémicos o de médula ósea. Aunque la quimioterapia es eficaz para el tratamiento de diversos tipos de tumores malignos, muchos compuestos antineoplásicos inducen efectos secundarios no deseables. Se ha demostrado que cuando se combinan dos o más tratamientos diferentes, los tratamientos pueden actuar de forma sinérgica y permitir la disminución de la dosis de cada uno de los tratamientos, con lo que se reducen los efectos secundarios perjudiciales ejercidos por cada compuesto en dosis más altas. En otros casos, tumores malignos que no responden a un tratamiento pueden responder a una terapia combinada de dos o más tratamientos diferentes.
- 30
- 35 Compuestos farmacéuticos que pueden ser utilizados para la terapia combinatoria, en particular la terapia antitumoral, incluyen, únicamente a título ilustrativo: aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, asparaginasa, BCG, bicalutamida, bleomicina, buserelina, busulfano, camptotecina, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, cladribina, clodronato, colchicina, ciclofosfamida, ciproterona, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina, dienestrol, dietilestilbestrol, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, estradiol, estramustina, etopósido, exemestano, filgrastim, fludarabina, fludrocortisona, fluorouracilo, fluoximesterona, flutamida, gemcitabina, genisteína, goserelina, hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, imatinib, interferón, irinotecán, ironotecán, letrozol, leucovorina, leuprolida, levamisol, lomustina, mecloretamina, medroxiprogesterona, megestrol, melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nilutamida, nocodazole, octreotida, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato, pentostatina, plicamicina, porfímero, procarbazona, raltitrexed, rituximab, estreptozocina, suramina, tamoxifeno, temozolomida, teniposida, testosterona, tioguanina, tiotepa, dicloruro de titanoceno, topotecán, trastuzumab, tretinoína, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina.
- 40
- 45
- Estos compuestos antitumorales quimioterapéuticos se pueden clasificar por su mecanismo de acción, por ejemplo, en los siguientes grupos: antimetabolitos/agentes anticancerosos, como análogos de pirimidina (5-fluorouracilo, floxuridina, capecitabina, gemcitabina y citarabina) y análogos de purina, antagonistas de folato e inhibidores relacionados (mercaptopurina, tioguanina, pentostatina y 2-clorodesoxiadenosina (cladribina)); agentes antiproliferativos/antimitóticos, incluyendo productos naturales tales como alcaloides vinca (vinblastina, vincristina y vinorelbina), disruptores de microtúbulos tales como taxano (paclitaxel, docetaxel), vincristina, vinblastina, nocodazol, epotilonas y navelbina, epididodofilotoxinas (etopósido, teniposida), agentes destructores de ADN (actinomicina, amsacrina, antraciclinas, bleomicina, busulfano, camptotecina, carboplatino, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, cytoxan; dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, hexametilmelamina oxaliplatino, ifosfamida, melfalán, mecloretamina, mitomicina, mitoxantrona, nitrosourea, plicamicina, procarbazona, taxol, taxotere, teniposida, trietilenotiofosforamida y etopósido (VP16)); antibióticos tales como dactinomicina (actinomicina D), daunorubicina, doxorubicina (adriamicina), idarubicina, antraciclinas, mitoxantrona, bleomicinas, plicamicina (mitramicina) y mitomicina; enzimas L-asparaginasa, que metabolizan sistémicamente L-asparagina y deprimen las células que no tienen capacidad para sintetizar su propia asparagina; agentes antiplaquetarios; alquilantes antiproliferativos/antimitóticos tales como mostazas nitrogenadas (mecloretamina, ciclofosfamida y análogos, melfalán, clorambucilo), etileniminas y metilmelaminas (hexametilmelamina y tiotepa), alquil sulfonatos-busulfano, nitrosoureas (carmustina (BCNU) y análogos, estreptozocina), tratenos-dacarbazina (DTIC); antimetabolitos antiproliferativos / antimitóticos tales como análogos de ácido fólico (metotrexato);
- 50
- 55
- 60

complejos de coordinación (cisplatino, carboplatino), procarbazona, hidroxiurea, mitotano, aminoglucetimidato; hormonas, análogos de hormonas (estrógeno, tamoxifeno, goserelina, bicalutamida, nilutamida) e inhibidores de aromatasa (letrozol, anastrozol); anticoagulantes (heparina, sales de heparina sintéticas y otros inhibidores de trombina); agentes fibrinolíticos (activador de plasminógeno tisular, estreptoquinasa y uroquinasa), aspirina, dipyridamol, ticlopidina, clopidogrel, abciximab; agentes antimigración; agentes antiseoretos (breveldin); inmunosupresores (ciclosporina, tacrolimús (FK-506), sirolimús (rapamicina), azatioprina, micofenolato mofetil); compuestos antiangiogénicos (TNP-470, genisteína) e inhibidores de factor de crecimiento (inhibidores del factor de crecimiento endotelial (VEGF), inhibidores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)); antagonista de los receptores de la angiotensina, donadores de óxido nítrico; oligonucleótidos antisentido; anticuerpos (trastuzumab); inhibidores del ciclo celular e inductores de diferenciación (tretinoína); inhibidores de mTOR, inhibidores de topoisomerasa (doxorubicina (adriamicina), amsacrina, camptotecina, daunorubicina, dactinomicina, eniposida, epirubicina, etopósido, idarubicina y mitoxantrona, topotecán, irinotecán), corticosteroides (cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona y prenisolona); inhibidores de quinasa de transducción de señal de factor de crecimiento; inductores de disfunción mitocondrial y activadores de caspasa; y disruptores de cromatina.

Los ácidos nucleicos inhibidores de R2 aquí descritos se pueden administrar en combinación con otros agentes terapéuticos, incluyendo, por ejemplo, agentes antiinflamatorios, agentes inmunosupresores y/o agentes antiinfecciosos (por ejemplo compuestos antibióticos, antivirales y/o antimicóticos, etc.). Los fármacos antiinflamatorios incluyen, por ejemplo, fármacos antiinflamatorios esteroideos (por ejemplo cortisol, aldosterona, prednisona, metilprednisona, triamcinolona, dexametasona, desoxicorticosterona y fluorocortisol) y no esteroideos (por ejemplo, ibuprofeno, naproxeno y piroxicam). Los fármacos inmunosupresores incluyen, por ejemplo, prednisona, azatioprina (Imuran), ciclosporina (Sandimmune, Neoral), rapamicina, globulina antitumoral, daclizumab, OKT3 y ALG, micofenolato mofetil (Cellcept) y tacrolimús (Prograf, FK506). Los antibióticos incluyen, por ejemplo, fármacos sulfa (por ejemplo sulfanilamida), análogos de ácido fólico (por ejemplo trimetoprima), beta-lactamas (por ejemplo penicilina, cefalosporinas), aminoglucósidos (por ejemplo estreptomina, canamicina, neomicina, gentamicina), tetraciclinas (por ejemplo clortetraciclina, oxitetraciclina y doxiciclina), macrólidos (por ejemplo eritromicina, azitromicina y claritromicina), lincosamidas (por ejemplo clindamicina), estreptograminas (por ejemplo quinupristina y dalfopristina), fluoroquinolonas (por ejemplo ciprofloxacina, levofloxacina y moxifloxacina), polipéptidos (por ejemplo polimixinas), rifampicina, mupirocina, cicloserina, aminociclitol (por ejemplo espectinomicina), glicopéptidos (por ejemplo vancomicina) y oxazolidinonas (por ejemplo linezolid). Los agentes antivirales incluyen, por ejemplo, vidarabina, aciclovir, ganciclovir, valganciclovir, inhibidores de transcriptasa inversa análoga de nucleósido (por ejemplo ZAT, ddl, ddC, D4T, 3TC), inhibidores de transcriptasa inversa no nucleósidos (por ejemplo nevirapina, delavirdina), inhibidores de la proteasa (por ejemplo saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir), ribavirina, amantadina, rimantadina, relenza, tamiflu, pleconaril e interferones. Los fármacos antimicóticos incluyen, por ejemplo, antimicóticos de polieno (por ejemplo anfotericina y nistatina), antimicóticos de imidazol (ketoconazol y miconazol), antimicóticos de triazol (por ejemplo fluconazol e itraconazol), flucitosina, griseofulvina y terbinafina.

Dependiendo de la naturaleza de la terapia combinada, la administración de los agentes terapéuticos de ácido nucleico de la solicitud puede continuar mientras se administra la otra terapia y/o después de ésta. La administración de los agentes terapéuticos de ácido nucleico se puede realizar en una sola dosis o en múltiples dosis. En algunos casos, la administración de los agentes terapéuticos de ácido nucleico puede comenzar al menos varios días antes de la terapia convencional, mientras que en otros casos la administración se puede iniciar inmediatamente antes o en el momento de la administración de la terapia convencional.

Métodos de administración y composiciones

En determinadas realizaciones, la solicitud proporciona composiciones que comprenden un o más inhibidores de R2 aquí descritos. En determinadas realizaciones, las composiciones son productos farmacéuticos adecuados para el uso terapéutico en un paciente. En aspectos alternativos, las composiciones son productos no farmacéuticos y no cosméticos. En general, la diferencia entre un producto cosmético y un producto farmacéutico consiste en que este último requiere la aprobación reglamentaria (por ejemplo por la Food and Drug Administration) para ser utilizado en un humano o animal.

Los métodos para suministrar los inhibidores de R2, en particular los ácidos nucleicos, se pueden basar en métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Akhtar y col., 1992, Trends Cell Bio., 2, 139; y Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995; Sullivan y co., Publicación PCT WO 94/02595). Estos protocolos se pueden utilizar modificados o mejorados para el suministro de virtualmente cualquier ácido nucleico. Los ácidos nucleicos se pueden administrar a las células mediante diversos métodos conocidos por los especialistas en la técnica, incluyendo, de forma no exclusiva, encapsulación en liposomas, por iontoforesis o por incorporación en otros vehículos como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas. Alternativamente, la combinación ácido nucleico/ vehículo se suministra localmente mediante inyección directa o mediante el uso de una bomba de infusión. Otras vías de suministro incluyen, de forma no exclusiva, el suministro oral (en forma de pastilla o píldora) y/o intratecal (Gold, 1997, Neuroscience, 76, 1153-1158). Otros métodos incluyen el uso de diversos sistemas de transporte y soporte, por ejemplo mediante el empleo de polímeros conjugados y biodegradables. En determinadas realizaciones, el inhibidor de R2 en cuestión y el vehículo se combinan y formulan en una forma de dosificación final antes de la administración. En realizaciones alternativas, el inhibidor de R2 en cuestión y el vehículo se formulan por separado de modo que se combinarán entre sí en el momento de la administración. Por ejemplo, el inhibidor de R2 en

5 cuestión y el vehículo se pueden guardar en compartimentos independientes de un *kit* o de un envase de suministro y, en el momento de la administración en un lugar deseado o a través de una vía deseada, el inhibidor de R2 en cuestión y el vehículo se mezclan. Los compartimentos independientes pueden consistir en viales independientes en un *kit*, cartuchos separados en una jeringuilla precargada de tipo lapicero para la administración de medicinas (véase la Patente US 5.542.760), cánulas o compartimentos separados en una jeringuilla, etc.

En determinadas realizaciones, los inhibidores de R2 en cuestión se proporcionan en forma de complejos supramoleculares que incluyen micropartículas poliméricas o nanopartículas como vehículos de suministro. Tal como se utilizan aquí, los términos “micropartículas” o “nanopartículas” incluyen microesferas o nanoesferas (esferas uniformes), microcápsulas o nanocápsulas (que tienen un núcleo y una capa exterior de polímero) y partículas de forma irregular.

10 La solicitud prevé el uso de polímeros que son preferentemente biodegradables dentro del período de tiempo durante el cual se desea que sea liberado el inhibidor de R2 o relativamente poco después de dicho período, en general alrededor de un año, más típicamente unos meses y de forma todavía más típica entre unos días y unas semanas después. La biodegradación se puede referir a una desintegración tanto de las micropartículas, es decir la disociación de los polímeros que forman las micropartículas/nanopartículas, como de los propios polímeros. Esto puede ocurrir como resultado de un cambio del pH del soporte en el que las partículas son administradas al pH del lugar de liberación, como en el caso de las dicetopiperazinas; por hidrólisis, como en el caso de los poli(hidroxiácidos); por difusión de un ion, como calcio, fuera de la micropartícula, como en el caso de las micropartículas o nanopartículas formadas por unión iónica de un polímero, como alginato; y por acción enzimática, como en el caso de muchos de los polisacáridos y proteínas. En algunos casos puede resultar más útil una liberación lineal, aunque en otros una liberación por impulsos o “liberación en bolo” puede dar resultados más efectivos.

25 Como materiales sintéticos representativos se mencionan dicetopiperazinas, poli(hidroxiácidos) tales como ácido poli(láctico), ácido poli(glicólico) y copolímeros de éstos, polianhidridos, poliésteres tales como poliortoésteres, poliamidas, policarbonatos, polialquilenos tales como polietileno, polipropileno, poli(etilenglicol), óxido de poli(etileno), tereftalato de poli(etileno), compuestos polivinílicos tales como alcoholes polivinílicos, éteres polivinílicos, ésteres polivinílicos, haluros polivinílicos, polivinilpirrolidona, acetato de polivinilo y cloruro de polivinilo, poliestireno, polisiloxanos, polímeros de ácidos acrílicos y metacrílicos, incluyendo poli(metilmetakrilato), poli(etilmetakrilato), poli(butilmetakrilato), poli(isobutilmetakrilato), poli(hexilmetakrilato), poli(isodecilmetakrilato), poli(laurilmetakrilato), poli(fenilmetakrilato), poli(metilacrilato), poli(isopropilacrilato), poli(isobutilacrilato), poli(octadecilacrilato), poliuretanos y copolímeros de los mismos, celulosas, incluyendo alquilcelulosa, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato-butirato de celulosa, acetato-ftalato de celulosa, carboxiletilcelulosa, triacetato de celulosa y sal sódica de sulfato de celulosa, ácido poli(butírico), ácido poli(valérico), y poli(lactida-co-caprolactona).

35 Los polímeros naturales incluyen alginatos y otros polisacáridos, incluyendo dextrano y celulosa, colágeno, albúmina y otras proteínas hidrófilas, zeína y otras prolaminas y proteínas hidrófobas, copolímeros y mezclas de los mismos. Tal como se utiliza aquí, “derivados químicos de los mismos” se refiere a sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo alquilo, alquileo, hidroxilaciones, oxidaciones y otras modificaciones realizadas rutinariamente por los expertos en la técnica.

40 Los polímeros bioadhesivos incluyen los hidrogeles bioerosionables descritos por H. S. Sawhney, C. P. Pathak y J. A. Hubell, en *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587, ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhidridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano y poliacrilatos.

45 Para consultar un análisis completo sobre estrategias de suministro de fármacos, véase Ho y col., 1999, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 1, 336-343, y Jain, *Drug Delivery Systems: Technologies and Commercial Opportunities*, Decision Resources, 1998, y Groothuis y col., 1997, *J. NeuroVirol.*, 3, 387-400. En Sullivan y col., *supra*, Draper y col., PCT WO93/23569, Beigelman y col., Publicación PCT WO 99/05094 y Klimuk y col., Publicación PCT WO 99/04819 se proporcionan descripciones más detalladas del suministro y la administración de ácidos nucleicos.

50 Tal como se utilizan aquí, los términos “administración parenteral” y “administrado por vía parenteral” se refieren a formas de administración diferentes a la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal, y la administración arterial intrahepática (incluyendo inyección intrahepática e infusión intrahepática).

55 Tal como se utilizan aquí, los términos “administración sistémica” y “administrado por vía sistémica” y “administración periférica” y “administrado por vía periférica” se refiere a la administración de un compuesto, fármaco u otro material de un modo diferente a la administración directa en el sistema nervioso central, de modo que entra en el sistema del paciente y, en consecuencia, se somete al metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo la administración subcutánea.

En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos en cuestión (por ejemplo constructos de ARNi y ácidos nucleicos enzimáticos) de la presente solicitud se formulan con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estos agentes terapéuticos se pueden administrar solos o como un componente de una formulación (composición) farmacéutica. Los agentes se pueden formular para la administración de cualquier modo conveniente para el uso en la medicina humana o veterinaria. Las composiciones también pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como lauril-sulfato de sodio y estearato de magnesio, y también agentes colorantes, agentes de desmoldeo, productos de revestimiento, edulcorantes, saborizantes y aromatizantes, conservantes y antioxidantes.

Las formulaciones de los ácidos nucleicos en cuestión incluyen aquellas adecuadas para la administración sistémica, local, oral, nasal, tópica, parenteral, rectal y/o intravaginal. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosis unitarias y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material vehículo para producir una forma de dosificación simple variará en función del huésped que esté siendo tratado y del modo de administración particular. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material vehículo para producir una forma de dosificación simple será generalmente la cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico.

En determinadas realizaciones, los métodos para preparar estas formulaciones o composiciones incluyen la combinación de otro tipo de agente terapéutico o antiinfeccioso y un vehículo y, opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se pueden preparar con un vehículo líquido o sólido finamente dividido o ambos, y en caso necesario después se puede conformar el producto.

Las formulaciones para la administración oral se pueden presentar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, tabletas, comprimidos para chupar (utilizando una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (utilizando una base inerte, como gelatina y glicerina, o como sacarosa y goma arábiga) y/o como enjuagues bucales y similares, que contienen en cada caso una cantidad predeterminada de un agente terapéutico del ácido nucleico en cuestión como ingrediente activo.

En las formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, tabletas, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), uno o más agentes terapéuticos del ácido nucleico de la presente solicitud se pueden mezclar con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes ingredientes: (1) materiales de relleno o cargas, como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, por ejemplo carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; (3) humectantes, como glicerol; (4) agentes desintegrantes, como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de solución, como parafina; (6) aceleradores de absorción, como compuestos de amonio cuaternarios; (7) agentes humectantes, por ejemplo alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril-sulfato de sodio y mezclas de éstos; y (10) agentes colorantes. En el caso de las cápsulas, tabletas y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden incluir agentes tampón. También se pueden utilizar composiciones sólidas de tipo similar como materiales de relleno en cápsulas de gelatina blanda y dura empleando excipientes tales como lactosa o azúcares lácteos, y también polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Las formas de dosificación líquidas para la administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquida pueden contener los diluyentes inertes utilizados comúnmente en la técnica, como agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular aceites de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitano y mezclas de los mismos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones para la administración oral también pueden incluir adyuvantes tales como humectantes, emulsionantes y agentes de suspensión, edulcorantes, saborizantes, colorantes, aromatizantes y conservantes.

Además de los compuestos activos, las suspensiones pueden contener agentes de suspensión tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilen-sorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto y mezclas de los mismos.

Los usos y las composiciones de la solicitud se pueden administrar por vía tópica, en la piel o en membranas mucosas tales como las del cuello uterino y la vagina. Este es el mejor modo de realizar un suministro directo ante una proliferación celular no deseada localizada en la piel o en membranas mucosas con la menor posibilidad de inducir efectos secundarios. Las formulaciones para la administración tópica pueden incluir además uno o más de una gran variedad de agentes conocidos por ser promotores eficaces de la penetración en la piel o el estrato córneo. Éstos son, por ejemplo, en 2-pirrolidona, N-metil-2-pirrolidona, dimetilacetamida, dimetilformamida, propilenglicol, alcohol metílico o isopropílico, sulfóxido de dimetilo y azona. También se pueden incluir otros agentes adicionales para hacer que la formulación sea cosméticamente aceptable, por ejemplo grasas, ceras, aceites, tintes, fragancias, conservantes, estabilizadores y agentes tensioactivos. Además se pueden incluir agentes queratolíticos tales como los conocidos en la técnica, por ejemplo ácido salicílico y azufre.

Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica incluyen polvos, pulverizaciones, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches, composiciones de inhalación. Los ácidos nucleicos en cuestión se pueden mezclar bajo condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, tampón o propelente que sea necesario. Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además de una molécula del ácido nucleico en cuestión, excipientes tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonita, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos.

Los polvos y pulverizaciones pueden contener, además de un agente terapéutico del ácido nucleico en cuestión, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Los pulverizadores pueden contener adicionalmente los propelentes usuales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos como butano y propano.

Las formulaciones adecuadas para inhalación también están descritas y dichas formulaciones pueden utilizarse para el suministro pulmonar, que se puede localizar en el sistema pulmonar o ser sistémico. Ejemplos de dispositivos farmacéuticos para el suministro pulmonar incluyen inhaladores dosificadores (*metered dose inhaler* - MDI) e inhaladores de polvo seco (*dry powder inhaler* - DPI). Por ejemplo, en las Patentes US 5.756.353, 5.858.784; y las solicitudes PCT WO 98/31346; WO 98/10796; WO 00/27359; WO 01/54664; y WO 02/060412, se describen ejemplos de sistemas de suministro por inhalación que se pueden adaptarse para el suministro del inhibidor de R2 en cuestión y/o al principio activo. En las Patentes US 6.294.153, 6.344.194, 6.071.497, la Publicación de Solicitud de Patente US 2004/0063654 y las solicitudes PCT WO 02/066078, WO 02/053190, WO 01/60420, WO 00/66206 se describen otras formulaciones de aerosol que pueden ser utilizadas para suministrar el inhibidor de la R2 y/o el principio activo.

Los inhaladores dosificadores (MDI) a presión son los inhaladores más utilizados en todo el mundo. El aerosol se crea cuando se abre una válvula (normalmente presionando hacia abajo la válvula propelente) que permite que el propelente líquido salga pulverizado desde el recipiente. Típicamente, un fármaco o un agente terapéutico está suspendido en pequeñas partículas (normalmente de unas micras de diámetro) en el líquido propelente, pero en algunas formulaciones el fármaco o el agente terapéutico puede estar disuelto en el propelente. El propelente se evapora rápidamente cuando el aerosol sale del dispositivo, lo que deja pequeñas partículas de fármaco o de agente terapéutico que son inhaladas. Los propelentes utilizados típicamente en estos MDI incluyen, de forma no exclusiva, hidrofluoroalcanos (HFA). También se puede utilizar un agente tensioactivo, por ejemplo, para formular el fármaco o agente terapéutico con los MDI. Además se pueden emplear otros disolventes o excipientes con los MDI, tales como etanol, ácido ascórbico, metabisulfato de sodio, glicerina, clorobutanol y cloruro de cetilpiridinio. Estos MDI pueden incluir además dispositivos adicionales tales como, por ejemplo, distanciadores, cámaras de retención y otras modificaciones.

El tercer tipo de inhalador es el inhalador de polvo seco (DPI). En los DPI, el aerosol consiste normalmente en un polvo contenido dentro del dispositivo hasta el momento de su inhalación. El agente terapéutico o fármaco se produce en forma de polvo como partículas pequeñas (normalmente con un diámetro de unas millonésimas de metro o micrómetros). En muchos DPI, el fármaco o agente terapéutico se mezcla con partículas de azúcar mucho más grandes (por ejemplo monohidrato de lactosa), que tienen típicamente un diámetro de 50-100 micrómetros. Las mayores fuerzas aerodinámicas en los aglomerados de lactosa/fármaco mejoran el arrastre de las partículas de fármaco durante la inhalación, además de facilitar el llenado de pequeñas dosis de polvo individuales. Durante la inhalación, el polvo se descompone en sus partículas constituyentes con ayuda de la turbulencia y/o de dispositivos mecánicos tales como tamices o superficies giratorias sobre las que impactan los aglomerados de partículas, dejando las pequeñas partículas de polvo de fármaco individuales en el aire para que sean inhaladas al pulmón. Normalmente está previsto que las partículas de azúcar se queden en el dispositivo y/o en la boca-garganta.

Un aspecto de la solicitud proporciona una composición en aerosol que comprende un inhibidor de R2. Una composición en aerosol puede ser aquella que comprende un inhibidor de R2 en aerosol o una composición que comprende un inhibidor de R2 en una formulación adecuada para ser administrada en forma de aerosol. El inhibidor de R2 se puede formular en combinación con cualquier principio activo adicional, siendo adecuada la formulación de combinación para tener forma de aerosol. Alternativamente, el inhibidor de R2 y un principio activo adicional se pueden formular por separado, de modo que se combinen después de tener forma de aerosol o después de haber sido administrados a un sujeto.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden comprender uno o más agentes de ácido nucleico en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas, isotónicas y estériles, farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden ser reconstituídos en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, los cuales pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos, solutos que vuelven la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes. Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la solicitud incluyen agua, etanol, polioles (como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas los mismos, aceites vegetales, como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, como oleato de etilo. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, empleando materiales de revestimiento, como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y empleando agentes tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes y dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antimicóticos, por ejemplo parabeno, clorobutanol, ácido sórbico, fenol y similares. También puede ser deseable incluir en la composición agentes isotónicos, como azúcares, cloruro de sodio y similares. Además se puede provocar una absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tal como monoestearato de aluminio y gelatina.

Se pueden producir formas de depósito inyectables mediante la formación de matrices microencapsuladas de uno o más agentes de ácido nucleico en polímeros biodegradables, tales como polilactida-poliglicolida. La velocidad de liberación del fármaco se puede controlar en función de la proporción entre el fármaco y el polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). También se preparan formulaciones inyectables de depósito encerrando el fármaco en liposomas o microemulsiones compatibles con el tejido corporal.

Las formulaciones para la administración intravaginal o rectal se puede presentar en forma de supositorios, los cuales se pueden preparar mezclando uno o más compuestos de la solicitud con uno o más excipientes o vehículos no irritantes adecuados, incluyendo, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, ceras para supositorios o salicilatos, y que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura corporal y, en consecuencia, se funden en el recto o la cavidad vaginal, liberando el compuesto activo.

En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos de la presente solicitud se formulan con un agente farmacéuticamente aceptable que permite la distribución eficaz de los ácidos nucleicos en el lugar físico más adecuado para su actividad deseada. Algunos ejemplos no limitativos de estos agentes farmacéuticamente aceptables incluyen: PEG, fosfolípidos, fosforotioatos, inhibidores de la P-glicoproteína (como Pluronic P85) que pueden mejorar la entrada de los fármacos en diversos tejidos, polímeros biodegradables tales como microesferas de poli(DL-lactida-coglicolida) para un suministro de liberación prolongada después de un implante (Emerich, DF y col., 1999, Cell Transplant, 8,47-58) y nanopartículas cargadas, tales como las producidas a partir de polibutilcianoacrilato, que pueden suministrar los fármacos a través de la barrera hematoencefálica y pueden modificar el mecanismo de absorción neuronal (Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949,1999).

En otras realizaciones, ciertos ácidos nucleicos determinados de la presente solicitud se pueden expresar dentro de células promotoras eucariotas (por ejemplo Izant y Weintraub, 1985, Science, 229, 345; McGarry y Lindquist, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 83, 399; Scanlon y col., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10591-5; Kashani-Sabet y col., 1992, Antisense Res. Dev., 2, 3-15; Dropulic y col., 1992, J. Virol., 66, 1432-41; Weerasinghe y col., 1991, J. Virol., 65, 5531-4; Ojwang y col., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89,10802-6; Chen y col., 1992, Nucleic Acids Res., 20,4581-9; Sarver y col., 1990 Science, 247, 1222-1225; Thompson y col., 1995, Nucleic Acids Res., 23, 2259; Good y col., 1997, Gene Therapy, 4, 45). Los expertos en la técnica saben que cualquier ácido nucleico puede ser expresado en células eucariotas a partir del vector de ADN/ARN adecuado. La actividad de estos ácidos nucleicos se puede aumentar mediante su liberación desde el transcrito primario mediante un ácido nucleico enzimático (Draper y col., PCT WO 93/23569 y Sullivan y col., PCT WO 94/02595; Ohkawa y col., 1992, Nucleic Acids Symp. Ser., 27, 15-6; Taira y col., 1991, Nucleic Acids Res., 19, 5125-30; Ventura y col., 1993, Nucleic Acids Res., 21, 3249-55; Chowrira y col., 1994, J. Biol. Chem., 269, 25856; todas estas referencias están incorporadas aquí íntegramente por referencia). Blesch y col., 2000, Drug News Perspect., 13, 269-280; Peterson y col., 2000, Cent. Nerv. Syst. Dis., 485-508; Peel y Klein, 2000, J. Neurosci. Methods, 98, 95-104; Hagihara y col., 2000, Gene Ther., 7, 759-763; y Herrlinger y col., 2000, Methods Mol. Med., 35, 287-312, han descrito métodos de terapia genética específica para el SNC. Además, Kaplitt y col., Pat. US 6.180.613, han descrito el suministro de ácido nucleico mediado por AAV a células del sistema nervioso.

En otro aspecto de la solicitud, las moléculas de ARN de la presente solicitud se expresan preferentemente desde unidades de transcripción (véase, por ejemplo, Couture y col., 1996, TIG., 12, 510) insertadas en vectores de ADN o ARN. Los vectores recombinantes son preferentemente plásmidos de ADN o vectores virales. Se pueden construir ribozimas que expresan vectores virales basadas, de forma no exclusiva, en virus adenoasociados, retrovirus, adenovirus o alfavirus. Preferentemente, los vectores recombinantes capaces de expresar los ácidos nucleicos se suministran tal como se describe más arriba y persisten en las células diana. Alternativamente, se pueden utilizar vectores virales que proporcionan una expresión transitoria de los ácidos nucleicos. Estos vectores se pueden administrar de forma reiterada en la medida necesaria. Una vez expresado, el ácido nucleico se une al ARNm diana. El suministro de vectores que expresan ácidos nucleicos puede ser sistémico, por ejemplo por administración intravenosa o intramuscular, por administración a células diana de explante del paciente seguida de reintroducción en el paciente, o mediante cualquier otro medio que permita la introducción en la célula diana deseada (para una revisión al respecto, véase Couture y col., 1996, TIG., 12, 510).

En un aspecto, la solicitud prevé un vector de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos uno de los ácidos nucleicos de la presente solicitud. La secuencia de ácidos nucleicos está enlazada funcionalmente de modo que permite la expresión del ácido nucleico de la solicitud. Por ejemplo, la invención presenta un vector de expresión que comprende: a) una región de iniciación de transcripción (por ejemplo región de iniciación eucariota pol I, II o III); b) una región de terminación de transcripción (por ejemplo región de terminación eucariota pol I, II o III); c) una secuencia de ácidos nucleicos que codifican al menos uno de los catalizadores de ácido nucleico de la presente solicitud; estando dicha secuencia enlazada funcionalmente con dicha región de iniciación y dicha región de

terminación de modo que permite la expresión y/o el suministro de dicho ácido nucleico. El vector puede incluir opcionalmente un marco de lectura abierta (*open reading frame* - ORF) para una proteína enlazada funcionalmente en el extremo 5' o el extremo 3' de la secuencia que codifica el catalizador de ácido nucleico de la solicitud; y/o un intrón (secuencia intercalada).

- 5 En determinadas realizaciones que incluyen ácidos nucleicos bicatenarios, las dos cadenas se pueden expresar por separado y después hibridarse en una célula. Esta expresión separada puede tener lugar a través de constructos de expresión independientes o a través de un único constructo de expresión. Alternativamente, las dos cadenas se pueden expresar juntas. Por ejemplo, las dos cadenas de un ARN en horquilla se pueden expresar juntas.
- 10 Independientemente de la vía de administración elegida, los inhibidores de R2 de la presente solicitud, que se pueden utilizar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente solicitud se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables tal como se describe más abajo o mediante otros métodos convencionales.
- 15 Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar para obtener la cantidad eficaz del ingrediente activo para lograr la respuesta terapéutica deseada en un paciente, la composición y la forma de administración en particular, sin que sean tóxicos para el paciente.
- 20 El nivel de dosificación elegido dependerá de diversos factores, incluyendo la actividad del inhibidor de R2 de la presente solicitud empleado en particular, o del éster, sal o amida del mismo, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con el inhibidor de R2 particular empleado, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y el historial médico previo del paciente tratado, y factores similares bien conocidos en la ciencia médica.
- 25 El médico o veterinario determinará y prescribirá fácilmente la cantidad efectiva de la composición requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar con dosis de los inhibidores de R2 de la solicitud empleados en la composición farmacéutica en niveles inferiores a los necesarios para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta lograr el efecto deseado.
- 30 En general, una dosis diaria adecuada de un inhibidor de R2 de la solicitud será la cantidad del compuesto que se corresponda con la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Esta dosis eficaz dependerá generalmente de los factores arriba descritos. En general, las dosis intravenosas, intracerebro-ventriculares y subcutáneas en un paciente oscilarán entre aproximadamente 0,0001 y aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal al día.
- Si así se desea, la dosis diaria eficaz del compuesto activo se puede administrar en forma de dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente en formas de dosificación unitaria.
- 35 Las formulaciones farmacéuticas de la presente solicitud también incluyen composiciones veterinarias, por ejemplo preparaciones farmacéuticas de inhibidores de R2 adecuadas para uso veterinario, para el tratamiento de ganado o animales domésticos, por ejemplo perros. El paciente receptor de este tratamiento es cualquier animal que lo necesite, incluyendo primates, en particular humanos, y otros mamíferos no humanos tales como equinos, reses, cerdos; y aves de corral y animales domésticos en general.
- 40 Los inhibidores de R2 también se pueden formular para usos no farmacéuticos, por ejemplo como desinfectantes para eliminar agentes patógenos de cualquier objeto contaminado con patógenos, o para utilizarlos como cosméticos para eliminar un crecimiento de pelo no deseado. Una composición cosmética se puede formular de modo similar a determinadas composiciones farmacéuticas (por ejemplo como loción, ungüento, película, parche, etc.) aquí descritas.
- 45 Los inhibidores de R2 tales como los constructos de ARNi de la solicitud, también se pueden mezclar, encapsular, conjugar o asociar de otro modo con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, por ejemplo liposomas, polímeros, moléculas dirigidas a receptores, formulaciones orales, rectales, tópicas o de otro tipo, para ayudar a la incorporación, distribución y/o absorción. Los constructos de ARNi en cuestión se pueden suministrar en formulaciones que también incluyen promotores de penetración, compuestos vehículo y/o agentes de transfección.
- 50 Patentes de Estados Unidos representativas que describen la preparación de dichas formulaciones que ayudan a la incorporación, distribución y/o absorción y que pueden ser adaptadas para el suministro de constructos de ARNi, en particular moléculas de ARNsi, incluyen, de forma no exclusiva, US 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.1543.158; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575; y 5.595.756.
- 55 Los constructos de ARNi de la solicitud también incluyen cualquier sal, éster, o sal de éster farmacéuticamente aceptable o cualquier otro compuesto que, al ser administrado a un animal, incluyendo humanos, es capaz de

proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o un residuo del mismo. Por consiguiente, la descripción también se refiere a constructos de ARNi y sales farmacéuticamente aceptables de ARNsi, sales farmacéuticamente aceptables de estos constructos de ARNi y otros bioequivalentes.

5 Las sales de adición de una base farmacéuticamente aceptables se forman con metales o aminas, tales como metales alcalinos y alcalinotérreos o aminas orgánicas. Metales utilizados como cationes son, por ejemplo, sodio, potasio, magnesio, calcio y similares. Aminas adecuadas son, por ejemplo, N,N-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, dicitclohexilamina, etilendiamina, N-metilglucamina, y procaína (véase, por ejemplo, Berge y col., "Pharmaceutical Salts," J. of Pharma Sci., 1977, 66,1-19). Las sales de adición de una base de dichos compuestos ácidos se preparan poniendo en contacto la forma de ácido libre con una cantidad suficiente de la base deseada para producir la sal de modo convencional. La forma de ácido libre se puede regenerar poniendo en contado la forma de sal con un ácido y aislando el ácido libre de modo convencional. Las formas de ácido libre se diferencian algo de sus formas de sal respectivas en determinadas propiedades físicas, como la solubilidad en disolventes polares, pero, por lo demás, las sales son equivalentes a su ácido libre respectivo para los fines de la presente invención. Tal como se utiliza aquí, el concepto "sal de adición de ácido" incluye una sal farmacéuticamente aceptable de una forma de ácido de uno de los componentes de la composición de la invención. Éstas incluyen sales de ácidos orgánicos o inorgánicos de las aminas. Algunas sales de ácido preferentes son clorhidratos, acetatos, salicilatos, nitratos y fosfatos. Los expertos en la técnica conocen bien otras sales farmacéuticamente aceptables adecuadas, incluyendo sales básicas de diversos ácidos inorgánicos y orgánicos.

20 En el caso de los ARNsi, ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, de forma no exclusiva, (a) sales formadas con cationes tales como sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, poliaminas tales como espermina y espermidina, etc.; (b) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo los ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y similares; (c) sales formadas con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, los ácidos acético, oxálico, tartárico, succínico, maleico, fumárico, glucónico, cítrico, málico, ascórbico, benzoico, tánico, palmítico, algínico, poliglutámico, naftalenosulfónico, metanosulfónico, p-toluensulfónico, naftalenodisulfónico, poligalacturónico y similares; y (d) sales formadas a partir de aniones elementales como cloruro, bromuro y yoduro.

Un ejemplo de composición comprende un constructo de ARNi mezclado con un sistema de suministro, tal como un sistema de liposomas, opcionalmente incluyendo un excipiente aceptable. En determinadas realizaciones, la composición se formula para la administración tópica, por ejemplo para infecciones por el virus del herpes.

30 En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos en cuestión se suministran utilizando vehículos poliméricos. El vehículo polimérico puede formar una micropartícula con uno o más de los ácidos nucleicos en cuestión. En determinadas realizaciones, en particular cuando se desea una administración sistémica, las nanopartículas pueden tener un tamaño de aproximadamente 10 nm, 20 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm, 100 nm, 120 nm, 150 nm, 200 nm o más de diámetro. En determinadas realizaciones, las nanopartículas pueden tener un tamaño de aproximadamente 10-120 nm, 10-100 nm, 50-120 nm, 50-100 nm, 10-70 nm, 50-70 nm o aproximadamente 50 nm de diámetro. En determinadas realizaciones, las nanopartículas comprenden ciclodextrina. En realizaciones particulares, las nanopartículas comprenden copolímeros de ciclodextrina, por ejemplo los copolímeros de ciclodextrina linealizados descritos en la Patente US 6.509.323 y la Publicación de Solicitud de Patente US 2002/0151523, y polímeros basados en ciclodextrina tal como los descritos en las Publicaciones de Solicitud de Patente US 2004/0077595 y 2004/0109888. En realizaciones particulares, la ciclodextrina está modificada, por ejemplo con un grupo terminal funcionalizado tal como el CDP-im aquí descrito, por ejemplo el representado en las Figuras 27 y 42. En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos se suministran utilizando complejos de inclusión tales como los descritos en las Publicaciones de Solicitud de Patente US 2003/0008818, 2003/0017972 y 2004/0063654. En determinadas realizaciones, el sistema de suministro o vehículo puede incluir adicionalmente uno o más modificadores o componentes modificadores, por ejemplo un modificador que puede cambiar la química superficial de una micropartícula. El modificador puede ser un componente aniónico. El modificador puede ser un ligando dirigido a determinados tejidos o tipos de células, tal como se describe más abajo. El modificador puede ser una molécula de polietilenglicol (PEG), por ejemplo una molécula de PEG5000.

50 En determinadas realizaciones, los inhibidores de R2 o las composiciones farmacéuticas de los mismos se pueden asociar con uno o más ligandos eficaces para unirse a proteínas de la superficie celular específicas o a una matriz específica de la célula diana, facilitando así la secuestación del complejo en las células diana, en algunos casos aumentando la absorción del constructo de ARNi por la célula. Simplemente a título ilustrativo, la siguiente Tabla muestra una lista de ejemplos de ligandos adecuados para dirigir los complejos supramoleculares y liposomas tal como se definen aquí a ciertos tipos de célula específicos.

Tabla 9 Ligandos adecuados para el suministro dirigido a diversos tipos de células

Ligando	Receptor	Tipo de célula
Folato	Receptor folato	Carcinomas epiteliales, citoblastos de médula ósea

Ligando	Receptor	Tipo de célula
Vitaminas solubles en agua	Receptor vitamina	Diversas células
Piroxidil fosfato	CD4	CD4 + linfocitos
Apolipoproteínas	LDL	Hepatocitos, células endoteliales vasculares
Insulina	Receptor de insulina	
Transferrina	Receptor transferrina	Células endoteliales
Galactosa	Receptor de asialoglicoproteínas	Hepatocitos
Sialil-Lewis _x	E, P selectina	Células endoteliales activadas
Mac-1	L selectina	Neutrófilos, leucocitos
VEGF	Fik-1,2	Células epiteliales tumorales
FGF básico	Receptor de FGF	Células epiteliales tumorales
EGF	Receptor de EGF	Células epiteliales
VCAM-1	$\alpha_4\beta_1$ integrina	Células endoteliales vasculares
ICAM-1	$\alpha_L\beta_2$ integrina	Células endoteliales vasculares
PECAM-1/CD31	$\alpha_v\beta_3$ integrina	Células endoteliales vasculares, plaquetas activadas
Osteopontina	$\alpha_v\beta_1$ integrina $\alpha_v\beta_5$ integrina	Células endoteliales y células de músculos lisos en placas ateroscleróticas
Secuencias RGD	$\alpha_v\beta_3$ integrina	Células endoteliales tumorales, células vasculares de músculos lisos
VIH GP 120/41 o GP120	CD4	CD4 + linfocitos

5 En determinadas realizaciones, los inhibidores de R2 o las composiciones farmacéuticas de éstos se pueden asociar a uno o más ligandos dirigidos que incluyen galactosa. Los ligandos que comprenden galactosa incluyen, por ejemplo, lactosa y moléculas similares. El receptor de asialoglicoproteína hepática (ASGPR) es una lectina de tipo C que se expresa sobre la superficie de los hepatocitos. El ASGPR se une a glicoproteínas con β -D-galactosa terminal (Gal) o N-acetilgalactosamina (Gal-NAc). La afinidad de ligandos por el ASGPR depende del tipo (Gal frente a GalNAc), el número (tetraantenario > triantenario » biantenariano » monoantenariano) y la disposición de los residuos multiantenarianos. Cada subunidad del polipéptido del ASGPR (el humano es un tetrámero) puede unir un Gal o GalNAc terminal simple.

10 La solicitud también describe y utiliza un vehículo de suministro que es adecuado para el suministro específico al hígado de un agente terapéutico, tal como un ácido nucleico inhibidor aquí descrito. El vehículo de suministro específico al hígado comprende: (1) un componente huésped que incluye el polímero que contiene ciclodextrina modificada con imidazol mostrado en la Figura 27 y (2) un componente "invitado" que comprende la molécula de adamantano-PEG-galactosa mostrada en la Figura 32. Cuando se mezclan junto con uno o más agentes terapéuticos, los componentes "invitado" y huésped forman un complejo de inclusión, o políplex, que encapsula el o los agentes terapéuticos en el

15 polímero para formar una composición particulada (véase la Figura 31). En determinados aspectos, el vehículo de suministro se formula para obtener una composición en partículas con un diámetro medio de aproximadamente 30-100 nm, aproximadamente 40-70 nm, aproximadamente 50-70 nm, aproximadamente 50-60 nm o de aproximadamente 50 nm.

20 En determinados aspectos, el vehículo de suministro específico al hígado se puede utilizar para suministrar cualquier tipo de agente terapéutico al hígado, por ejemplo para tratar una enfermedad o trastorno específico del hígado, o para tratar una enfermedad o trastorno que influye en el hígado o afecta al mismo.

Un agente hepático terapéutico de la invención puede ser una molécula pequeña, un péptido o un análogo peptídico, por ejemplo un peptidomimético, y un ácido nucleico. Un agente hepático terapéutico de ácido nucleico de la invención puede ser un ARN antisentido, un constructo de ARNi (por ejemplo ARNsi) o un ribozoma. Un agente hepático terapéutico de ácido nucleico también puede ser un constructo obtenido por terapia genética, por ejemplo un constructo de expresión que suministra un gen a expresar en los hepatocitos.

Un agente hepático terapéutico de la invención es efectivo contra enfermedades o condiciones hepáticas tales como enfermedades o condiciones hepáticas humanas. La enfermedad o condición hepática puede proceder de una proliferación celular no deseada, por ejemplo de hepatocitos o de patógenos hepáticos. Los usos y las composiciones de la invención pueden ser adecuadas o efectivas contra cualquier enfermedad o condición del hígado, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer hepático (por ejemplo carcinoma hepatocelular o metástasis hepáticas de otros cánceres tales como de cáncer pancreático), hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, hepatitis G, hepatitis autoinmune, cirrosis, síndrome de Allagile, enfermedad hepática alcohólica, deficiencia de alfa-1-antitripsina, síndrome de Budd-Chiari, atresia biliar, enfermedad de Byler, enfermedad de Caroli, síndrome de Crigler-Najjar, síndrome de Dubin-Johnson, hígado graso, galactosemia, síndrome de Gilbert, Enfermedad de almacenamiento de glucógeno I, hemangioma, hemocromatosis, ictericia, trasplante hepático, porfiria cutánea tarda, cirrosis biliar primaria, protoporfiria eritrohepática, Síndrome de Rotor, colangitis esclerosante y enfermedad de Wilson. Así, una composición farmacéutica de la invención puede ser eficaz contra uno o más enfermedades o condiciones del hígados tales como las aquí descritas.

Un agente hepático terapéutico de la invención puede dirigirse a un gen específico de hepatocito, por ejemplo regulando (inhibiendo o promoviendo) la expresión de dicho gen específico de hepatocito. Generalmente un gen específico de hepatocito incluye a cualquier gen con un nivel de expresión más alto en los hepatocitos que en otras células (por ejemplo células de Kupffer) o tejidos.

Un agente hepático terapéutico puede dirigirse a un gen que está mal regulado en los hepatocitos de un paciente con una enfermedad o condición hepática. El gen puede ser un gen específico de hepatocito. Alternativamente, el gen no es específico de hepatocito, por ejemplo es un gen con un nivel de expresión similar o inferior en los hepatocitos en comparación con otras células o tejidos, y la expresión y/o la actividad de este gen está alterada en los hepatocitos de un paciente que padece una enfermedad o afección hepática en comparación con los hepatocitos de un hígado normal. Por ejemplo, la subunidad II de la ribonucleótido-reductasa (R2) está desregulada en el carcinoma hepatocelular, es decir, la R2 se expresa en células de carcinoma hepatocelular que avanzan en el ciclo celular, pero no se expresa en hepatocitos normales, que generalmente son quiescentes. Un agente terapéutico hepático dirigido a R2 puede ser un agente de ácido nucleico que reduce específicamente o inhibe la expresión de R2, pudiendo consistir dicho agente de ácido nucleico en una molécula antisentido, un constructo de ARNi (por ejemplo un constructo de ARNsi) o en una ribozima.

Un agente terapéutico hepático también puede estar dirigido a una molécula o región genómica específica del hígado, tal como un elemento regulador de la transcripción (TRE) específico del cáncer de hígado, preferentemente una secuencia reguladora de CRG-L2, tal como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente US 20050124068. Un agente terapéutico hepático también puede estar dirigido a un ácido nucleico (un gen o una región genómica) asociado a una o más enfermedades o afecciones hepáticas, tal como los ácidos nucleicos descritos en la Publicación de Solicitud de Patente US 20040241657.

Un agente terapéutico hepático puede inhibir o promover el crecimiento del hígado, por ejemplo inhibiendo o promoviendo la proliferación de hepatocitos. Estos agentes pueden ser útiles para la protección hepática. En la Publicación de Solicitud de Patente US 20040170613 se describen ejemplos de los mismos.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para tratar a un paciente que padece una enfermedad o afección hepática. Dicho uso puede comprender la administración sistémica al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la invención. La administración sistémica se puede lograr a través de diversas vías de suministro, por ejemplo inyección i.v. o i.p., suministro transdérmico, suministro pulmonar o ingestión oral.

Los usos, métodos y composiciones de la invención pueden ser adecuados o eficaces contra cualquier enfermedad o afección del hígado, incluyendo, de forma no exclusiva, cáncer de hígado (por ejemplo carcinoma hepatocelular o metástasis hepática de otros cánceres, por ejemplo cáncer de páncreas), hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, hepatitis E, hepatitis G, hepatitis autoinmune, cirrosis, síndrome de Alagille, enfermedad hepática alcohólica, deficiencia alfa-1-antitripsina, síndrome de Budd-Chiari, atresia biliar, enfermedad de Byler, enfermedad de Caroli, síndrome de Crigler-Najjar, síndrome de Dubin-Johnson, esteatosis hepática, galactosemia, síndrome de Gilbert, enfermedad por almacenamiento de glucógeno I, hemangioma, hemocromatosis, ictericia por enfermedad hepática, trasplante de hígado, porfiria cutánea tarda, cirrosis biliar primaria, protoporfiria eritrohepática, síndrome de Rotor, colangitis esclerosante y enfermedad de Wilson.

Los usos, métodos y composiciones de la invención son adecuados para suministrar agentes terapéuticos hepáticos, incluyendo los medicamentos actualmente disponibles y en desarrollo (por ejemplo en ensayos clínicos). La invención tiene en cuenta una gran variedad de agentes terapéuticos hepáticos, incluyendo, de forma no exclusiva, agentes de moléculas pequeñas, péptidos o análogos de péptidos (incluyendo péptidos miméticos), agentes de ácido nucleico (por

ejemplo constructos de ARNi, incluyendo constructos de ARNs, moléculas antisentido, ácidos nucleicos enzimáticos o constructos de terapia génica) o vacunas.

5 El síndrome de Alagille, o AGS, es una de las principales formas de la enfermedad hepática crónica en la infancia, con morbilidad severa y una mortalidad del 10 al 20%. Existen informes que indican que la AGS está causada por una mutación del gen Jagged-1 (JAG1). Véase, por ejemplo, Alagille y col., J. Pediat. 86: 63-71, 1975; Anad y col., J. Med. Genet. 27: 729-737, 1990; Kamath y col., J. Med. Genet. 40: 891-895, 2003. Así, el agente terapéutico hepático puede ser un agente terapéutico contra el AGS (o una medicación eficaz contra el AGS), pudiendo incluir el agente terapéutico contra la AGS un constructo de terapia génica dirigida al gen JAG1 mutado.

10 El abuso del alcohol es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. El alcohol afecta a muchos sistemas orgánicos del cuerpo, pero quizá los órganos más afectados sean el sistema nervioso central y el hígado. Casi todo el alcohol ingerido es metabolizado en el hígado y un abuso de alcohol puede conducir a una enfermedad hepática aguda y crónica. La cirrosis hepática resultante del abuso de alcohol es una de las diez causas de muerte principales en Estados Unidos. El abuso del alcohol conduce generalmente a tres enfermedades hepáticas patológicamente distintas. En la práctica clínica, cualquiera de estas tres afecciones o todas ellas se pueden producir juntas, al mismo tiempo, en el mismo paciente. Estas tres condiciones son: (1) Hígado graso (esteatosis): el abuso de alcohol puede conducir a una acumulación de grasa en los hepatocitos, el tipo de célula predominante en el hígado. También se puede observar una situación similar en algunas personas obesas que no abusan del alcohol. El hígado graso es reversible si el paciente deja de beber. No obstante, el hígado graso puede producir esteatohepatitis. La esteatohepatitis consiste en un hígado graso con inflamación concomitante y esta afección puede provocar cicatrices en el hígado y cirrosis. (2) Hepatitis: el alcohol puede producir hepatitis aguda y crónica. El paciente que se presenta con hepatitis alcohólica es normalmente un bebedor crónico con un episodio reciente de consumo excepcionalmente abundante. También son posibles otras presentaciones. La hepatitis alcohólica puede ser desde una hepatitis moderada, siendo unos análisis de laboratorio anormales la única indicación de la enfermedad, hasta una disfunción hepática grave con complicaciones tales como ictericia (piel amarilla causada por la retención de bilirrubina), encefalopatía hepática (disfunción neurológica provocada por fallo hepático), ascitis (acumulación de líquido en la cavidad abdominal), varices esofágicas sangrantes (venas varicosas en el esófago), coagulación sanguínea anormal y coma. Histológicamente, la hepatitis alcohólica tiene un aspecto característico con balonización de hepatocitos, inflamación con neutrófilos y a veces cuerpos de Mallory (agregaciones anormales de proteínas en el filamento intermedio celular). (3) Cirrosis: la cirrosis se caracteriza anatómicamente por nódulos extendidos por todo el hígado combinados con fibrosis. La fibrosis y la formación de nódulos provocan una deformación de la arquitectura normal del hígado que interfiere en la circulación sanguínea a través del hígado. La cirrosis también puede conducir a una incapacidad del hígado para realizar sus funciones bioquímicas. En Estados Unidos, el abuso de alcohol es la causa principal de cirrosis hepática. Anatómicamente, la cirrosis alcohólica es casi siempre micronodular (es decir, los nódulos hepáticos regenerados son pequeños).

35 La cirrosis también puede estar causada por cualquier enfermedad hepática crónica, como hepatitis crónica B, C y D, hepatitis autoinmune crónica, enfermedades metabólicas hereditarias (por ejemplo hemocromatosis, enfermedad de Wilson), enfermedades crónicas de los conductos biliares, insuficiencia cardíaca congestiva crónica, infecciones parasitarias (por ejemplo esquistosomiasis), esteatohepatitis no alcohólica (inflamación hepática que puede estar causada por hígado graso) o exposición durante tiempo prolongado a toxinas o fármacos.

40 El tratamiento de la cirrosis depende generalmente de la etiología subyacente. La interrupción de la ingesta de alcohol detiene la progresión de la cirrosis alcohólica y, por ello, es importante realizar un diagnóstico temprano en caso de un alcohólico crónico. Similarmente, el abandono de una droga hepatotóxica o la eliminación de una toxina medioambiental también detendrán la progresión. El tratamiento de enfermedades metabólicas, por ejemplo el tratamiento de la sobrecarga de hierro en el caso de la hemocromatosis o de la sobrecarga de cobre en el caso de la enfermedad de Wilson, también son terapias eficaces. Las hepatitis virales crónicas B y C pueden responder al tratamiento con interferón y la hepatitis autoinmune puede mejorar con prednisona y azatioprina (Imuran). Los fármacos tales como el ursodiol (Actigall) pueden retrasar la progresión de la cirrosis biliar primaria y posiblemente de la colangitis esclerosante. El trasplante de hígado es sumamente eficaz para el tratamiento de la cirrosis terminal.

50 Las colestasis, o la colestasis intrahepática familiar progresiva 1 o PFIC1 y la colestasis intrahepática recurrente benigna (BRIC), están causadas por una mutación en el gen ATP8B1. Una segunda forma de la colestasis intrahepática familiar progresiva (PFIC2) está causada por una mutación en un transportador (BSEP) de *cassette* de unión de ATP (ABC) específico del hígado. La PFIC3 está causada por una mutación en la P-glicoproteína de resistencia a multifármacos de clase III (MDR3). La PFIC4 está causada por una mutación en la 3-beta-hidroxi-delta-5-C27-esteroide-oxidoreductasa (HSD3B7). Véase, por ejemplo, Ghent y col., J. Pediat. 93: 127-132, 1978; Trauner y col., New Eng. J. Med. 339: 1217-1227, 1998; Whittington y col., J. Pediat. Gastroent. Nutr. 18: 134-141, 1994.

El cáncer de hígado puede consistir en cualquiera de los siguientes ejemplos no limitativos: cáncer metastásico de hígado, colangiocarcinoma o carcinoma hepatocelular.

60 Los cánceres metastásicos son tumores que se propagan desde el órgano de origen. Debido a su riego sanguíneo, el hígado es un lugar habitual de propagación de algunos cánceres. Algunos de los cánceres más comunes que se propagan al hígado son aquellos originados en el colon, páncreas, pulmón y mama. Los linfomas y las leucemias

también pueden invadir el hígado. El colangiocarcinoma es un cáncer que surge de las células de los conductos biliares dentro del hígado. El colangiocarcinoma también se puede producir en los conductos biliares que se encuentran fuera del hígado propiamente dicho.

5 El carcinoma hepatocelular es un cáncer que surge de los hepatocitos, el principal tipo celular del hígado. El carcinoma hepatocelular es una de las dos principales causas de muerte por cáncer en todo el mundo. Está especialmente extendido en partes de Asia y África. Aproximadamente un 80% de las personas que padecen carcinomas hepatocelulares tienen cirrosis. La infección crónica por el virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis C también aumenta el riesgo de desarrollar un carcinoma hepatocelular. Las aflatoxinas, que son producidas por un moho que contamina los frutos secos (habitualmente cacahuetes), cereales y legumbres, también son un factor de riesgo esencial
10 en la aparición del carcinoma hepatocelular. Aunque en Estados Unidos prácticamente no existen, las aflatoxinas son comunes en otras partes del mundo y con frecuencia contaminan los alimentos.

15 El síndrome de Dubin-Johnson está causado por mutaciones en el transportador de aniones orgánicos multiespecífico canalicular (parte apical de un hepatocito) (CMOAT), también denominada proteína asociada a resistencia a multifármacos 2 (MRP2), y desempeña un papel importante en el transporte de aniones orgánicos biliares (Wada y col., Hum. Molec. Genet. 7: 203-207, 1998).

20 Las hiperbilirrubinemias hereditarias (Wolkoff y col., en *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill (pub.) (5ª ed.) 1983. p. 1385-1420.) incluyen (1) aquellas que conducen a una hiperbilirrubinemia predominante no conjugada: síndrome de Gilbert o Arias, síndrome de Crigle-Najjar de tipo I y síndrome de Crigle-Najjar de tipo II; y (2) las que conducen a una hiperbilirrubinemia predominante conjugada: síndrome de Dubin-Johnson, síndrome de Rotor y diversas formas de colestasis intrahepática. Algunos estudios detallados demuestran que pacientes con el síndrome de Gilbert tienen una actividad reducida de la bilirrubina-glucuronosiltransferasa (Bosma y col., New Eng. J. Med. 333: 1171-1175, 1995). Se ha demostrado que el síndrome de Gilbert está causado por una mutación en el gen de la UDP-glucuronosiltransferasa (UGT1A1). Otras mutaciones en el mismo gen provocan el síndrome de Crigle-Najjar de tipo I y el síndrome de Crigle-Najjar de tipo II. Por consiguiente, los agentes terapéuticos hepáticos dirigidos a UGT1A1 pueden ser eficaces contra estas hiperbilirrubinemias hereditarias.
25

La afección de hígado graso también se denomina esteatosis, el hígado graso con inflamación hepática se denomina esteatohepatitis. La esteatosis y la esteatohepatitis pueden estar causadas por el alcohol u otras drogas y a veces también se pueden producir en pacientes con diabetes mellitus. La esteatohepatitis no causada por alcohol se suele denominar esteatohepatitis no alcohólica o "NASH".

30 La galactosemia clásica está causada por una mutación en el gen de la galactosa-1-fosfato-uridiltransferasa (GALT).

La enfermedad por almacenamiento de glucógeno está causada por un defecto en la glucosa-6-fosfatasa. Este trastorno afecta al hígado y a los riñones y uno de sus principales problemas es la hipoglucemia. Este trastorno también está relacionado con el adenoma hepatocelular (Bianchi, Eur J Pediatr. 1993;152 Suppl 1:S63-70).

35 Existen dos tipos de hemangioma hepático: cavernoso y hemangioendotelioma. En general, los hemangioendoteliomas sólo aparecen en niños. El hemangioma cavernoso es el tumor hepático benigno más común en los adultos, observándose en individuos de todas las edades y en todo el mundo.

40 La hemocromatosis clásica (HFE), un trastorno recesivo autosómico, está causada en la mayor parte de los casos por una mutación en un gen denominado HFE del cromosoma 6p21.3. También se ha comprobado que puede estar causada por una mutación del gen codificador de la hemojuvelina (HJV), que se mapea en 1q21. La hemocromatosis juvenil o hemocromatosis de tipo 2 (HFE2) también es un trastorno recesivo autosómico. La forma llamada HFE2A está causada por una mutación en el gen HJV. Una segunda forma, la HFE2B, está causada por una mutación en el gen codificador del péptido antimicrobiano hepcidina (HAMP), que se mapea en 19q13. La hemocromatosis de tipo 3 (HFE3), un trastorno recesivo autosómico, está causada por una mutación en el gen codificador del receptor de transferrina 2 (TFR2), que se mapea en 7q22. La hemocromatosis de tipo 4 (HFE4), un trastorno dominante autosómico,
45 está causada por una mutación en el gen SLC40A1, que codifica la ferroportina y se mapea en 2q32. Las características clínicas de la hemocromatosis incluyen cirrosis hepática, diabetes, pigmentación hipermelanótica de la piel y fallo cardíaco. El carcinoma hepatocelular primario (HCC), que se complica en la cirrosis, es responsable de aproximadamente una tercera parte de las muertes de los homocigotos afectados. Dado que la hemocromatosis es un trastorno relativamente fácil de tratar si se diagnostica, se trata de una forma de cáncer evitable.

50 El concepto "hepatitis A" (HA) o hepatitis viral de tipo A ha sustituido a todas las denominaciones anteriores: hepatitis infecciosa, hepatitis epidémica, ictericia epidémica, ictericia catarral, icterus infeccioso, enfermedad de Botkins y hepatitis MS-1. La hepatitis A se diagnostica por la detección de anti-VHA de clase IgM en suero recogido durante la fase aguda o de convalecencia temprana de la enfermedad. El virus de la hepatitis A (VHA) se clasifica en el grupo de los enterovirus de la familia Picornaviridae. El VHA tiene una sola molécula de ARN rodeada por una pequeña cápside proteica (27 nm de diámetro) y una gran densidad en CsCl, de 1,33 g/ml.
55

En general, la hepatitis B está causada por el virus de la hepatitis B (VHB), un virus de ADN en su mayor parte bicatenario de la familia Hepadnaviridae. El VHB provoca la hepatitis en humanos y virus relacionados de esta familia provocan la hepatitis en patos, ardillas terrestres y marmotas. El genoma del VHB tiene cuatro genes: pol, env, pre-core

y X, que codifican la ADN polimerasa viral, la proteína de envoltura, la proteína pre-core (que se procesa en la cápside viral) y la proteína X, respectivamente. La función de la proteína X no está clara, pero puede intervenir en la activación de genes de las células huésped y el desarrollo de cáncer.

5 Los interferones alfa fueron los primeros fármacos aprobados en Estados Unidos para el tratamiento de la hepatitis B crónica. El tratamiento con interferón es recomendable para individuos que tienen "enfermedad replicativa" (HBeAg positiva). Aproximadamente el 40% de estos individuos perderán el HBeAg en suero después de 16 semanas de tratamiento con interferón alfa. La pérdida de HBeAg está en correlación con un mejor pronóstico. Algunos de los pacientes tratados (menos de un 10%) se pueden incluso curar de acuerdo con la evaluación de la pérdida de HBeAg. Otras opciones de tratamiento para la hepatitis B crónica incluyen análogos de nucleótidos. En diciembre de 1998, la United States Food and Drug Administration (FDA) aprobó la lamivudina, también conocida como 3TC y que además es eficaz contra el VIH, para el tratamiento de la hepatitis B crónica (pacientes que son HBeAg positivos). La lamivudina se toma por vía oral a una dosis de 100 mg/día en el caso de la hepatitis B crónica. En estudios comparativos, la lamivudina ha presentado la misma eficacia que el interferón alfa para inducir una pérdida de HBeAg en suero. También se ha comprobado que mejora los resultados de la biopsia hepática en pacientes tratados durante un año. En 10
15
septiembre de 2002, la FDA aprobó el adefovir dipivoxil, otro análogo de nucleósido que también es eficaz contra el VIH, para el tratamiento de la hepatitis B. La dosis para la hepatitis B crónica es de 10 mg/día. Actualmente se están estudiando otros análogos de nucleósido en ensayos clínicos. También se está investigando la combinación de interferón alfa y un análogo de nucleósido, dos análogos de nucleósido juntos (como lamivudina y adefovir). Además se han estudiado otros análogos de nucleósido tales como famciclovir, lobucavir y adfovir para una terapia combinada en el 20
tratamiento de la hepatitis B crónica (Yao y Gishi, Current Gastroenterology Reports 1999, 1:20-26).

Aproximadamente 170.000.000 de personas en todo el mundo, y 4.000.000 en Estados Unidos, están infectados con el virus de la hepatitis C (VHC). El virus se transmite principalmente a través de la sangre y de productos sanguíneos. Aproximadamente el 85% de los individuos con infección aguda por VHC quedan infectados de forma crónica. Por consiguiente, el VHC es una de las principales causas de hepatitis crónica (de más de seis meses de duración). Una vez que el paciente está infectado de forma crónica, el virus prácticamente nunca se elimina sin tratamiento. En casos poco frecuentes, la infección por el VHC provoca una enfermedad clínicamente aguda e incluso fallo hepático. Sin embargo, la mayoría de los casos de infección aguda son clínicamente indetectables. El VHC es un virus de ARN monocatenario positivo de la familia Flaviridae. El genoma tiene aproximadamente 10.000 nucleótidos y codifica una poliproteína simple de aproximadamente 3.000 aminoácidos. La poliproteína es procesada por la célula huésped y las proteasas virales en tres proteínas estructurales principales y varias proteínas no estructurales necesarias para la replicación viral. Se han identificado diversos genotipos diferentes del VHC con secuencias genómicas ligeramente diferentes, que están en correlación con diferencias de respuesta al tratamiento con interferón alfa. Todos los protocolos de tratamiento actuales para la hepatitis C se basan en el uso de diversas preparaciones de interferón alfa, que se administran por inyección intramuscular o subcutánea. El interferón alfa-2a (Roferon-A; Hoffman-La Roche), el interferón alfa-2b (Intron-A; Schering-Plough) y el interferón alfacon-1 (Infergen; Intermune) están aprobados en Estados Unidos para el tratamiento de adultos con hepatitis C crónica como agentes monoterapia. El peginterferón alfa, llamado a veces interferón pegilado, también se ha empleado en el tratamiento de la hepatitis C crónica. Existen dos preparaciones de peginterferón alfa que han sido estudiadas en pacientes con hepatitis C: peginterferón alfa-2b (Peg-Intron; Schering-Plough) y peginterferón alfa-2a (Pegasys; Hoffmann-La Roche). Con el peginterferón alfa-2a sólo aproximadamente el 30% al 40% de los pacientes consigue una respuesta prolongada al tratamiento durante 24 a 48 semanas (Zeuzem y col., New England Journal of Medicine. 2000; 343:1666-1172; Heathcote y col., New England Journal of Medicine. 2000; 343: 673-1680). La adición de ribavirina al interferón alfa es superior al interferón alfa solo para el tratamiento de la hepatitis C crónica. La ribavirina es un nucleósido sintético activo contra un amplio espectro de virus. La FDA también ha aprobado la combinación de interferón alfa-2b y ribavirina para el tratamiento de individuos con hepatitis C crónica que han sufrido una recaída después de una terapia previa con interferón alfa. Además, la combinación de interferón alfa-2b y ribavirina es más eficaz que el interferón alfa-2b solo para lograr una respuesta prolongada en el tratamiento de pacientes con hepatitis C crónica no tratados previamente con interferón, y esto condujo a la FDA a aprobar dicha combinación para esta indicación en diciembre de 1998. La FDA también ha aprobado la combinación de peginterferón alfa y ribavirina para el tratamiento de la hepatitis C crónica. 45

50 También se están desarrollando ensayos clínicos de peginterferón-alfa con un compuesto denominado VX-497 (Vertex Pharmaceuticals). El VX-497 tiene algunas características similares a la ribavirina e inhibe una enzima celular conocida como inosina-monofosfato-deshidrogenasa que puede ser responsable de algunos de sus efectos. Una nueva generación de fármacos o agentes terapéuticos para tratar la hepatitis C incluyen aquellos diseñados específicamente para inhibir las funciones del virus de la hepatitis C. Una diana para estos fármacos es el genoma de ARN del virus de la hepatitis C. Se ha diseñado una ribozima (Hepatazyna, Ribozyme Pharmaceuticals) para segmentar el genoma de ARN del virus de la hepatitis C en una región que el virus necesita para sobrevivir. Su eficacia para cortar el ARN del virus de la hepatitis C ha sido establecida en laboratorio y actualmente se están realizando los primeros ensayos clínicos con el fármaco. El ISIS-14803 (Isis Pharmaceuticals) es un inhibidor antisentido complementario a una secuencia conservada del ARN del virus de la hepatitis C. Esta molécula se une al ARN viral e inhibe la expresión de las proteínas necesarias para la replicación. El ISIS-14803 está actualmente en la fase de los primeros ensayos clínicos. También se ha demostrado que una molécula pequeña conocida como VP-50406 (ViroPharma) inhibe el ARN del virus de la hepatitis C en el laboratorio, encontrándose esta molécula en las primeras fases del desarrollo clínico. También se están 60

estudiando en laboratorio inhibidores de una estructura única del ARN del virus de la hepatitis C necesario para la síntesis de proteínas, conocida como sitio interno de entrada al ribosoma o IRES.

5 El virus de la hepatitis D (también denominado virus delta) es un pequeño virus de ARN circular. El virus de la hepatitis D es deficiente para la replicación y, por ello, no se puede propagar en ausencia de otros virus. En humanos, la infección por el virus de la hepatitis D sólo se produce en presencia de una infección por hepatitis B. Para tratar a los pacientes con hepatitis B crónica e infección por hepatitis D se utiliza interferón alfa.

10 El virus de la hepatitis E (VHE) tiene un genoma de ARN poliadenilado monocatenario de aproximadamente 8 kb. Debido a sus propiedades fisicoquímicas se supone que es un virus similar al calicivirus. La enfermedad causada por el VHE se denomina hepatitis E, o hepatitis no A, no B transmitida por vía enteral (ET-NANBH). Otros nombres incluyen hepatitis no A, no B fecal-oral y hepatitis no A, no B similar a A.

El virus de la hepatitis G (VHG) es un flavivirus relacionado con el VHC.

15 Actualmente existen varias medicaciones utilizadas para el tratamiento de la ictericia por enfermedad hepática. Estas medicaciones incluyen colestiramina, el antibiótico rifampicina, los antagonistas de opiáceos naloxona y naltrexona, y el antagonista de receptor de la serotonina de tipo 3. Ensayo clínico sobre el uso del fármaco gabapentina para el tratamiento del prurito por enfermedad hepática (Protocolo IRB #9618).

20 La porfiria cutánea tarda es un trastorno dominante autosómico caracterizado por una dermatitis fotosensible y asociado a la excreción de grandes cantidades de uroporfirina en orina. En casos de porfiria cutánea tarda familiares (Kushner y col., 1976 Clin. Invest. 58:1089-1097; Lehr y Doss, 1981, Dtsch. Med. Wschr. 106: 241-245) y esporádicos (Elder y col., 1978, New Eng. J. Med. 299: 274-278; Felsher y col., 1978, New Eng. J. Med. 299: 1095-1098) se ha informado de una reducción de la actividad de la uroporfirinógeno Descarboxilasa en el hígado y los eritrocitos.

25 La cirrosis biliar primaria (PBC) es una enfermedad caracterizada por la destrucción inflamatoria de los conductos biliares pequeños dentro del hígado. La PBC conduce finalmente a cirrosis hepática. La causa de la PBC es desconocida, pero, debido a la presencia de autoanticuerpos, en general se considera que se trata de una enfermedad autoinmune. Tampoco se han excluido por completo otras etiologías, por ejemplo agentes infecciosos. Se recomienda que los pacientes de PBC tomen vitaminas y calcio para ayudar a prevenir la osteoporosis (pérdida ósea), una complicación común de esta enfermedad. La colchicina puede intervenir en la inhibición de la fibrosis hepática y mejora los valores de laboratorio, pero no los signos o síntomas. Se han estudiado diversos agentes inmunosupresores en pacientes con PBC. Los corticosteroides probablemente no son eficaces y pueden agravar la osteoporosis comúnmente presente en pacientes con PBC. La azatioprina (Imuran), el metotrexato y la ciclosporina A han sido examinados en varios estudios. El ursodiol (Actigall o Urso), un ácido biliar, ha demostrado mejorar los parámetros de laboratorio y clínicos en pacientes con PBC y los resultados de los estudios sugieren que puede retrasar la progresión de la enfermedad. El trasplante de hígado ortotópico tiene una elevada tasa de éxito en pacientes con enfermedad hepática terminal resultante de PBC.

35 La protoporfiria hepática, o EPP, se hereda como un trastorno dominante autosómico con penetración incompleta. Utilizando análisis de segregación de haplotipos, Gouya y col. (2002) identificaron un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) intrónico, IVS3-48T-C (177000.0015), que modula el uso de un sitio de corte y empalme del aceptor aberrante constitutivo localizado a 63 pb en la dirección 5' del normal. El ARNm con corte y empalme aberrante es degradado por un mecanismo de descomposición mediada sin sentido (NMD), produciendo una reducción del nivel de estado estacionario del ARNm y la deficiencia adicional de la enzima FECH necesaria para la expresión fenotípica de la EPP.

40 La colangitis esclerosante primaria (PSC) es una enfermedad hepática crónica caracterizada por la inflamación, destrucción y fibrosis de los conductos biliares intrahepáticos y extrahepáticos que conduce a cirrosis hepática. Con frecuencia, la PSC se complica con episodios recurrentes de colangitis bacteriana (infección de los conductos biliares por bacterias). Los pacientes con PSC también tienen un riesgo elevado de colangiocarcinoma (cáncer de conductos biliares). El trasplante de hígado ortotópico es muy eficaz en el tratamiento de pacientes con enfermedad hepática avanzada causada por la PSC.

45 La enfermedad de Wilson es un trastorno recesivo autosómico caracterizado por una acumulación espectacular de cobre hepático, con las subsiguientes anomalías hepáticas y neurológicas. En la enfermedad de Wilson, los ganglios basales y el hígado experimentan cambios que se expresan como manifestaciones neurológicas y signos de cirrosis, respectivamente. En este mecanismo interviene de alguna manera un trastorno del metabolismo del cobre (Bearn, en: Stanbury y col.: The Metabolic Basis of Inherited Disease. New York: McGraw-Hill (pub.) (3ª ed.) 1972, p. 1033-1050).

55 El trasplante de hígado puede ser recomendable en caso de determinadas enfermedades hepáticas cuando han fallado otros tratamientos. Ejemplos de estas enfermedades o afecciones hepáticas incluyen: hepatitis B, hepatitis C, defectos del ciclo de la urea, hipercolesterolemia familiar, cirrosis inducida por alcohol, enfermedad por almacenamiento de glucógeno, hepatitis autoinmune, hiperoxaluria primaria de tipo I, cirrosis criptogénica, síndrome de Crigle-Najjar de tipo I, fibrosis hepática congénica, enfermedad de Neimann-Pick, cirrosis biliar primaria, amiloidosis familiar, atresia biliar, carcinoma hepatocelular, colangitis esclerosante primaria, hepatoblastoma, síndrome de Alagille, hemangiendoteloma, colestasis familiar, fallo hepático neuroendocrino no carcinóide inducido por fármacos, tumores

hepáticos, fallo hepático agudo/ fulminante, síndrome de Budd-Chiari, deficiencia de alfa-1-antitripsina, enfermedad de Wilson, hemocromatosis, tirosinemia, protoporfiria o fibrosis quística.

Ejemplos

5 Una vez descrita la invención de forma general, ésta se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen únicamente para ilustrar ciertos aspectos y realizaciones de la presente exposición y no están concebidos para limitar la misma.

Ejemplo 1: ARNsi. Diseño y Ensayos

10 El ARN interferente, o ARNi, es un mecanismo de silenciamiento génico descrito originalmente en plantas (donde era conocido como silenciamiento génico post-transcripcional o PTGS), *C. elegans* y *Drosophila* (revisado en Bernstein y col., 2001; Carmell y col., 2002). En el modelo actual, la vía de ARNi se activa mediante un “desencadenante” de ARN bicatenario (ARNds), que después es procesado en ARNds cortos de 21-23 nucleótidos denominados ARN interferentes pequeños, por la enzima celular Dicer. Los ARNsi se incorporan en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), donde la cadena antisentido del ARNsi sirve como una guía para dirigirse al ARNm homólogo para la segmentación endonucleolítica dentro del dúplex ARNsi/diana, aproximadamente a 10 bases del extremo 5' de la guía de ARNsi. En células de mamífero, los ARNds más largos de 30 nucleótidos activan la vía del interferón no específica más que el ARNi. Sin embargo, Tuschl y col. han demostrado (Elbashir y col., 2001 a; Harborth y col., 2001; Caplen y col., 2002) que ARNsi más cortos introducidos en células de mamíferos evitan el paso Dicer y activan directamente la degradación de ARNm homólogo sin iniciar la respuesta al interferón. Posteriormente, una serie de laboratorios han demostrado la viabilidad de la expresión de ARNsi y los ARN en horquilla cortos correspondientes (ARNsh) *in vivo* contra dianas virales y celulares humanas. Los avances en el ARNi aumentan rápidamente y ya se ha hecho un progreso considerable para aplicaciones terapéuticas (Zamore, 2001; Kitabwalla y Ruprecht, 2002; Martinez y col., 2002; Couzin, 2003; Scherr y col., 2003; Wilson y col., 2003; Hannon y Rossi, 2004).

25 Los ARNsi sintéticos son el método a elegir para aplicaciones exógenas a corto plazo. Actualmente, los ARNsi modificados median en los efectos del ARNi, alcanzando valores máximos típicamente 2-3 días después de la transfección. El diseño más común para los ARNsi sintéticos imita los ARNsi endógenos producidos por segmentación Dicer de ARNds activador (Elbashir y col., 2001a), donde las cadenas sentido y antisentido tienen 21-23 nucleótidos de longitud. La porción reasociada del dúplex es completamente complementaria, excepto en dos partes protuberantes de nucleótidos en los dos extremos 3'. En los ARNsi sintéticos, las partes protuberantes dinucleotídicas en el extremo 3' se pueden derivar de la secuencia diana, como en sus equivalentes naturales. Aunque los ARNsi construidos a partir de 21-23meros son suficientes para la mayoría de los objetivos, se pueden utilizar oligómeros de hasta 29 nucleótidos sin iniciar la respuesta al interferón. Nosotros hemos observado que los ARNsi producidos a partir de ARN bicatenarios más largos en células mediante la acción de Dicer pueden ser hasta 100 veces más potentes que un 21mero suministrado de forma exógena (Kim y col., 2005). Un texto complementario de Siolas y col. (2005) ha alcanzado una conclusión similar, aunque estos investigadores han utilizado horquillas sintéticas como sustratos Dicer. Los estudios aquí propuestos sacarán provecho de estos importantes descubrimientos para generar ARNsi potentes para su utilización en estudios con animales. Se discutirán nuevas reglas de diseño que permitan predecir con exactitud el ARNsi que se generará a partir de los ARN dúplex en sustrato Dicer tal como se describe a continuación.

40 Los desapareamientos entre la cadena antisentido del ARNsi y la diana tienden a reducir la actividad en grado variable, dependiendo de su cantidad y localización. Aunque todavía no se han logrado entender por completo las reglas que rigen en la relación entre el desapareamiento ARNsi/diana y la actividad de ARNi, sí se pueden hacer algunas generalizaciones que probablemente sean aplicables tanto a los ARNsi como a los ARNsh simples. Con frecuencia, pero no siempre, las mutaciones cerca del sitio de segmentación endonucleolítica reducen el efecto del ARNi. Además, las mutaciones en la primera mitad de la cadena antisentido (extremo 5') son muy perjudiciales (Randall y Rice, 2001; Holen y col., 2002; Amarzguioui y col., 2003). Dado que la segmentación endonucleolítica se ‘mide’ desde el extremo 5' de la cadena de ARNsi antisentido, es posible que mutaciones en el extremo 5' de la cadena de guía desestabilicen el dúplex antisentido/ARNm diana en el complejo RISC, inhibiendo la segmentación. Tomados en conjunto, estos resultados dan a entender que, cuando se diseñan constructos de ARNi dirigidos a una isoforma específica, puede ser aconsejable elegir un sitio diana en la isoforma diana de tal modo que los desapareamientos entre su ARNsi correspondiente y la isoforma no diana tengan lugar en el extremo 5' del dúplex. Si esto no es posible, por ejemplo cuando la diana no es accesible para la segmentación (situación examinada en Scherer y Rossi, 2003b), es importante realizar pruebas de reactividad cruzada.

55 Aunque los ARNsi construidos a partir de 21-23meros son suficientes para la mayoría de los objetivos, se pueden utilizar oligómeros con hasta 29 nucleótidos sin iniciar los efectos del interferón. Nosotros hemos observado que los ARNsi producidos a partir de ARN bicatenarios más largos en células mediante la acción de Dicer pueden ser hasta 100 veces más potentes que un 21mero suministrado de forma exógena (Kim y col., 2005). Un texto complementario de Siolas y col. (2005) ha llegado a una conclusión similar, aunque estos investigadores han utilizado horquillas sintéticas como sustratos Dicer. Los estudios aquí propuestos sacarán provecho de estos importantes descubrimientos para generar ARNsi potentes para su utilización en estudios con animales. Se discutirán nuevas reglas de diseño que permitan predecir con exactitud el ARNsi que se generará a partir de los ARN dúplex en el sustrato Dicer.

Experimentos realizados con lisados de embrión de *Drosophila* han indicado la necesidad de 5'-OH libre o 5'-fosfato en las cadenas de ARNsi sintéticas (Elbashir y col.; 2001b; Nykanen y col., 2001). Se han observado resultados similares en extractos de HeLa (Schwarz y col., 2002) o células intactas (Chiu y Rana, 2002). La modificación 5'-amino asimétrica de una u otra cadena de ARNsi ha demostrado que la modificación 5'-amino de la cadena antisentido suprime el ARNi, mientras que la misma modificación únicamente en la cadena sentido no inhibe el efecto del ARNi. Además, los ARNsi sintéticos no fosforilados transfectados en células y después reaislados no pueden ser quinasados *in vitro*, a no ser que se traten previamente con una fosfatasa (Chiu y Rana, 2002). Tomado en conjunto, esto sugiere que existe una fuerte necesidad *in vivo* de un 5'-fosfato en la cadena antisentido. Esto es coherente con la hipótesis de que las modificaciones de este nucleótido interfieren con la capacidad de la cadena antisentido para servir como guía en la segmentación endonucleolítica del complejo RISC activado. Por otro lado, las modificaciones que bloquean el extremo 3' tienen poco efecto en el ARNsi dúplex, en cualquiera de las dos cadenas en la mayoría de los casos (Amarzguioui y col., 2003).

Estudios de modificaciones en el esqueleto de ARNsi dúplex han revelado que hasta seis 2'-O-metilo por cadena de ARNsi distribuidos entre los extremos 5' y 3', o dos modificaciones de 2'-O-alilo en los extremos 3', no influyen negativamente en el ARNi (Amarzguioui y col., 2003). Un aumento de la cantidad de modificaciones más allá de este punto, o una modificación de alilo de los extremos 5', reducen el ARNi (Amarzguioui y col., 2003; Holen y col., 2003). A la inversa, más de dos modificaciones de fosforotioato son citotóxicas, mientras que no promueven un aumento significativo de la potencia (Amarzguioui y col., 2003). La ventaja de las modificaciones en el esqueleto de ARNsi sólo se pueden lograr si los ARNsi se inyectan directamente en animales, ya que las modificaciones en el esqueleto prolongan la vida media de estas moléculas (Layzer y col., 2004; Soutschek y col., 2004). En este contexto aprovecharemos la protección de las nucleasas séricas proporcionada por soportes de nanopartículas de ciclodextrina y, por consiguiente, nuestros ARN no serán modificados en el esqueleto, de modo que se podrán tratar con Dicer eficazmente *in vivo*.

Definición de la Secuencia

El ARNi se puede activar mediante ARNsi sintéticos suministrados a las células utilizando lípidos catiónicos u otros soportes, o mediante la expresión genética de cadenas sentido y antisentido 21meras o ARN en horquilla cortos que son procesados para obtener ARNsi (situación examinada en Scherer y Rossi, 2003b). Un determinante importante para el éxito del silenciamiento mediado por ARNsi es la combinación de la accesibilidad al sitio diana y la selección de la cadena apropiada de ARNsi. Nosotros y otros hemos desarrollado algoritmos para identificar una combinación apropiada de sitio diana y ARNsi dúplex (Heale y col., 2005). Nuestro algoritmo tiene en cuenta predicciones de estructura secundaria del sitio diana y la estabilidad del extremo dúplex del ARNsi. Esta última es importante para la selección de la cadena antisentido en RISC (Khvorova y col., 2003; Schwarz y col., 2003; Tomari y col., 2004). También se ha descubierto que ARNds que son suficientemente largos para ser segmentados por el miembro de la familia de la ARNsa III Dicer pueden ser hasta 100 veces más potentes que los ARNsi 21meros (Kim y col., 2005; Siolas y col., 2005). Por consiguiente, nuestro método preferente para identificar sitios diana y ARNsi consiste en seleccionar motivos de secuencia con nuestro algoritmo (Heale y col., 2005), identificar secuencias diana potenciales y los ARNsi 21meros y analizar varios 21meros en cuanto a su eficacia relativa.

Se ha utilizado un nuevo algoritmo computacional para la determinación de sitios diana óptimos con el fin de identificar tres sitios diana potenciales dentro del gen de la R2 humana (hRRM2) (véase la Figura 4) (Heale y col., Nucl. Acids Res. 33: e30 (2005)). Después se han sintetizado ARNsi dirigidos a estas tres secuencias diana y se han analizado en un screening previo del extracto celular descrito más abajo. La Figura 5 muestra los resultados de los ARNsi dirigidos contra los tres sitios diana en el ensayo de unión al extracto celular.

Para realizar el screening previo de los 21meros, hemos observado que un ensayo de unión de extracto celular ofrece una gran capacidad de predicción de la eficacia intracelular (Kim, Amarzguoi y Rossi, artículo en preparación). En pocas palabras, los 21meros sintéticos se marcan en sus extremos 5' con ³²P y se incuban en extractos citoplásmicos HEK 293 a temperatura ambiente. Los ARNsi se pueden unir a un complejo que contiene el componente de RISC argonauta 2 (Ago2). La eficacia de unión muestra una fuerte correlación con la potencia intracelular (Figuras 6A-6C). Una vez identificados los 21meros más potentes, la secuencia se incorpora en un dúplex de 27 bases que es un sustrato para Dicer (Figuras 6A-6C). Hemos establecido un formato para el tratamiento con Dicer de tal modo que únicamente el 21mero elegido se produce a partir del 27mero (véase más abajo). Por consiguiente, la única limitación para utilizar el 27mero elegido es el suministro. El sustrato preferido para el tratamiento con Dicer *in vivo* tiene las siguientes características generales

5'NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNdNdN3'

3'NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NN5'

Utilizando un tratamiento con Dicer *in vitro* y análisis del espectro de masas de los productos tratados con Dicer se ha determinado que la Dicer reconoce la parte protuberante de 2 bases en 3' y segmenta 21 bases del extremo 5' de la cadena sentido y 21 bases a partir la parte protuberante de 2 bases para generar únicamente un 21mero. Mediante la inclusión de dos desoxirribonucleótidos en el extremo 3' de la cadena sentido (dN), la Dicer no entra desde el lado derecho de este dúplex, con lo que se asegura que únicamente se genera el 21mero de interés. Las Figuras 6A-6C también muestra resultados representativos de un ensayo de unión a extracto en el que una serie de 21meros que se

diferencian en una sola base se incuban con los extractos. La afinidad de unión de los ARNs está en correlación precisa con el silenciamiento de la diana. Repetido este ensayo con más de 20 ARNs diferentes, la correlación se mantiene.

Las secuencias de R2 humana y de ratón se sometieron a nuestro algoritmo (Heale y col., 2005). Los 5 ARNs y dianas principales previstos se analizaron en cuanto a la complementariedad potencial con otras secuencias de ratón, en busca de apareamientos ampliados en el extremo 5' de la cadena antisentido. Las secuencias que no comparten una homología ampliada en 5' con otras dianas se analizarán en el ensayo de unión a extracto, utilizándose los aglutinantes principales. La secuencia 21mera se incorporará en el formato 27/29mero arriba mostrado, derivándose las secuencias ampliadas de los ARNm diana. Los ARNs se titularán en concentraciones de 5 nM a 5 pM en cultivo celular. Los ARNs con el valor IC₅₀ más bajo se utilizan en experimentos *in vivo* posteriores. Dado que la falta de dirección a la diana es un problema potencial, incluso con el screening previo de la secuencia, la activación del interferón alfa y beta se analiza rutinariamente mediante ensayos ELISA y análisis en biochip de ratón (Kim y col., 2005).

Materiales y Métodos

Figura 6A: Ensayos de ARNi. Para los ensayos de cotransfección se sembraron células HEK293 en placas de 24 pocillos con un 60% de confluencia el día antes de la transfección. Cada parte alícuota de ARN se diluyó en 50 µl de Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenían los vectores indicadores y se mezcló con 50 µl de Opti-MEM que contenía 1,5 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). La mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se añadió a células en 500 µl de volumen final de medio. Para normalizar la eficiencia de transfección, cada ensayo incluyó la cotransfección de los ARN diana y/o dúplex con un plásmido indicador de proteína fluorescente roja (RFP). Únicamente se evaluaron los experimentos en los que la eficiencia de transfección variaba menos de un 10% (de acuerdo con la valoración por expresión de RFP). Veinticuatro horas después de la transfección se midieron los niveles de expresión de EGFP. La expresión de EGFP se determinó por espectrometría de fluorescencia.

Figura 6B: Análisis de desplazamiento en gel. Células HEK293 confluentes en una placa de 10 cm se recolectaron y se lavaron con PBS. La pella celular se resuspendió en 0,5 µl de tampón D (HEPES 20 mM, pH 7,9, EDTA 0,2 mM, DTT 0,5 mM, KCl 50 mM, 10% glicerol, PMSF 0,2 mM) y se sometieron a ultrasonidos durante 15 segundos. Después de 5 minutos de centrifugación, se recogió el sobrenadante. Para cada ensayo se incubaron 10 µl de extracto con 10 fmol de ARNi marcado durante 30 minutos. Las muestras se mezclaron con tinte de carga nativo y se separaron en el gel de poliacrilamida al 5% (29:1) durante 2 horas a 200 V en cámara frigorífica. (c) Secuencias utilizadas en los pasos A-E en (b).

30 Ejemplo 2: Reducción de la Expresión de R2 utilizando ARNs

Se diseña y ensaya una serie de ARNs específicos para la secuencia de R2 en cuanto a su capacidad para reducir la expresión de R2 tanto *in vitro* como *in vivo*. Las secuencias correspondientes a los ARNs específicos se proporcionan aquí como SEQ ID NO 7-96 (mostradas más arriba como Tablas 2-8).

Como muestra la Figura 7, los ARNs dirigidos contra R2 pudieron reducir la expresión de R2 en múltiples líneas celulares cultivadas. Cada uno de los tres dúplex de ARNs contra R2 (siRRM2-A, siRRM2-B y siRRM2-C, mostrados en la Tabla 2 como SEQ ID NO 7-12) provoca una reducción del nivel de la proteína R2 en cada una de las tres líneas celulares examinadas. En cambio, el desoxinucleótido antisentido GTI-2040 muestra una reducción mínima.

Para realizar los experimentos mostrados en la Figura 7, se obtuvieron células HeLa (adenocarcinoma de cuello uterino humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular) y CCD-1074Sk (fibroblastos humanos) de la American Type Culture Collection. Las células se dispusieron en placas de cultivo tisular de seis pocillos (250.000 células por pocillo) 24 horas antes de la transfección. Para la transfección se prepararon complejos en un medio libre de suero (OptiMEM, Invitrogen) utilizando Oligofectamine (Invitrogen) y cada uno de los siguientes ácidos nucleicos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante:

45 "siCONTROL" o "siCON1": ARNs de control no dirigido #1 (Dharmacon) mostrado más abajo en la Tabla 10 como SEQ ID NO 97 y 98;

"siRRM2-A": ARNs contra el sitio "A" de hRRM2 mostrado más arriba en la Tabla 2 como SEQ ID NO 7 y 8;

"siRRM2-B": ARNs contra el sitio "B" de hRRM2 mostrado más arriba en la Tabla 2 como SEQ ID NO 9 y 10;

"siRRM2-C": ARNs contra el sitio "C" de hRRM2 mostrado más arriba en la Tabla 2 como SEQ ID NO 11 y 12;
y

50 "GTI-2040": oligodesoxinucleótido antisentido contra hRRM2 (Lee y col., Cancer Research 63: 2802-2811 (2003)) mostrado más abajo en la Tabla 10 como SEQ ID NO 99.

Tabla 10 Secuencias de ácidos nucleicos de control utilizadas en los Ejemplos descritos. Los residuos subrayados representan partes protuberantes en 3'

Descripción	Secuencia	Cadena	SEQ ID NO
siCONTROL	5'uagcgacuaaacacauca <u>uu</u> 3'	Sentido	SEQ ID NO 97
(o siCON1)	3' <u>uu</u> aucgcugauuuguguagu <u>u</u> 5'	Antisentido	SEQ ID NO 98
GTI-2040	5' cuugguggagcgauuuagcc 3'		SEQ ID NO 99

Los complejos de ácido nucleico se expusieron a las células a una concentración nucleica final de 50 nM durante 4 horas, tras lo cual los complejos se retiraron por aspiración y se sustituyeron por medio completo. Dos días (48 horas) después de la transfección, las células se sometieron a lisis y se midió el nivel de proteína R2 por *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-R2 policlonal de cabra primario (sc-10846, Santa Cruz) en una dilución 1:250 y un anticuerpo IgG anti-cabra de burro conjugado con HRP secundario (Santa Cruz) en una dilución 1:5000. El *blot* se desarrolló utilizando un ECL Detection Kit (GE/Amersham Biosciences) y se cuantificó utilizando el *software* ImageQuant TL (GE/Amersham Biosciences).

Ejemplo 3: Experimentos Tiling para Identificar ARNs de R2 en cada sitio diana

Como muestra la Figura 10, se utilizaron experimentos tiling (traslape) para identificar los ARNs dirigidos contra R2 con una potencia aumentada. Cada uno de los tres dúplex de ARNs contra R2 (siRRM2-A, siRRM2-B y siRRM2-C, mostrados en la Tabla 2 como SEQ ID NO 7-12) provoca una reducción del nivel de la proteína de fusión de R2-luciferasa. Tanto el dúplex siRRM2B+3 como el dúplex siRRM2B+5 muestran una reducción superior a la de cada uno de los tres dúplex originales, siendo el siRRM2B+5 el dúplex que produce la reducción más potente. En cambio, ni el desoxinucleótido antisentido GTI-2040 ni un ARNs que tiene la misma diana ("si(GTI-2040)") muestran ninguna reducción. Finalmente, para comparar se muestra la reducción lograda con un ARNs contra RRM2 ("si(JBC, 2004)") previamente publicado.

Para realizar los experimentos mostrados en la Figura 10, se obtuvieron células HepG2 (carcinoma hepatocelular) de la American Type Culture Collection. Las células se dispusieron en placas de cultivo tisular de 24 pocillos (50.000 células por pocillo) 24 horas antes de la transfección. Para la transfección se prepararon complejos en un medio libre de suero (OptiMEM, Invitrogen) utilizando Lipofectin (Invitrogen), el plásmido pR2Luc (1 µg/pocillo) y cada uno de los siguientes ácidos nucleicos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante:

- "siRRM2-A": ARNs contra el sitio "A" de hRRM2 mostrado más arriba en la Tabla 2 como SEQ ID NO 7 y 8;
- "siRRM2-B": ARNs contra el sitio "B" de hRRM2 mostrado más arriba en la Tabla 2 como SEQ ID NO 9 y 10;
- "siRRM2-C": ARNs contra el sitio "C" de hRRM2 mostrado más arriba en la Tabla 2 como SEQ ID NO 11 y 12;
- "siRRM2B+3": ARNs situado a tres nucleótidos en dirección 3' del sitio "B" original de hRRM2, mostrado más arriba en la Tabla 5 como SEQ ID NO 59 y 60;
- "siRRM2B+5": ARNs situado a cinco nucleótidos en dirección 3' del sitio "B" original de hRRM2, mostrado más arriba en la Tabla 5 como SEQ ID NO 63 y 64;
- "GTI-2040": oligodesoxinucleótido antisentido contra hRRM2 mostrado más abajo en la Tabla 10 como SEQ ID NO 99;
- "si(GTI-2040)": ARNs dúplex que tiene el mismo sitio diana que el oligodesoxinucleótido antisentido contra hRRM2 (mostrado más abajo en la Tabla 11 como SEQ ID NO 100 y 101); y
- "si(JBC, 2004)": ARNs dúplex contra hRRM2 previamente publicado (J. Biol. Chem. 279(26):27030-27038, 2004) (mostrado más abajo en la Tabla 11 como SEQ ID NO 102 y 103).

Tabla 11 Secuencias de si(GTI-2040) y si(JBC, 2004) utilizadas en los Ejemplos descritos. Los residuos subrayados representan partes protuberantes en 3'

Descripción	Secuencia	Cadena	SEQ ID NO°
si(GTI-2040)	5'cuugguggagcgauuuagc <u>caa</u> 3'	Sentido	SEQ ID NO 100
	3' <u>uu</u> gaaccaccucgcua <u>aaucgg</u> 5'	Antisentido	SEQ ID NO 101
si(JBC2004)	5' gaggc <u>u</u> accuau <u>gg</u> guga <u>acg</u> u 3'	Sentido	SEQ ID NO 102

Descripción	Secuencia	Cadena	SEQ ID NO°
	3' <u>uu</u> cuccggauggauaccacuug 5'	Antisentido	SEQ ID NO 103

Estos complejos de ácido nucleico se expusieron a las células a una concentración nucleica final de 10 nM durante 4 horas, tras lo cual los complejos se retiraron por aspiración y se sustituyeron por medio completo. Dos días (48 horas) después de la transfección, las células se sometieron a lisis y se midió el nivel de proteína de fusión R2-luciferasa utilizando un ensayo de luciferasa (Luciferase Assay System, Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 4: Experimentos Tiling adicionales para identificar ARNs de R2 en el sitio diana B

La Figura 11 muestra los resultados de los experimentos de tiling (traslape) adicionales realizados para identificar ARNs dirigido contra R2 con una potencia aumentada. Similarmente a los resultados mostrados en la Figura 10, el dúplex siRRM2B+5 produce la reducción más potente. Los dúplex siRRM2B+9 y siRRM2B+3 también provocan una fuerte reducción, pero no tan fuerte como la del dúplex siRRM2B+5.

Para realizar los experimentos mostrados en la Figura 11, se obtuvieron células HepG2 (carcinoma hepatocelular) de la American Type Culture Collection. Las células se dispusieron en placas de cultivo tisular de 24 pocillos (50.000 células por pocillo) 24 horas antes de la transfección. Para la transfección se prepararon complejos en un medio libre de suero (OptiMEM, Invitrogen) utilizando Lipofectin (Invitrogen), el plásmido pR2Luc (1 µg/pocillo) y cada uno de los siguientes ácidos nucleicos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante:

"siGL3": luciferasa dirigida a ARNs vendida por Dharmacon ("Luciferase GL3 Duplex");

"siRRM2B+3": ARNs situado a tres nucleótidos en dirección 3' del sitio "B" original de hRRM2, mostrado más arriba en la Tabla 5 como SEQ ID NO 59 y 60;

"siRRM2B+4": ARNs situado a cuatro nucleótidos en dirección 3' del sitio "B" original de hRRM2, mostrado más arriba en la Tabla 5 como SEQ ID NO 61 y 62;

"siRRM2B+5": ARNs situado a cinco nucleótidos en dirección 3' del sitio "B" original de hRRM2, mostrado más arriba en la Tabla 5 como SEQ ID NO 63 y 64;

"siRRM2B+6": ARNs situado a seis nucleótidos en dirección 3' del sitio "B" original de hRRM2, mostrado más arriba en la Tabla 8 como SEQ ID NO 87 y 88;

"siRRM2B+7": ARNs situado a siete nucleótidos en dirección 3' del sitio "B" original de hRRM2, mostrado más arriba en la Tabla 8 como SEQ ID NO 89 y 90;

"siRRM2B+8": ARNs situado a ocho nucleótidos en dirección 3' del sitio "B" original de hRRM2, mostrado más arriba en la Tabla 8 como SEQ ID NO 91 y 92;

"siRRM2B+9": ARNs situado a nueve nucleótidos en dirección 3' del sitio "B" original de hRRM2, mostrado más arriba en la Tabla 8 como SEQ ID NO 93 y 94;

"siRRM2B+10": ARNs situado a diez nucleótidos en dirección 3' del sitio "B" original de hRRM2, mostrado más arriba en la Tabla 8 como SEQ ID NO 95 y 96.

Estos complejos se expusieron a células en una concentración final de ARNs de 10 nM, 1 nM o 0,2 nM durante 4 horas, tras lo cual los complejos se retiraron por aspiración y se sustituyeron por medio completo. Dos días (48 horas) después de la transfección, las células se sometieron a lisis y se midió el nivel de proteína de fusión R2-luciferasa utilizando un ensayo de luciferasa (Luciferase Assay System, Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 5: Ensayos de la actividad de ARNs 21mero y 27mero

Como muestra la Figura 12, se realizaron estudios de cotransfección dosis-dependiente con dúplex de ARN (21meros o 27meros) en el sitio diana B+5 para identificar ARNs dirigidos contra R2 que presentan una potencia aumentada. Tanto el siRRM2B+5 21mero como el 27mero producen una potente reducción de la R2Luc colipofectada. A las concentraciones más altas examinadas (10 nM y 1 nM), el 21mero muestra una potencia ligeramente mayor que la del 27mero, mientras que en la concentración más baja examinada (0,2 nM), el 27mero muestra una potencia ligeramente mayor.

Para realizar los experimentos mostrados en la Figura 12, se obtuvieron células HepG2 (carcinoma hepatocelular) de la American Type Culture Collection. Las células se dispusieron en placas de cultivo tisular de 24 pocillos (50.000 células por pocillo) 24 horas antes de la transfección. Para la transfección se prepararon complejos en un medio libre de suero (OptiMEM, Invitrogen) utilizando Lipofectin (Invitrogen), el plásmido pR2Luc (1 µg/pocillo) y cada uno de los siguientes ácidos nucleicos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante:

"siRRM2B+5 21mero": ARNsi situado a cinco nucleótidos en dirección 3' del sitio "B" original de hRRM2, mostrado más arriba en la Tabla 5 como SEQ ID NO 63 y 64;

"siRRM2B+5 27mero": ARN dúplex 27mero que tiene el mismo sitio diana que el siRRM2B+5 y que se espera que tenga un producto de segmentación con Dicer idéntico al siRRM2B+5 21mero (mostrado más arriba en la Tabla 7 como SEQ ID NO 85 y 86).

5

Estos complejos se expusieron a las células a una concentración final de ARNsi de 10 nM, 1 nM o 0,2 nM durante 4 horas, tras lo cual los complejos se retiraron por aspiración y se sustituyeron por medio completo. Dos días (48 horas) después de la transfección, las células se sometieron a lisis y se midió el nivel de proteína de fusión R2-luciferasa utilizando un ensayo de luciferasa (Luciferase Assay System, Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10 **Ejemplo 6: Reducción de la expresión de R2 endógena utilizando ARNsi**

Como muestra la Figura 13, la reducción de la proteína de fusión R2-luciferasa inducida por ARNsi está en correlación con el silenciamiento de la expresión de la R2 endógena. En las cuatro ocasiones examinadas, el siRRM2B+5 induce una fuerte reducción de la proteína R2 endógena que no se ha observado con el ARNsi de control no dirigido (siCON1). Esto confirma que el dúplex siRRB2B+5, examinado primero en los "experimentos de tiling" con la proteína de fusión R2-luciferasa es en realidad un potente reductor de la R2 endógena en células de carcinoma hepatocelular.

15

Para realizar los experimentos mostrados en la Figura 13, se obtuvieron células HepG2 (carcinoma hepatocelular) de la American Type Culture Collection. Las células se dispusieron en placas de cultivo tisular de seis pocillos (250.000 células por pocillo) 24 horas antes de la transfección. Para la transfección se prepararon complejos en un medio libre de suero (OptiMEM, Invitrogen) utilizando Oligofectamine (Invitrogen) y cada uno de los siguientes ácidos nucleicos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante:

20

"siCONTROL": ARNsi de control no dirigido #1 (Dharmacon) (mostrado más arriba en la Tabla 10 como SEQ ID NO 97 y 98); y

"siRRM2B+5": ARNsi situado a cinco nucleótidos en dirección 3' del sitio "B" original de hRRM2 (mostrado más arriba en la Tabla 5 como SEQ ID NO 63 y 64).

Estos complejos se expusieron a las células a una concentración de ARNsi final de 50 nM durante 4 horas, tras lo cual los complejos se retiraron por aspiración y se sustituyeron por medio completo. Un día (24 h), dos días (48 horas), tres días (72 h) o 3,25 días (78 h) después de la transfección, las células se sometieron a lisis y se midió el nivel de proteína R2 por *Western blot*. Para el *Western blot* se utilizó un anticuerpo anti-R2 policlonal de cabra primario (sc-10846, Santa Cruz) en una dilución 1:250 y una IgG anti-cabra de burro conjugado con HRP secundario (Santa Cruz) a una dilución 1:5000. El *Western blot* se desarrolló utilizando un ECL Detection Kit (GE/Amersham Biosciences). A continuación se retiró la membrana (Restore Stripping Buffer, Pirece) y se sometió a *blot* para GAPDH como control de carga. La cuantificación de los *Western blot* se llevó a cabo utilizando el *software* ImageQuant TL (GE/Amersham Biosciences).

30

Ejemplo 7: El ARNsi contra R2 induce apoptosis en las células HepG2

Como muestra la Figura 14, el ARNsi contra R2 induce la apoptosis en células HepG2. En las tres ocasiones examinadas, pero de forma más significativa 3 días después de la transfección, las células HepG2 transfectadas con siRRM2B+5 mostraban un mayor grado de fluorescencia (lo que indica un mayor nivel de apoptosis) que las células transfectadas con siCON1.

35

Para realizar los experimentos mostrados en la Figura 14, se obtuvieron células HepG2 (carcinoma hepatocelular) de la American Type Culture Collection. Las células se dispusieron en placas de cultivo tisular de seis pocillos (250.000 células por pocillo) 24 horas antes de la transfección. Para la transfección se prepararon complejos en un medio libre de suero (OptiMEM, Invitrogen) utilizando Oligofectamine (Invitrogen) y cada uno de los siguientes ácidos nucleicos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante:

40

"siCONTROL": ARNsi de control no dirigido #1 (Dharmacon) (mostrado más arriba en la Tabla 10 como SEQ ID NO 97 y 98); y

"siRRM2B+5": ARNsi situado a cinco nucleótidos en dirección 3' del sitio "B" original de hRRM2 (mostrado más arriba en la Tabla 5 como SEQ ID NO 63 y 64).

45

Estos complejos se expusieron a las células a una concentración de ARNsi final de 50 nM durante 4 horas, tras lo cual los complejos se retiraron por aspiración y se sustituyeron por medio completo. Un día (24 h), dos días (48 horas) o tres días (72 h) después de la transfección, las células se analizaron en cuanto a la apoptosis utilizando el Vybrant Apoptosis Assay #2 (Invitrogen) y citometría de flujo. Los datos se indican como fluorescencia media de población después de exposición a anexina V marcada con AlexaFluor488.

50

Ejemplo 8: El ARNsi contra R2 aumenta la apoptosis inducida por fármacos en células HCC

5 Como muestra la Figura 15, el ARNsi contra la R2 aumenta la apoptosis inducida por fármacos de HCC. Células HepG2 que habían sido lipofectadas con siRRM2B+5 antes de la exposición a la adriamicina mostraron un nivel de apoptosis significativamente más altas que aquellas que no habían recibido ARNsi o que habían sido lipofectadas con el ARNsi de control no dirigido (siCON1).

10 Para realizar los experimentos mostrados en la Figura 15, se obtuvieron células HepG2 (carcinoma hepatocelular) de la American Type Culture Collection. Las células se dispusieron en placas de cultivo tisular de seis pocillos (250.000 células por pocillo) 24 horas antes de la transfección. Para la transfección se prepararon complejos en un medio libre de suero (OptiMEM, Invitrogen) utilizando Oligofectamine (Invitrogen) y cada uno de los siguientes ácidos nucleicos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante:

"siCONTROL": ARNsi de control no dirigido #1 (Dharmacon) (mostrado más arriba en la Tabla 10 como SEQ ID NO 97 y 98); y

"siRRM2B+5": ARNsi situado a cinco nucleótidos en dirección 3' del sitio "B" original de hRRM2 (mostrado más arriba en la Tabla 5 como SEQ ID NO 63 y 64).

15 Estos complejos se expusieron a las células a una concentración de ARNsi final de 50 nM durante 4 horas, tras lo cual los complejos se retiraron por aspiración y las células (tratadas con lipoplex y también células no tratadas previamente) se incubaron con adriamicina (100 nM) durante 3 días. Después, las células se analizaron en cuanto a la apoptosis utilizando el Vybrant Apoptosis Assay #2 (Invitrogen) y citometría de flujo. Los datos se indican como fluorescencia media de población después de exposición a anexina V marcada con AlexaFluor488.

Ejemplo 9: El ARNsi contra R2 Reduce la expresión de la proteína de fusión R2-luciferasa *in vivo*

20 Como muestra la Figura 16, el ARNsi contra R2 reduce la expresión de la proteína de fusión R2-luciferasa *in vivo*. En todas las ocasiones, los ratones que recibieron el dúplex siRRM2B+5 (mostrado más arriba en la Tabla 5 como SEQ ID NO 63 y 64) presentaban una luminiscencia claramente reducida en comparación con los ratones que recibieron el plásmido pR2Luc solo o el plásmido con el dúplex siCON1.

25 Para realizar los experimentos mostrados en la Figura 16, ratones BALB/c hembra (6 semanas de edad, Jackson Labs, grupos de n = 5) recibieron una sola inyección a alta presión (10% v/p), en la vena caudal, del plásmido pR2Luc (0,25 mg/kg) solo o en combinación con ARNsi (1,25 mg/kg) contra R2 (siRRM2B+5), luciferasa (Luc105-21) o un ARNsi de control no dirigido (siCON1). En diversas ocasiones (2, 6, 11 y 17 días) después de la inyección, los ratones fueron anestesiados (gas isoflurano), se les inyectó D-luciferina (Senogen; 150 mg/kg en PBS por vía intraperitoneal) y 10 minutos más tarde se tomaron imágenes para determinar la bioluminiscencia animal total (utilizando IVIS 100 Imaging System, Xenogen). Los datos del gráfico de barras representan la bioluminiscencia animal total como un porcentaje del valor medio correspondiente a los ratones que recibieron sólo el plásmido pR2Luc en cada ocasión. Además se muestran imágenes representativas de los ratones tomadas t = 2 días después de la inyección (Figura 16).

Ejemplo 10: El ARNsi contra R2 Reduce el potencial de crecimiento de células HCC cultivadas

35 Como muestra la Figura 17, el ARNsi optimizado contra R2 (siR2B+5) reduce el potencial de crecimiento de células HCC humanas cultivadas (células Hep3B). La lipofección de células Hep3B con ARNsi optimizado contra R2 (siR2B+5) reduce considerablemente el potencial de formación de colonias en comparación con tratamientos similares con un ARNsi de control no dirigido (siCON1). Esto da a entender que la reducción de R2 (resultante únicamente de la lipofección con ARNsi anti-R2) en estas células reduce su potencial de crecimiento.

40 Para realizar los experimentos mostrados en la Figura 17, se obtuvieron células Hep3B (carcinoma hepatocelular humano) de la American Type Culture Collection. Las células se dispusieron diluidas en placas de cultivo tisular de seis pocillos (1000 células por pocillo) 24 horas antes de la transfección. Para la transfección se prepararon complejos en un medio libre de suero (OptiMEM, Invitrogen) utilizando Oligofectamine (Invitrogen) y cada uno de los siguientes ácidos nucleicos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante:

"siR2B+5": ARNsi optimizado contra hRRM2 (mostrado más arriba en la Tabla 5 como SEQ ID NO 63 y 64); y

"siCON1": ARNsi de control no dirigido #1 (Dharmacon) (mostrado más arriba en la Tabla 10 como SEQ ID NO 97 y 98).

50 Estos complejos se expusieron a las células a una concentración de ARNsi final de 5 nM durante 4 horas, tras lo cual los complejos se retiraron por aspiración y se sustituyeron por medio completo. Cinco días (120 horas) después de la transfección, las células se fijaron con etanol (10 minutos) y se tiñeron con azul de metileno (en agua). Las colonias (con ~50 o más células) se contaron manualmente. Para cada tratamiento se utilizaron tres pocillos (n = 3); las columnas representan promedios y las barras de error representan la desviación estándar (Figura 17).

Ejemplo 11: La potencia de ARNsi está en correlación con la capacidad para reducir el potencial de crecimiento

Como muestra la Figura 18, la potencia de los ARNsi contra R2 está en correlación con la capacidad de éstos para reducir el potencial de crecimiento de células HCC humanas cultivadas. La lipofección de células Hep3B con cualquiera de los tres ARNsi que han demostrado ser reductores potentes de la R2 (siR2B+3, siR2B+5 y siR2B+9) reduce significativamente el potencial de formación de colonias en comparación con un tratamiento similar con cualquiera de los dos ARNsi que han demostrado ser malos reductores de la R2 (siR2B+6 y siR2B+7). Este resultado, como en el caso del resultado de la Figura 17, sugiere que la reducción de R2 (resultante exclusivamente de la lipofección con ARNsi anti-R2) en células Hep3B reduce el potencial de crecimiento de éstas.

Para realizar los experimentos mostrados en la Figura 18, se obtuvieron células Hep3B (carcinoma hepatocelular humano) de la American Type Culture Collection. Las células se dispusieron diluidas en placas de cultivo tisular de seis pocillos (500 células por pocillo) 24 horas antes de la transfección. Para la transfección se prepararon complejos en un medio libre de suero (OptiMEM, Invitrogen) utilizando Oligofectamine (Invitrogen) y cada uno de los siguientes ácidos nucleicos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante:

“siR2B+3”: ARNsi relativamente potente contra hRRM2 (mostrado más arriba en la Tabla 5 como SEQ ID NO 59 y 60);

“siR2B+5”: ARNsi relativamente potente contra hRRM2 (mostrado más arriba en la Tabla 5 como SEQ ID NO 63 y 64);

“siR2B+6”: ARNsi menos potente contra hRRM2 (mostrado más arriba en la Tabla 8 como SEQ ID NO 87 y 88);

“siR2B+7”: ARNsi menos potente contra hRRM2 (mostrado más arriba en la Tabla 8 como SEQ ID NO 89 y 90); y

“siR2B+9”: ARNsi relativamente potente contra hRRM2 (mostrado más arriba en la Tabla 5 como SEQ ID NO 93 y 94).

Estos complejos se expusieron a las células a una concentración de ARNsi final de 5 nM durante 4 horas, tras lo cual los complejos se retiraron por aspiración y se sustituyeron por medio completo. Cinco días (120 horas) después de la transfección, las células se fijaron con etanol (10 minutos) y se tiñeron con azul de metileno (en agua). Las colonias (con ~50 o más células) se contaron manualmente. Para cada tratamiento se utilizaron tres pocillos (n = 3); las columnas representan promedios y las barras de error representan la desviación estándar (Figura 18). Para comparar, la Figura 11 muestra los resultados de un estudio de cotransfección (para evaluar la potencia relativa de estos dúplex de ARNsi contra R2).

Ejemplo 12: La reducción del potencial de crecimiento por ARNsi contra R2 se incrementa con 5-FU

Como muestra la Figura 19, la reducción del potencial de crecimiento de células Hep3B por ARNsi contra R2 (siR2B+5) se incrementa mediante la exposición a 5-fluorouracilo. Tal como se describe más arriba (véase la Figura 17), la lipofección de células Hep3B con ARNsi optimizado contra R2 (siR2B+5) reduce considerablemente el potencial de formación de colonias en comparación con un tratamiento similar con un ARNsi de control negativo (aquí, este ARNsi es Luc105-21, que está dirigido a luciferasa de luciérnaga). Además, la exposición de las células al agente quimioterapéutico 5-fluorouracilo (5 µM durante 72 horas) reduce el número de colonias con respecto a las células no tratadas y aumenta el efecto antiproliferativo del siR2B+5.

Para realizar los experimentos mostrados en la Figura 19, se obtuvieron células Hep3B (carcinoma hepatocelular humano) de la American Type Culture Collection. Las células se dispusieron diluidas en placas de cultivo tisular de seis pocillos (500 células por pocillo) 24 horas antes de la transfección. Para la transfección se prepararon complejos en un medio libre de suero (OptiMEM, Invitrogen) utilizando Oligofectamine (Invitrogen) y cada uno de los siguientes ácidos nucleicos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante:

“siR2B+5”: ARNsi potente contra hRRM2 (mostrado más arriba en la Tabla 5 como SEQ ID NO 63 y 64); y

“Luc105-21”: ARNsi contra luciferasa de luciérnaga (utilizado aquí como control negativo; mostrado más abajo en la Tabla 12 como SEQ ID NO 104 y 105).

Tabla 12 Secuencia de Luc105-21 utilizada en los Ejemplos descritos. Las letras MAYÚSCULAS indican residuos de ADN, las letras minúsculas indican residuos de ARN y los residuos subrayados representan partes protuberantes en 3'

Descripción	Secuencia	Cadena	SEQ ID NO
Luc105-21	5' gguuccuggaacaauugcuTT_3'	Sentido	SEQ ID NO 104

Descripción	Secuencia	Cadena	SEQ ID NO
	3' <u>TT</u> ccaaggaccuuguuaacga 5'	Antisentido	SEQ ID NO 105

Estos complejos se expusieron a las células a una concentración nucleica final de 5 nM durante 4 horas, tras lo cual los complejos se retiraron por aspiración y se sustituyeron por medio completo. En el caso de las muestras tratadas con 5-FU, el medio de cultivo se complementó con 5-fluorouracilo (5-FU) 5 μ M 48 horas después de la transfección y las células se incubaron durante tres días más. Cinco días (120 horas) después de la transfección, las células se fijaron con etanol (10 minutos) y se tiñeron con azul de metileno (en agua). Las colonias (con ~50 o más células) se contaron manualmente. Para cada tratamiento se utilizaron tres pocillos (n = 3); las columnas representan promedios y las barras de error representan la desviación estándar (Figura 19).

Ejemplo 13: El ARNsi contra R2 reduce los niveles de proteína R2 en tumores de ratones

Como muestra la Figura 20, el ARNsi contra R2 reduce los niveles de la proteína R2 en tumores Hep3B subcutáneos en ratones. En dos de los tres ratones tratados con formulaciones que contienen ARNsi anti-R2 (siR2B+5), los niveles de proteína R2 en los tumores se reducen claramente en comparación con los niveles observados en ratones tratados con ARNsi de control no dirigido (siCON1). Esto sugiere que tres inyecciones intratumorales en días consecutivos de formulaciones que contienen siR2B+5 logran una reducción de la proteína R2 en dichos tumores.

Para realizar los experimentos mostrados en la Figura 20, se inyectaron células Hep3B (carcinoma hepatocelular humano) por vía subcutánea en ratones nu/nu hembra HRLN. Cuando los tumores alcanzaron una masa media de ~200-300 mg, los ratones se trataron con tres inyecciones intratumorales (IT) en días consecutivos de ARNsi optimizado contra R2 (mostrado en la Tabla 5 como SEQ ID NO 63 y 64) o de ARNsi de control no dirigido (siCON1) (mostrado en la Tabla 10 como SEQ ID NO 97 y 98) dentro de un sistema de suministro de polimerización con contenido en ciclodextrina (CDP) con un ligando dirigido a adamantano-poli(etilenglicol)-transferrina (AD-PEG-Tf) (2,5 mg/kg ARNsi por inyección). Dos días después de la tercera inyección, los ratones fueron sacrificados, se recogieron los tumores, se fijaron con formalina, se embebieron en parafina, se seccionaron y se analizaron en cuanto a la expresión de la proteína R2 humana mediante inmunohistoquímica (IHC). Las secciones se calificaron en función de la expresión relativa de la proteína R2 (+: baja, ++: moderada; +++: alta).

Ejemplo 14: El ARNsi contra R2 reduce los niveles de proteína en células de hepatoma de rata

Como muestra la Figura 21, el ARNsi contra R2 reduce los niveles de la proteína R2 en células de hepatoma de rata cultivadas (McA-Rh7777). Todas las moléculas dirigidas contra R2 (GTI-2040 antisentido, siR2B+5 21mero y siR2B+5-27 25/27mero) muestran reducciones dosis-dependientes de los niveles de proteína R2 que son superiores a las de un control negativo (Luc105-21, ARNsi contra la luciferasa). Las reducciones de R2 del siR2B+5 21mero y del siR2B+5-27 25/27mero son comparables entre sí y superiores a las observadas en el caso de la molécula antisentido GTI-2040. Por último, estos datos sugieren que estos dos dúplex, desarrollados originalmente contra hRRM2, también pueden lograr una reducción del ortólogo de rata de proteína R2 (rRRM2).

Para realizar los experimentos mostrados en la Figura 21, se obtuvieron células McA-RH7777 (hepatoma de rata) de la American Type Culture Collection. Las células se dispusieron en placas de cultivo tisular de seis pocillos (250.000 células por pocillo) 24 horas antes de la transfección. Para la transfección se prepararon complejos en un medio libre de suero (OptiMEM, Invitrogen) utilizando Oligofectamine (Invitrogen) y cada uno de los siguientes ácidos nucleicos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante:

"Luc105-21": ARNsi optimizado contra luciferasa de luciérnaga (control negativo);

"GTI-2040": oligonucleótido antisentido contra hRRM2;

"siR2B+5": ARNsi optimizado (21mero) contra hRRM2;

"siR2B+5-27": ARN sustrato Dicer optimizado (25/27mero) contra hRRM2.

Estos complejos se expusieron a las células a una concentración de ácido nucleico final de 1 nM o 20 nM durante 4 horas, tras lo cual los complejos se retiraron por aspiración y se sustituyeron por medio completo. Dos días (48 horas) después de la transfección, las células se sometieron a lisis y se midió el nivel de proteína R2 por *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-R2 policlonal de cabra (sc-10846, Santa Cruz) a una dilución 1:250 como anticuerpo primario y una IgG anti-cabra de burro conjugado con HRP (Santa Cruz) a una dilución 1:10.000 como anticuerpo secundario. Los *blots* se desarrollaron utilizando un ECL Detection Kit (GE/Amersham Biosciences). La cuantificación de los *Western blots* se llevó a cabo utilizando el *software* ImageQuant TL (GE/Amersham Biosciences).

Ejemplo 15: Sistemas de suministro de ARNsi

Se ha creado un sistema no viral de suministro de ácido nucleico que está basado en polimerizaciones cortas que contienen ciclodextrina (CDP). Este vehículo es el primer ejemplo de un sistema de suministro de ácido nucleico basado en

polímeros formado completamente por autoensamblaje y es el vector más ajustable actualmente disponible (Davis y col., 2004). Este sistema de suministro muestra una toxicidad sumamente baja *in vitro* e *in vivo* (*in vitro*: González y col., 1999; Hwang y col., 2001; Pun y Davis, 2002; Reineke y Davis, 2003a, b; *in vivo*: Bellocq y col., 2003b; Davis y col., 2004; Pun y col., 2004) y posibilita la administración sistémica de oligonucleótidos (Pun y col., 2004), de ARNsi (Hu-Lieskován y col., 2005) y plásmidos (Bellocq y col., 2003b) a animales. Los trabajos iniciales con ratones y conejos han revelado que el sistema de suministro no provoca respuestas inmunes y tiene la capacidad de alterar la biodistribución del ácido nucleico suministrado dentro del animal (Pun y col., 2004; Hu-Lieskován y col., 2005). El sistema de suministro consiste en partículas autoensambladas con diámetros ajustables de aproximadamente 50 nm y cargas superficiales. Estas nanopartículas se formulan por completo mediante métodos de autoensamblaje para obtener vehículos de suministro reproducibles y escalables. Las nanopartículas están diseñadas para que se mantengan ensambladas hasta que "sientan" el pH bajo del entorno intracelular, tras lo cual se modifican a sí mismas para ayudar al tráfico intracelular. Las partículas pueden alojar ligandos dirigidos para que se unan a los receptores de la superficie celular y su uso ha posibilitado un suministro dirigido en animales (Bellocq y col., 2003b; Pun y col., 2004; Hu-Lieskován y col., 2005). Por consiguiente, podemos: (i) crear vehículos de suministro de ácido nucleico bien definidos con propiedades ajustables que se pueden caracterizar mediante métodos cuantitativos; y (ii) proporcionar un suministro y una función eficaces en modelos de roedores.

Cáncer de hígado

El cáncer de hígado puede adoptar muchas formas. El cáncer de células del hígado, es decir el carcinoma hepatocelular, es muy diferente a los tumores metastásicos de otros tipos de tejido, tales como el tejido colorrectal, mama, pulmón, etc., que residen en el hígado. El cáncer de hígado primario es el sexto cáncer más frecuente en todo el mundo (Gerolami y col., 2003). El trabajo aquí propuesto es para los carcinomas hepatocelulares y por consiguiente se refiere a cánceres de hepatocitos. La estadística de 2004 de la American Cancer Society muestra que la tasa de supervivencia relativa a cinco años entre 1992-1999 en casos de cáncer de hígado confinado en el hígado es del 16,3%, en comparación con otros tejidos confinados: mama (97,0%), colon y recto (90,1%), próstata (100,0%) y páncreas (16,6%). Por consiguiente, los cánceres de hígado y páncreas son, con mucho, los cánceres confinados localmente más letales en humanos, y este hecho demuestra la necesidad de nuevas terapias de mayor eficacia contra estos cánceres. Aquí proponemos un nuevo agente terapéutico para el tratamiento del cáncer de hígado. Es decir, se plantea que la inhibición de la subunidad 2 (R2) de la ribonucleótido-reductasa (RNR) mediante ARN interferentes pequeños (ARNsi) proporcionará una nueva terapia eficaz contra el cáncer de hígado. La inhibición de R2 sola y en combinación con una dosis baja de agentes quimioterapéuticos proporcionará un nuevo mecanismo de acción terapéutica para tratar el cáncer de hígado con un perfil de seguridad previsto superior al de terapias actuales.

Inhibición de la subunidad 2 de la Ribonucleótido-reductasa para el cáncer de hígado

La ribonucleótido-reductasa (RNR) cataliza la reacción que produce 2'-desoxirribonucleótidos a partir de sus ribonucleósido-5'-difosfatos correspondientes. Esta reacción es un paso limitante en la ruta de producción de 2'-desoxirribonucleósido-5'-trifosfatos y es necesaria para la replicación del ADN. La RNR humana consiste en dos subunidades, R1 y R2, y para la actividad enzimática se requiere la expresión de las dos proteínas. Las proteínas R1 y R2 son codificadas por genes diferentes en cromosomas independientes y, lo más importante, sus ARNm son expresados de forma diferenciada durante todo el ciclo celular. La proteína R1 es estable a lo largo de todo el ciclo celular, mientras que la R2 solo es expresada durante la fase tardía G1/temprana S cuando se produce la replicación de ADN (Engstrom y col., 1985).

La RNR es una diana interesante para las terapias contra el cáncer. Las pruebas dadas en la literatura sugieren que el supresor de tumor de retinoblastoma suprime la R1 y la R2 como un mecanismo para controlar el progreso a lo largo del ciclo celular (Angus y col., 2002). La proteína R2 también puede desempeñar una función en la determinación del potencial maligno de las células tumorales a través de su interacción con numerosos oncogenes activados. Por ejemplo, Fan y col. han demostrado que el crecimiento dependiente del anclaje de células transformadas con v-fins, v-src, A-raf, c-myc y otros se incrementa de forma considerable cuando existe una sobreexpresión de R2 (Fan y col., 1998). Se ha demostrado que la sobreexpresión de R2 es un factor que causa resistencia a la gemcitabina (Liu y col., 2004). Recientemente, Lin y col. (2004) han informado de que la supresión de la R2 mediante ARNsi sensibiliza las células HCT-116 frente a agentes perjudiciales para el ADN e inhibidores de la RNR. Estos y otros aspectos hacen que la inhibición de R2 sea un objetivo útil para las terapias contra el cáncer (Yen, 2003).

Yen y col. (Chen y col., 2000) y Lee y col. (2003) han demostrado que moléculas antisentido para R2 pueden reducir de forma significativa el crecimiento de células cancerosas humanas tanto *in vitro* como *in vivo*. Lee y col. han mostrado que el GTI-2040, un oligonucleótido de fosforotioato 20mero (PS-ODN) del que se ha demostrado que inhibe la producción de R2 a 200 nM *in vitro* (Orr y Dorr, 2004), inhibe tumores subcutáneos de colon, páncreas, hígado, pulmón, mama, riñón, ovario, cerebro, próstata, etc. humanos en ratones desnudos (Lee y col., 2003). Estos trabajadores también han demostrado que los niveles de la proteína R2 son elevados en líneas celulares cancerosas, siendo estos resultados coherentes con estudios anteriores que han puesto de manifiesto niveles elevados de la RNR en tumores y líneas celulares tumorales (Jensen y col., 1994). El concepto de la utilización de la inhibición de la R2 como estrategia contra el cáncer en humanos está siendo analizado por trabajadores de Lorus Therapeutics (Lee y col., 2003), que están llevando a cabo actualmente ensayos clínicos en Fase II con GTI-2040 (Orr y Dorr, 2004). Los resultados de la Fase I (administrados mediante infusión i.v. continua durante 3 semanas seguida de 1 semana de descanso entre ciclos

a 27 pacientes con cáncer avanzado) indicaban que para los ensayos de la Fase II era recomendable una dosis de 185 mg/m²/d (5 mg/kg/d) (Orr y Dorr, 2004). En los ensayos en Fase II se utiliza GTI-2040 en combinación con capecitabina para el tratamiento del carcinoma renal. Los datos iniciales del ensayo muestran una estabilización de la enfermedad y ciertas respuestas tumorales en algunos de los 21 pacientes evaluables (Orr y Dorr, 2004). Se ha demostrado que el ARN interferente (ARNi) es mucho más potente que las moléculas antisentido para la inhibición específica de secuencia de la expresión genética y se está convirtiendo rápidamente en el método a elegir para la regulación de la expresión genética por encima de las tecnologías antisentido, ribozima o ADNzima. Muy recientemente, Whang y col. han utilizado: (i) ARNsi contra R2 para aumentar la quimiosensibilidad del adenocarcinoma pancreático a la gemcitabina (Duxbury y col., 2004a), y (ii) ARNsi de expresión retroviral contra la R2 para atenuar la invasividad celular del adenocarcinoma pancreático y reducir su resistencia a la gemcitabina (Duxbury y col., 2004b).

Estos estudios, y otros no indicados en este documento, demuestran que R2 es una diana excelente para el cáncer de hígado. Una característica de importancia específica de los hepatocarcinomas consiste en que las células cancerosas avanzan durante el ciclo celular a medida que crece el tumor, mientras que los hepatocitos normales permanecen quiescentes. Por consiguiente, no es probable que un suministro fuera de diana a hepatocitos normales produzca efectos secundarios graves. Aquí creamos partículas dirigidas a hepatocitos que suministran ARNsi contra R2 a hepatocitos con el fin de inhibir la expresión de R2, proporcionando una terapia nueva y eficaz contra el carcinoma hepatocelular.

Importancia del tamaño de 10-100 nm para el suministro sistémico eficaz de productos terapéuticos

La escala de longitudes de decenas de nanómetros es apropiada para los agentes que han de tener tiempos de circulación adecuados para permitir una acumulación y un tráfico significativos en tumores. Agentes con un diámetro inferior a 10 nm son eliminados rápidamente (en minutos) del sistema circulatorio por los riñones (Jorgensen y Moller 1979). Los productos terapéuticos en moléculas pequeñas son eliminados principalmente de este modo. Cuando los agentes presentan un diámetro superior a 10 nm, no pueden salir físicamente a través de los riñones. Por consiguiente, 10 nm es el límite de tamaño inferior para los agentes que requieren tiempos de circulación largos (horas). El límite de tamaño superior para la circulación es el diámetro de los capilares. No obstante, este tamaño es demasiado grande para una permeabilidad efectiva en los tumores. La mayor parte de los tumores sólidos tienen características que no se observan en el tejido normal. Algunas de estas características son: (i) angiogénesis extensa y por ello alta densidad vascular (Matre y col., 1999), (ii) permeabilidad vascular extensa, (iii) arquitectura vascular defectuosa y (iv) eliminación linfática reducida en espacios intersticiales (Fang y col., 2003). El, así llamado, efecto de "permeabilidad y retención incrementadas" (*enhanced permeability and retention* - EPR), que es una consecuencia de las características de los tumores (i-iv) bien conocida y permite que macromoléculas biológicas y sintéticas salgan de la circulación y se acumulen en tumores (Fang y col., 2003; Tanaka y col., 2004). Los fármacos convencionales de bajo peso molecular tienen vidas medias en plasma de minutos. El efecto de EPR requiere horas para que se produzca una acumulación significativa. Por consiguiente, la absorción en tumores mediante el efecto de EPR se incrementa en caso de entidades que no se eliminan a través de los riñones (tamaño superior a 10 nm). Las entidades que tienen un diámetro de centenas de nm pueden salir del sistema circulatorio y entrar en los tumores. Los agentes de este tamaño tienen pocas localizaciones adicionales accesibles desde el sistema circulatorio, pero otro tejido es el hígado (las fenestraciones del endotelio tienen aproximadamente 100-150 nm). Al salir del sistema circulatorio y entrar en la masa tumoral, los agentes han de tener cierta movilidad dentro del tumor. Mediante experimentación (mostrada más abajo) hemos comprobado que los agentes de un diámetro de aproximadamente 50 nm son una buena solución intermedia en cuanto al tamaño. Es decir, si los agentes tienen 10 nm no pueden transportar mucho producto terapéutico, mientras que tamaños de más de 100 nm limitan la movilidad en el tejido. En el caso del carcinoma hepatocelular, este tamaño también es muy apropiado para el suministro a las células tumorales, ya que las partículas también han de cruzar fenestraciones del hígado (aproximadamente 150 nm, Guyton, 1981) y acoplarse con el ASGPR (tamaños menores de 70 nm; Rensen y col., 2001).

Davis y col. han investigado los efectos del tamaño y el ligando dirigido para alcanzar la localización intracelular de hepatocitos desde una inyección sistémica. Utilizando perlas de polímero monodispersas marcadas de forma fluorescente se han sintetizado cuatro tipos de partículas mediante los métodos mostrados esquemáticamente en la Figura 22. Las propiedades de las perlas se citan en la Tabla 1 y la Figura 23 muestra una distribución de tamaños típica junto con una partícula de ARNsi formulada (detalles en secciones posteriores) para mostrar que las perlas son buenos modelos para las partículas terapéuticas.

Tabla 11 Perlas para experimentos de absorción

Nombre de la perla	Diámetro medio (nm)	Potencial z(mV)	Densidad superficial en galactosa (pmol/cm²)
Gal-50	51,5	-2,7	25,4
MeO-50	53,5	-2,7	0
Gal-140	138,1	-2,6	30,6

Nombre de la perla	Diámetro medio (nm)	Potencial z(mV)	Densidad superficial en galactosa (pmol/cm ²)
MeO-140	138,7	-3,2	0

Se expuso la misma cantidad de perlas a ratones mediante inyecciones en la vena caudal, la Figura 24 muestra el porcentaje de la dosis recogida en el hígado. Obsérvese que las partículas que carecen de galactosa no se acumulan en una cantidad significativa. Las secciones de hígado (Figura 25) revelan que las partículas de Gal-140 no llegan realmente a los hepatocitos (Figura 25A), sino que son absorbidas en las células de Kupffer como partículas individuales (Figura 26), y este resultado muestra que las partículas no forman agregaciones en la sangre, en el tejido o dentro de la célula. Por otro lado, las partículas de Gal-50 están localizadas intracelularmente en hepatocitos por toda la muestra (Figura 25B). Los núcleos se visualizaban con tinte azul mientras que las perlas se visualizaban en color verde.

Estos datos sugieren que partículas con tamaños de aproximadamente 50 nm pueden desarrollar un movimiento considerable través del tejido y entrar en las células. Si bien en estos estudios las dianas eran hepatocitos, nosotros hemos observado un comportamiento similar en tumores. Se comprobó que las partículas dirigidas a transferrina que portan ADNzimas marcadas de forma fluorescente con un tamaño de 50 nm se emplazaban en el interior de células tumorales desde una inyección en la vena caudal de ratones, mientras que las partículas de 50 nm que carecían del ligando dirigido a transferrina se emplazaban en el tumor por el efecto EPR, pero no entraban en las células tumorales (Pun y col., 2004). Por consiguiente, estos dos estudios muestran que tamaños de partícula de alrededor de 50 nm son apropiados para alcanzar con eficacia emplazamientos intracelulares en hepatocitos y tumores desde una administración sistémica.

Diseño y función de un sistema de suministro de ácido nucleico de autoensamblaje

Nuestro sistema de suministro no viral (González y col., 1999; Hwang y col., 2001; Pun y Davis, 2002; Reineke y Davis, 2003a,b) incluye dos componentes. El primer componente consiste en un policación que contiene ciclodextrina (véase la Figura 27). Mediante la preparación de numerosos politaciones con variaciones en el espaciamiento de carga, el tipo de centro de carga y la hidrofobicidad (cambiando la hidrofobicidad del esqueleto polimérico) se comprobó que las toxicidades *in vitro* están en correlación con la hidrofobicidad del policación (véase la Figura 28). El policación que contiene CD interactúa con ácidos nucleicos de un tamaño desde oligos monocatenarios cortos hasta grandes plásmidos (hemos utilizado hasta 10 kpb), se autoensambla con los ácidos nucleicos por interacciones electrostáticas (positivo en polímero, negativo en ácido nucleico) para formar poliplexos de aproximadamente 10-100 nm que contienen el 100% del ácido nucleico en la mezcla y se protege completamente el ácido nucleico frente a la degradación por nucleasa (Hwang y col., 2001; Pun y Davis, 2002). Las imágenes MET sugieren que los poliplexos poseen morfología esférica (Hwang y col., 2001). Los estereopares FE-SEM y MET confirman que las partículas tienen morfología esférica y las imágenes crio-MET que estas partículas son densas. Los politaciones tienen baja toxicidad (en el caso del policación solo: IC₅₀ *in vitro* por encima de 1 mM y bien tolerado en cantidades por encima de 100 mg/kg en ratones (Hwang y col., 2001); en el caso de partículas completamente formuladas: las cantidades de CDP pueden ser mayores de 500 mg/kg sin toxicidad aguda (Pun y col., 2004). Claramente, la ciclodextrina es una característica importante para lograr una baja toxicidad.

Los datos mostrados en la Figura 30 ilustran el suministro *in vitro* de ADN plásmido (ADNp). Otros politaciones que proporcionan un efecto tampón con valores pH por debajo de 7 ayudan de algún modo a aumentar la expresión genética (Zuber y col., 2001; Putman y col., 2001). Para que el CDP tuviera este tipo de capacidad de efecto tampón y fuera apropiado para estudios *in vivo*, en los extremos del CDP se conjugaron grupos imidazol (pK_a ~6,2) tal como se ilustra en la Figura 27.

El CDP con contenido en imidazol tiene un efecto tampón del pH en vesículas endocíticas (recientes mediciones con otras sondas fluorescentes sensibles al pH en células vivas muestran concluyentemente que se produce un efecto tampón del pH - datos no mostrados). El tamponamiento de los endosomas provoca un hinchamiento osmótico que finalmente puede conducir a la ruptura de la vesícula y la liberación del ácido nucleico. Adicionalmente, la protonización de imidazol en el CDP hace que el polímero libere el ácido nucleico. La Figura 31 muestra MET que ilustran este punto.

Los poliplexos arriba descritos con CDP o CDP-im tienen los mismos problemas que otros poliplexos en el sentido de que son partículas coloidales con carga positiva que forman agregaciones en condiciones fisiológicas. Los intentos de lograr una estabilización en sal y suero de los poliplexos por PEGilación (PEG: polietilenglicol) han dado resultados diversos. La PEGilación puede impedir la unión y condensación de ADNp (Garret y col., 2000) o cambiar morfologías de poliplex (Nguyen y col., 2000). No obstante, también existen ejemplos en los que se ha logrado con éxito una condensación de ADNp después de PEGilación de politaciones (Kwok y col., 1999). Davis y col. han desarrollado un nuevo método de poliplexos PEGilantes que contienen ciclodextrinas. La Figura 31 ilustra la metodología (Pun y Davis, 2002).

El componente modificador (ejemplos mostrados en la Figura 32) tiene un adamantano (AD) terminal para formar complejos de inclusión con ciclodextrinas superficiales, un segmento cargado, un segmento de PEG y un ligando

dirigido. Pun y Davis han demostrado que los modificadores decoran la superficie de las partículas y de este modo permiten crear partículas que: (i) son estables en condiciones salinas fisiológicas (Figuras 33 y 34) (Pun y Davis (2002)), (ii) pueden dirigirse a receptores de la superficie celular (Figura 35) y (iii) tienen la carga superficial y la cantidad de ligandos dirigidos recomendadas (Figura 36) (Pun y Davis, 2002).

5 Actualmente, la formulación de partículas estabilizadas se logra mezclando el polication y el modificador antes de añadirlos al ácido nucleico. El sistema completo se autoensambla espontáneamente en partículas de tamaños uniformes (el 100% del ácido nucleico está en las partículas) en cuestión de segundos una vez que los tres componentes están mezclados entre sí (véase la Figura 37), pudiéndose conseguir esta formulación con concentraciones de ADNp hasta 10 mg ADNp/ml.

10 El comportamiento fisicoquímico de las partículas de suministro genético se ha ensayado en modelos de fluidos biológicos. Como se ha mostrado más arriba, las partículas son estables en NaCl 150 mM. Adicionalmente se ha ensayado la estabilidad en presencia de sangre y componentes sanguíneos utilizando un ensayo de turbidez. Es decir, si se produce agregación, las entidades agregadas dispersan más luz que puede ser medida cuantitativamente. La Figura 38 ilustra este ensayo y muestra que, mientras que los políplexos no PEGilados forman agregaciones en medios de cultivo (a) o en suero bovino fetal 100% activo (FBS) (b), las partículas PEGiladas no lo hacen.

15 Se ha comprobado que existen lípidos catiónicos y polímeros que activan el sistema de complemento (Plank y col., 1996). La Figura 39 muestra que los policationes como PEI y CDP de hecho muestran una activación de complemento coherente con los datos proporcionados por Plank y col. (1996). Sin embargo, las partículas completamente formuladas (Tf-PEG-AD, AD-PEG, CDP y ADNp) no activan el complemento a las concentraciones utilizadas en animales, incluso cuando no se eliminan los componentes libres (Tf-PEG-AD, PEG-AD con contenido de transferrina, utilizándose la Tf para dirigirse a los tumores (Pun y col., 2004)).

Suministro sistémico de ácidos nucleicos en ratones

Galactosa dirigida a hígado con ARNsi

25 El ARNsi desnudo no es absorbido en células cultivadas, mientras que el material formulado con CDP (diámetro de partícula 50 nm, Figura 23b) entra esencialmente en todas las células (Figura 40). En nuestras investigaciones, el ARNsi desnudo no es estable en suero, mientras que las formulaciones de CDP proporcionan protección contra la degradación por nucleasas (hemos demostrado una protección de hasta 72 horas). Por consiguiente, las formulaciones CDP/ARNsi son estables en suero y suministran ARNsi al interior de las células.

30 En un estudio de hepatocitos diana en ratones, se utiliza la secuencia de ARNsi de Song y col. (2003) para reducir el gen FAS. Song y col. (2003) demostraron que una inyección hidrodinámica (~1 ml de solución inyectada rápidamente en la vena caudal) reducía los niveles de FAS ARNm. El método de inyección hidrodinámica es muy conocido para suministrar ácidos nucleicos a hepatocitos (Liu y col., 1999; Zhang y col., 1999; Yant y col., 2000), incluyendo ARNsi (McCaffrey y col., 2002; Lewis y col., 2002; Song y col., 2003). Los datos mostrados en la Figura 41 se obtuvieron mediante RT-PCR cuantitativa utilizando ratones BALB/c e inyecciones de 50 µg de ARNsi. De acuerdo con Song y col. 35 (2003), el método de inyección hidrodinámica (HPTV marcado) reducía los niveles de FAS ARNm, mientras que las inyecciones estándar de bajo volumen (200 µl) de ARNsi desnudo no lo hacían. Sin embargo, las partículas formuladas con CDP-im que contenían galatosa producían una reducción similar del FAS ARNm (utilizando una inyección estándar de bajo volumen (200 µl)) a la observada con el método HPTV.

Transferrina dirigida a tumores con ARNsi

40 Para facilitar el suministro de ácidos nucleicos a células cancerosas, en nuestro sistema de suministro se incorporó transferrina (Tf) como ligando dirigido (Bellocq y col., 2003a). Las superficies de las células malignas presentan niveles de receptores de transferrina (TfR) muy superiores a los de las células normales.

45 Se ha creado un modelo de tumor diseminado en ratones NOD/scid mediante inyecciones de células TC-71 en la vena caudal que habían sido previamente transducidas con un lentivirus para permitir la integración del gen de luciferasa (TC71-LUC). Las células TC-71 son células de sarcoma de Ewig que contienen un gen de fusión denominado BWS-FLI1 y tienen TfR en su superficie. Se sabe que el producto proteínico de este gen de fusión participa en la proliferación celular.

50 En primer lugar se ha comprobado que el ARNsi funcional se puede suministrar a tumores utilizando una inyección normal en la vena caudal. La Figura 43 muestra que se puede lograr una gran reducción de la señal de luciferasa mediante el suministro de ARNsi contra la luciferasa utilizando partículas que contienen Tf (reducción no observada en el caso del ARNsi desnudo). A continuación se ha comprobado que el suministro de ARNsi para EWS-FLI1 (resultados *in vitro* mostrados en la Figura 29) puede influir en el crecimiento tumoral (la secuencia es del laboratorio Rossi; Dohjima y col., 2003) bien en tumores establecidos (Figura 45), bien durante el establecimiento de los tumores (Figura 44) (inhibe completamente el crecimiento tumoral excepto en el cerebro; las partículas que contienen Tf no cruzan la barrera hematoencefálica (Pun y col., 2004)). Estos datos demuestran claramente que los vehículos de suministro permanecen 55 intactos con ligandos dirigidos en animales. Por último, los resultados de los análisis químicos de la sangre y la

patología de los órganos principales demuestran que el ARNsi es suministrado de forma segura sin provocar ninguna respuesta inmune (la IL-12 de suero y el interferón alfa no cambian) ni causar daños a los órganos principales.

5 Como muestra la Figura 43 (imagen superior), se tomaron imágenes por bioluminiscencia de ratones NOD/scid tratados dos veces por semana con ARNsi formulado durante cuatro semanas. Comenzando inmediatamente después de la inyección de células TC71-LUC, los ratones fueron tratados con formulaciones que contenían ARNsi dirigido a EWS-FLI1 (siEFBP2) o una secuencia de control no dirigida (siCON1) dos veces por semana durante cuatro semanas. La bioluminiscencia de estos ratones se controló dos veces por semana.

10 La figura 42 muestra como se formuló y dirigió el ARNsi dirigido a luciferasa (siGL3). Los componentes del sistema de suministro incluían: polimerización con contenido en ciclodextrina (CDP), que condensa el ARNsi y lo protege frente a la degradación por nucleasas; conjugado de adamantano-poli(etilenglicol) (AD-PEG), que estabiliza las partículas en fluidos fisiológicos a través de la formación de compuestos de inclusión; conjugado de AD-PEG-transferrina (AD-PEG-Tf), que proporciona a las partículas un ligando dirigido, promoviendo la absorción de éstas por células que sobreexpresan el receptor de transferrina (TfR) en la superficie celular. Ensamblaje de las partículas dirigidas y no dirigidas: en el caso de las partículas no dirigidas, el CDP y el AD-PEG se combinan y se añaden a ARNsi para producir poliplexos estables pero no dirigidos; en el caso de las partículas dirigidas, el CDP, el AD-PEG y el AD-PEG-Tf se combinan y se añaden a ARNsi para producir partículas dirigidas estables. Antes de añadirlo al ARNsi, el CDP se mezcló con un conjugado de AD-PEG₅₀₀ en una relación 1:1 AD:β-CD (mol:mol). Los poliplexos dirigidos también contenían AD-PEG modificado con transferrina (AD-PEG-Tf) en una relación 1:1000 AD-PET-Tf:AD-PEG (p:p). Después, esta mezcla se añadió a un volumen igual de ARNsi en una relación de cargas (cargas positivas del CDP con respecto a cargas negativas del esqueleto de ARNsi) de 3/1 (+/-). A los poliplexos resultantes se les añadió un volumen igual de glucosa al 10% (p/v) en agua para obtener una formulación de poliplex final con un 5% (p/v) de glucosa (D5W) adecuada para inyección.

25 El ARNsi formulado se administró mediante inyección a baja presión en la vena caudal (LPTV) dos días consecutivos (flechas negras) después de la inyección de células TC71-LUC. El flujo bioluminiscente integrado (fotones/segundo) se muestra en gráfico en función del tiempo después de la inyección de células. La expresión de luciferasa observada se redujo a ~8% de los valores previos al tratamiento (día 40) el día 43 (Figura 43). Los tumores de ratones tratados con los poliplexos formulados dirigidos con contenido de siGL3 mostraron una fuerte reducción (mayor del 90%) de la señal de luciferasa 2-3 días después de la inyección.

Referencias Citadas

- Amarzguioi, M., Holen, T., Babaie, E. y Prydz, H. (2003) Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res.* 31, 589-595.
- 5 Angus, S.P., Wheeler, L.J., Ranmal, S.A., Zhang, X., Markey, M.P., Matthews, C.K. y Knudsen, E.S. (2002). The retinoblastoma tumor suppressor targets dNTP metabolism to regulate DNA replication. *J. Biol. Chem.* 277, 44376-44384.
- Baenziger, J.U. y Maynard, Y. (1980) Human Hepatic Lectin - Physicochemical Properties and Specificity. *J. Biol. Chem.* 255, 4607-4613.
- 10 Bellocq, N.C., Pun, S.H., Jensen, G.S. y Davis, M.E. (2003a) Transferrin-Containing, Cyclodextrin Polymer-Based Particles for Tumor-Targeted Gene Delivery. *Bioconjugate Chem.* 14, 1122-1132.
- Bellocq, N.C., Davis, M.E., Engler, H., Jensen, G.S., Liu, A., Macherer, T., Maneval, D.C., Quijano, B., Schlupe, T. y Wen, S. (2003b). Transferrin-Targeted, Cyclodextrin Polycation-Based Gene Vector for Systemic Delivery. *Mol. Therapy* 3, 750.
- Bernstein, E., Denli, A.M. y Hannon, G.J. (2001) The rest is silence. *RNA* 7,1509-1521.
- 15 Caplen, N.J., Taylor, J.P., Statham, V.S., Tanaka, F., Fire, A. y Morgan, R.A. (2002) Rescue of polyglutaminemediated cytotoxicity by double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Hum. Mol. Genet.* 11, 175-184.
- Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q. y Hannon, G.J. (2002) The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Gene. Dev.* 16, 2733-2742.
- 20 Chen, S., Zhou, B., He, F. y Yen, Y. (2000) Inhibition of Human Cancer Cell Growth by Inducible Expression of Human Ribonucleotide Reductase Antisense cDNA. *Antisense Nucleic A.* 10, 111-116.
- Chiu, Y.-L. y Rana, T.M. (2002) RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol. Cell* 10, 549-561.
- Connolly, D.T., Townsend, R.R., Kawaguchi, K., Bell, W.R. y Lee, Y.C. (1982) Binding and Endocytosis of Cluster Glycosides by Rabbit Hepatocytes - Evidence for a Short-Circuit Pathway That Does Not Lead to Degradation. *J. Biol. Chem.* 257, 939-945.
- 25 Couzin, J. (2003) RNA interference. Mini RNA molecules shield mouse liver from hepatitis. *Science* 299, 995.
- Davis, M.E. y Brewster, M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present, future. *Nat. Rev. Drug Disc.* 3, 1023-1035 (2004).
- 30 Davis, M.E., Pun, S.H., Bellocq, N.C., Reineke, T.M., Popielarski, S.R., Mishra, S. y Heidel, J. (2004). Self-Assembling Nucleic Acid Delivery Vehicles via Linear, Water-Soluble, Cyclodextrin-Containing Polymers. *Curr. Med. Chem.* 11, 1241-1253.
- Dohjima, T., Lee, N.S., Li, H., Ohno, T. y Rossi, J.J. (2003). Small Interfering RNAs Expressed from a Pol III Promoter Suppress the EWS/Flt-1 Transcript in an Ewing Sarcoma Cell Line. *Mol. Ther.* 7, 811-816.
- 35 Duxbury, M.S., Ito, H., Zinner, J., Ashley, S.W. y Whang, E.E. (2004a) RNA interference targeting the M2 subunit of ribonucleotide reductase enhances pancreatic adenocarcinoma chemosensitivity to gemcitabine. *Oncogene* 23, 1539-1548.
- Duxbury, M.S., Ito, H., Benoit, B., Zinner, M.J., Ashley, S.W. y Whang, B.B. (2004b) Retrovirally mediated RNA interference targeting the M2 subunit of ribonucleotide reductase: A novel therapeutic strategy in pancreatic cancer. *Surgery* 136, 261-269.
- 40 Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. y Tuschl, T. (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. y Tuschl, T. (2001b) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20, 6877-6888.
- 45 Engstrom, Y., Eriksson, S., Jildevik, I., Skog, S., Thelander, L. y Tribukait, B. (1985) Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 260,9114-9116.
- Fadden, A.J., Holt, O.J. y Drickamer, K. (2003) Molecular characterization of the rat Kupffer cell glycoprotein receptor. *Glycobiology* 13, 529-537.

- Fan, H., Villegas, C., Huang, A. y Wright, J.A. (1998) The mammalian ribonucleotide reductase R2 component cooperates with a variety of oncogenes in mechanisms of cellular transformation. *Cancer Res.* 58,1650-1653.
- Fang, J., Sawa, T. y Maeda, H. (2003) Factors and mechanism of "EPR" effect and the enhanced antitumor of macromolecular drugs including SMANCS. *Adv. Exp. Med. Biol.* 519, 29-49.
- 5 Garret, S.W., Davies, O.R., Milroy, D.A., Wood, P.J., Pouton, C.W. y Threadgill, M.D. (2000). Synthesis and Characterisation of Polyamine-Poly(ethylene glycol) Constructs for DNA Binding and Gene Delivery. *Bioorg. Med. Chem.* 8, 1779-1797.
- Gerolami, R, Uch, R, Brechot, C., Mannoni, P. y Bagnis, C. (2003) Gene therapy of hepatocarcinoma: a long way from the concept to the therapeutical impact. *Cancer Gene Ther.* 10, 649-660.
- 10 Gonzalez, H., Hwang, S.J. y Davis, M.E. (1999). New Class of Polymers for the Delivery of Macromolecular Therapeutics. *Bioconj. Chem.* 10, 1068-1074.
- Guyton, A.C. (1981). *Medical Physiology*, 6th edition. W.B. Saunders Co. Hannon, G.J. y Rossi, J.J. (2004) Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 431, 371-378.
- 15 Harborth, J., Elbashir, S.M., Bechert, K., Tuschl, T. y Weber, K. (2001) Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J. Cell Sci.* 114, 4557-4565.
- Heale, B.S., Soifer, H.S., Bowers, C. y Rossi, J.J. (2005) siRNA target site secondary structure predictions using local stable substructures. *Nucleic Acids Res.* 33, e30.
- Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M.T., Babaie, E. y Prysz, H. (2002) Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res.* 30, 1757-1766.
- 20 Holen, T., Amarzguioui, M., Babaie, E. y Prydz, H. (2003) Similar behaviour of single-strand and double-strand siRNAs suggests they act through a common RNAi pathway. *Nucleic Acids Res.* 31, 2401-2407.
- Hu-Lieskovan, S., Heidel, J.D., Bartlett, D.W., Davis, M.E. y Triche, T.J. (2005) Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, non-viral delivery of siRNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res.*, Oct 1; 65(19):8984-92.
- 25 Gonzalez, H., Hwang, S.J. y Davis, M.E. (1999). New Class of Polymers for the Delivery of Macromolecular Therapeutics. *Bioconj. Chem.* 10, 1068-1074..
- Jensen, RA., Page, D.L. y Holt, J.T. (1994) Identification of genes expressed in premalignant breast disease by microscopy-directed cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9257-9261.
- 30 Jorgensen, K.E. y Moller, J.V. (1979) Use of flexible polymers as probes of glomerular pore-size. *Am. J. Physiol.* 236, F103-F111.
- Khvorova, A., Reynolds, A. y Jayasena, S.D. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-216.
- Kim, D.-H., Behlke, M.A., Rose, S.D., Chang, M.S., Choi, S.S. y Rossi, J.J. (2005) Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat. Biotech.* 23, 222-226.
- 35 Kircheis, R, Wightman, L., Schreiber, A., Robitza, B., Rössler, V., Kursu, M., y Wagner, E. (2001). Polyethylenimine/DNA Complexes Shielded by Transferrin Target Gene Expression to Tumors After Systemic Application. *Gene Ther.* 8, 28-40.
- Kitabwalla, M. y Ruprecht, R.M. (2002) RNA interference - a new weapon against HIV and beyond. *New Engl. J. Med* 347,1364-1367.
- 40 Kolatkar, A.R, Leung, A.K., Isecke, R, Brossmer, R, Drickamer, K. y Weis, W.I. (1998) Mechanism of N-acetylgalactosamine binding to a C-type animal lectin carbohydrate-recognition domain. *J. Biol. Chem.* 273,19502-19508.
- Kwoh, D.Y., Coffin, C.C., Lollo, C.P., Jovenal, J., Banaszczyk, M.G., Mullen, P., Phillips, A., Amini, A., Fabrycki, J., Bartholomew, RM., Brostoff, S.W. y Carlo, D.J. (1999). Stabilization of Poly L-Lysine/DNA Polyplexes for In Vivo Gene Delivery to the Liver. *Biochem. Biophys. Acta* 1444, 171-190.
- 45 Layzer, J.M., McCaffrey, A.P., Tanner, A.K., Huang, Z., Kay, M.A. y Sullenger, B.A. (2004) In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA* 10, 766-771.

- Lee, R.T. y Lee, Y.C. (1997) Facile synthesis of a high-affinity ligand for mammalian hepatic lectin containing three terminal N-acetylgalactosamine residues. *Bioconjugate Chem.* 8, 762-765.
- 5 Lee, Y.C., Townsend, R.R., Hardy, M.R., Lonngren, J., Arnap, J., Haraldsson, M. y Lonn, H. (1983) Binding of Synthetic Oligosaccharides to the Hepatic Gal Galnac Lectin - Dependence on Fine-Structural Features. *J. Biol. Chem.* 258, 199-202.
- Lee, Y., Vassilakos, A., Feng, N., Lam, V., Xie, H., Wang, M., Jin, H., Xiong, K., Liu, C., Wright, J. y Young, A. (2003) GTI-2040, an Antisense Agent Targeting the Small Subunit Component (R2) of Human Ribonucleotide Reductase, Shows Potent Antitumor Activity against a Variety of Tumors. *Cancer Res.* 63, 2802-2811.
- 10 Lewis, D.L., Hagstrom, J.E., Loomis, A.G., Wolff, J.A. y Herweijer, H. (2002). Efficient Delivery of siRNA for Inhibition of Gene Expression in Postnatal Mice. *Nat. Genet.* 32, 107-108.
- Lin, Z.P., Belcourt, M.F., Cory, J.G. y Sartorelli, A.C. (2004) Stable Suppression of the R2 Subunit of Ribonucleotide Reductase by R2-targeted Short Interference RNA Sensitizes p53(-/-) HCT-116 Colon Cancer Cells to DNA-damaging Agents and Ribonucleotide Reductase Inhibitors. *J. Biol. Chem.* 279, 27030-27038.
- 15 Liu, F., Song, Y. y Liu, D. (1999). Hydrodynamics-based Transfection in Animals by Systemic Administration of Plasmid DNA. *Gene Ther.* 6, 1258-1266.
- Liu, X., Zhou, B., Xue, L., Qiu, W., Shih, J., Zheng, S. y Yen, Y. (2004) Nuclear factor Y regulation and promoter transactivation of human ribonucleotide reductase subunit M2 gene in a Gemcitabine resistant KB clone. *Biochem. Pharm.* 67, 1499-1511.
- Martinez, M.A., Clotet, B. y Este, J.A. (2002) RNA interference of HIV replication. *Trends Immunol.* 23, 559-591.
- 20 Matre, D.A., Sinkjaer, T., Knardahl, S., Andersen, J.B., Arendt-Nielsen, L. y Duncan, R. (1999) Polymer conjugates for tumour targeting and intracytoplasmic delivery. The EPR effect as a common gateway? *Pharm. Sci. Technol. Today* 2, 441-449.
- McCaffrey, A.P., Meuse, L., Pham, T.-T.T., Conklin, D.S., Hannon, G.J. y Kay, M.A. (2002) RNA Interference in Adult Mice. *Nature* 418, 38-39.
- 25 Nguyen, H.-K., Lemieux, P., Vinogradov, S.V., Gebhart, C.L., Guerin, N., Paradis, G., Bronich, T.K., Alakhov, V.Y., Kabanov, A.V. (2000). Evaluation of Polyether-Polyethyleneimine Graft Copolymers as Gene Transfer Agents. *Gene Ther.* 7, 129-138.
- Nykanen, A., Haley, B., y Zamore, P.D. (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107, 309-321.
- 30 Orr, R.M. y Dorr, F.A. (2004) Clinical Studies of Antisense Oligonucleotides for Cancer Therapy. From *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 106: Antisense Therapeutics, Second Edition, M.I. Phillips, ed., Humana Press.
- Ozaki, K., Lee, R.T., Lee, Y.C. y Kawasaki, T. (1995) The Differences in Structural Specificity for Recognition and Binding between Asialoglycoprotein Receptors of Liver and Macrophages. *Glycoconjugate J.* 12, 268-274.
- 35 Popielarski, S. y Davis, M.E. (2005) A Nanoparticle-Based Model Delivery System to Guide the Rational Design of Gene Delivery to the Liver. In preparation.
- Plank, C., Mechtler, K., Szoka, F.C. y Wagner, B. (1996). Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: A potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum. Gene Ther.* 7, 1437-1446.
- Pun, S.H. y Davis, M.E. (2002). Development of a Non-Viral Gene Delivery Vehicle for Systemic Application. *Bioconjugate Chem.* 13, 630-639.
- 40 Pun, S.H., Bellocq, N.C., Cheng, J., Grubbs, B.H., Jensen, G.S., Davis, M.E., Tack, F., Brewster, M., Janicot, M., Janssens, B., Floren, W. y Bakker, A. (2004). Targeted Delivery of RNA-Cleaving DNA Enzyme (DNAzyme) to Tumor Tissue by Transferrin-Modified, Cyclodextrin-Based Particles. *Cancer Biol. Ther.* 3, 641-650.
- Putnam, D., Gentry, C.A., Pack, D.W. y Langer, R. (2001). Polymer-Based Gene Delivery with Low Cytotoxicity by a Unique Balance of Side-Chain Termini. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 1200-1205.
- 45 Randall, G. y Rice, C.M. (2001) Hepatitis C virus cell culture replication systems: their potential use for the development of antiviral therapies. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 14, 743-747.
- Reineke, T.M. y Davis, M.E. (2003a). Structural Effects of Carbohydrate-Containing Polycations on Gene Delivery. Parte 1: Carbohydrate Size and Its Distance from Charge Centers. *Bioconjugate Chem.* 14, 243-254.

Reineke, T.M. y Davis, M.E. (2003b). Structural Effects of Carbohydrate-Containing Polycations on Gene Delivery.

Parte 2: Charge Center Types. *Bioconjugate Chem.* 14, 255-261.

Rensen, P.C.N., Sliedregt, L.A.J.M., Ferns, M., Kieviet, E., van Rossenberg, S.M.W., van Berkel, T.J.C. y Biessen, E.A.I. (2001). Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Ligands by the Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes In Vitro and In Vivo. *J. Biol. Chem.* 276, 37577-37584.

Sagara, K. y Kim, S.W. (2002). A New Synthesis of Galactose-Poly(ethylene glycol)-Polyethylenimine for Gene Delivery to Hepatocytes. *J. Control. Rel.* 79, 271-281.

Sarkar, M., Liao, J., Kabat, E.A., Tanabe, T. y Ashwell, G. (1979) Binding-Site of Rabbit Hepatic Lectin. *J. Biol. Chem.* 254, 3170-3174.

10 Scherer, L.J. y Rossi, J.J. (2003a) Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat. Biotech.* 21, 1457-1465.

Scherer, L.J. y Rossi, J.J. (2003b) Recent Applications of RNAi in Mammalian Systems. In: During, H., ed., *Peptide Nucleic Acids, Morpholinos, and Related Antisense Biomolecules*, Landes Bioscience.

15 Scherr, M., Morgan, M.A. y Eder, M. (2003) Gene Silencing Mediated by Small Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Curr. Med. Chem.* 10, 245-256.

Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Haley, B. y Zamore, P.D. (2002) Evidence that siRNAs function as guides, not primers in the Drosophila and human RNAi pathways. *Mol. Cell* 10, 537-548.

Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. y Zamore, P.D. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.

20 Siolas, D., Lerner, C., Burchard, J., Ge, W., Linsley, P.S., Paddison, P.J., Hannon, G.J. y Cleary, M.A. (2005) Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat. Biotech.* 23, 227-231.

Song, E., Lee, S.K., Wang, J., Ince, N., Ouyang, N., Min, J., Chen, J., Shankar, P. y Lieberman, J. (2003). RNA Interference Targeting FAS Protects Mice from Fulminant Hepatitis. *Nat. Med.* 9, 347-351.

25 Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavine, G., Pandey, R.K., Racie, T., Rajeev, K.G., Röhl, I., Toudjarska, I., Wang, G., Wuschko, S., Bumcrot, D., Kotellansky, V., Limmer, S., Manoharan, M. y Vornlocher, H.-P. (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432, 173-178.

30 Tanaka, T., Shiramoto, S., Miyashita, M., Fujishima, Y. y Kaneo, Y. (2004) Tumor targeting based on the effect of enhanced permeability and retention (EPR) and the mechanism of receptor-mediated endocytosis (RME). *Int. J. Pharm.* 277, 39-61.

Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N. y Zamore, P.D. (2004) A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 306, 1377-1380.

35 Westerlind, U., Westman, J., Törnquist, Smith, C.I.E., Oscarson, S., Lahmann, M. y Norberg, T. (2004). Ligands of the asialoglycoprotein receptor for targeted gene delivery, parte 1: Synthesis of and binding studies with biotinylated cluster glycosides containing N-acetylgalactosamine. *Glycoconjugate J.* 21, 227-241.

Wilson, J.A., Jayasena, S., Khvorova, A., Sabatino, S., Rodrigue-Gervais, L.G., Arya, S., Sarangi, F., Harris-Brandts, M., Beaulieu, S. y Richardson, C.D. (2003) RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 100, 2783-2788.

40 Yant, S.R., Meuse, L., Chiu, W., Ivics, Z., Izsvak, Z. y Kay, M.A. (2000). Somatic Integration and Long-term Transgene Expression in Normal and Hemophilic Mice Using a DNA Transposon System. *Nat. Genet.* 25, 35-41.

Yen, Y. (2003) Ribonucleotide Reductase Subunit One as Gene Therapy Target. *Clin. Cancer Res.* 9, 4304-4308.

Zamore, P.D. (2001) RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat. Struct. Biol.* 8, 746-750.

Zhang, G.F., Budker, V. y Wolff, J.A. (1999). High Levels of Foreign Gene Expression in Hepatocytes after Tail Vein Injections of Naked Plasmid DNA. *Hum. Gene Ther.* 10, 1735-1737.

45 Zuber, G., Dauty, E., Nothisen, M., Belguise, P. y Behr, J.P. (2001). Towards Synthetic Viruses. *Adv. Drug Del. Rev.* 52, 245-253.

Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar utilizando simplemente una experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones de la invención específicas aquí descritas.

REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico que comprende:
 - (i) una primera cadena de 15 a 30 nucleótidos de longitud que comprende la SEQ ID NO 4; y
 - (ii) una segunda cadena de 15 a 30 nucleótidos de longitud;
- 5 donde al menos 12 nucleótidos de la primera y la segunda cadena son complementarios entre sí y forman un ácido nucleico bicatenario bajo condiciones fisiológicas y donde el ácido nucleico bicatenario puede reducir la expresión de una subunidad 2 (R2) de la ribonucleótido-reductasa en una célula mediante un mecanismo de ARN-interferencia.
2. Ácido nucleico según la reivindicación 1, caracterizado porque es un ARN bicatenario.
- 10 3. Ácido nucleico según la reivindicación 1, caracterizado porque es un ARN en horquilla.
4. Ácido nucleico según la reivindicación 3, caracterizado porque la región de bucle del ARN en horquilla tiene una longitud de 4 a 10 nucleótidos.
5. Ácido nucleico según la reivindicación 1, caracterizado porque la parte bicatenaria del ARN tiene una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos.
- 15 6. Ácido nucleico según la reivindicación 1, caracterizado porque la primera cadena es un ADN polinucleótido y la segunda cadena es un ARN polinucleótido.
7. Ácido nucleico según la reivindicación 1, caracterizado porque la primera y/o la segunda cadena comprenden además una región protuberante en el extremo 3', una región protuberante en el extremo 5' o regiones protuberantes tanto en el extremo 3' como en el extremo 5'.
- 20 8. Ácido nucleico según la reivindicación 7, caracterizado porque la región protuberante tiene de 1 a 10 nucleótidos de longitud.
9. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque el ácido nucleico comprende una o más fracciones con modificaciones de esqueleto o de bases.
- 25 10. Ácido nucleico según la reivindicación 9, caracterizado porque las fracciones con modificaciones de esqueleto o bases son una o más de las siguientes: alquifosfonatos, fosforotioatos, fosforoditioatos, alquifosfonotioatos, fosforoamidatos, ésteres fosfato, carbamatos, acetamidato, ésteres carboximetilo, carbonatos y triésteres fosfato.
11. Ácido nucleico según la reivindicación 10, caracterizado porque comprende al menos un ribonucleótido 2'-O-alquilado.
- 30 12. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, caracterizado porque la primera cadena comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en las SEQ ID NOs 7, 13, 15, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 y 43.
13. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, caracterizado porque la segunda cadena comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en las SEQ ID NOs 8, 14, 16, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 y 44.
- 35 14. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, caracterizado porque inhibe la expresión de R2 en células en un 50% o más cuando se pone en contacto con las células bajo condiciones fisiológicas a una concentración 10 nanomolar.
- 40 15. Molécula de ARNi aislada que comprende una secuencia que se hibrida en una región de un transcrito de R2 correspondiente a los nucleótidos 422-485 de la SEQ ID NO 1 bajo condiciones fisiológicas y reduce la expresión de la R2 en una célula.
16. Molécula de ARNi aislada según la reivindicación 15, caracterizada porque comprende una secuencia que se hibrida en una región de un transcrito de R2 correspondiente a los nucleótidos 432-475 de la SEQ ID NO 1.
- 45 17. Molécula de ARNi aislada según la reivindicación 15, caracterizada porque comprende una secuencia que se hibrida en una región de un transcrito de R2 correspondiente a los nucleótidos 437-470 de la SEQ ID NO 1.
18. Molécula de ARNi según cualquiera de las reivindicaciones 15-17, caracterizada porque comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos que son complementarios a una de dichas regiones de R2.

19. Molécula de ARNi según la reivindicación 18, caracterizada porque tiene una longitud de aproximadamente 14 a aproximadamente 50 nucleótidos.
20. Molécula de ARNi según la reivindicación 19, caracterizada porque es una molécula de ARNi monocatenaria.
21. Molécula de ARNi según la reivindicación 19, caracterizada porque es una molécula de ARNi bicatenaria.
- 5 22. Molécula de ARNi según cualquiera de las reivindicaciones 15-20, caracterizada porque es una molécula de ARN que opcionalmente comprende una o más fracciones con modificaciones de esqueleto o de bases.
23. Molécula de ARNi según cualquiera de las reivindicaciones 15-20, caracterizada porque comprende una cadena de ADN y una cadena de ARN y opcionalmente una o más fracciones con modificaciones de esqueleto o de bases.
- 10 24. Molécula de ARNi según cualquiera de las reivindicaciones 15-23, caracterizada porque es una molécula de ARN en horquilla que opcionalmente comprende una o más fracciones con modificaciones de esqueleto o de bases.
25. Molécula de ARNi según la reivindicación 24, caracterizada porque la parte dúplex de la molécula de ARNi tiene una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos.
- 15 26. Molécula de ARNi según la reivindicación 25, caracterizada porque la molécula de ARNi comprende la SEQ ID NO 4, opcionalmente incluyendo una o más fracciones con modificaciones de esqueleto o de bases.
27. Molécula de ARNi según la reivindicación 26, caracterizada porque la molécula de ARNi comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en las SEQ ID NOs 7, 8, 13-16 y 25-44, opcionalmente incluyendo una o más fracciones con modificaciones de esqueleto o de bases.
- 20 28. Molécula de ARNi según la reivindicación 27, caracterizada porque comprende al menos un enlace internucleotídico seleccionado de entre el grupo consistente en alquifosfonatos, fosforotioatos, fosforoditioatos, alquifosfonotioatos, fosforoamidatos, ésteres fosfato, carbamatos, acetamidato, ésteres carboximetilo, carbonatos y triésteres fosfato.
- 25 29. Molécula de ARNi según la reivindicación 28, caracterizada porque comprende al menos un ribonucleótido 2'-O-alquilado.
30. Molécula de ARNi según cualquiera de las reivindicaciones 15-29, caracterizada porque inhibe la expresión de R2 en las células en un 50% o más cuando se pone en contacto con las células bajo condiciones fisiológicas a una concentración 10 nanomolar.
- 30 31. Composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico o la molécula de ARNi según cualquiera de las reivindicaciones 1-30 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
32. Composición farmacéutica según la reivindicación 31, caracterizada porque el vehículo farmacéuticamente aceptable incluye un polímero catiónico.
33. Composición farmacéutica según la reivindicación 32, caracterizada porque el vehículo farmacéuticamente aceptable incluye un polímero de ciclodextrina.
- 35 34. Composición farmacéutica según la reivindicación 33, caracterizada porque la estructura de la ciclodextrina es CDP-im tal como se ilustra en la Figura 27.
35. Composición farmacéutica según la reivindicación 34, caracterizada porque comprende una partícula que incluye un polímero de ciclodextrina y el ácido nucleico o la molécula de ARNi según cualquiera de las reivindicaciones 1-30 y está PEGilada.
- 40 36. Composición farmacéutica según la reivindicación 35, caracterizada porque la partícula comprende además adamantano.
37. Composición farmacéutica según la reivindicación 36, caracterizada porque adicionalmente comprende un ligando dirigido a un tipo de tejido o célula particular.
38. Composición farmacéutica según la reivindicación 37, caracterizada porque el ligando comprende galactosa.
- 45 39. Composición farmacéutica según la reivindicación 38 que comprende nanopartículas, caracterizada porque las nanopartículas tienen un diámetro de 10 a 100 nm.
40. Composición farmacéutica según la reivindicación 39, caracterizada porque las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 50 a 70 nm.

41. Composición farmacéutica según la reivindicación 40, caracterizada porque las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 50 nm.
42. Composición farmacéutica según la reivindicación 31, caracterizada porque el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende:
- 5 un polímero catiónico que contiene ciclodextrina modificado con imidazol, y una fracción dirigida que comprende adamantano-PEG-ligando, formando el polímero y la fracción dirigida nanopartículas que encapsulan el ácido nucleico.
43. Composición farmacéutica según la reivindicación 42, caracterizada porque las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 50 a 120 nm.
- 10 44. Composición farmacéutica según la reivindicación 42, caracterizada porque las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 50 a 100 nm.
45. Composición farmacéutica según la reivindicación 42, caracterizada porque las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 50 a 70 nm.
- 15 46. Composición farmacéutica según la reivindicación 45, caracterizada porque las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 50 nm.
47. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 42-46, caracterizada porque el ligando dirigido comprende galactosa.
48. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 42-46, caracterizada porque el ligando dirigido comprende transferrina.
- 20 49. Utilización del ácido nucleico o la molécula de ARNi según cualquiera de las reivindicaciones 1-30 en la producción de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o afección asociada a una proliferación celular no deseada.
50. Utilización según la reivindicación 49, caracterizada porque las células son células cancerosas o tumorales.
51. Utilización según la reivindicación 49, caracterizada porque las células son células patógenas.
- 25 52. Utilización según la reivindicación 49, caracterizada porque las células son células normales cuya proliferación no deseada conduce a una enfermedad o afección.
53. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 49-52, caracterizada porque el ácido nucleico o la molécula de ARNi se formula con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 54. Utilización según la reivindicación 53, caracterizada porque el ácido nucleico o la molécula de ARNi se formula con un ligando dirigido a células cancerosas.
55. Utilización según la reivindicación 54, caracterizada porque el ligando es transferrina.
56. Utilización según la reivindicación 54, caracterizada porque la célula cancerosa es un hepatocito y el ligando comprende galactosa.
- 35 57. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 49-56, caracterizada porque el ácido nucleico o la molécula de ARNi se formula como un componente de una nanopartícula polimérica.
58. Utilización según la reivindicación 57, caracterizada porque la nanopartícula tiene un diámetro de 10 a 120 nm.
59. Utilización según la reivindicación 57, caracterizada porque la nanopartícula tiene un diámetro de 50 a 120 nm.
60. Utilización según la reivindicación 57, caracterizada porque la nanopartícula tiene un diámetro de 50 a 100 nm.
61. Utilización según la reivindicación 57, caracterizada porque la nanopartícula tiene un diámetro de 50 nm.
- 40 62. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 59-61, caracterizada porque dicho medicamento se administra de forma sistémica.
63. Utilización según la reivindicación 62, caracterizada porque dicho medicamento se administra por administración arterial intrahepática.
64. Utilización según la reivindicación 63, caracterizada porque el cáncer es cáncer de hígado.

- 5
65. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 49-64, caracterizada porque la célula cancerosa expresa un mayor nivel de R2 en comparación con una célula no cancerosa de un tejido comparable.
66. Utilización según la reivindicación 65, caracterizada porque adicionalmente incluye al menos un agente quimioterapéutico adicional contra el cáncer que inhibe células cancerosas de forma aditiva o sinérgica con el ácido nucleico o la molécula de ARNi.
67. Utilización según la reivindicación 66, caracterizada porque el agente quimioterapéutico es fluorouracilo (5FU).
68. Composición farmacéutica de suministro específico al hígado, que comprende:
un agente terapéutico hepático, y
un vehículo de suministro que comprende (i) un polímero catiónico conteniendo ciclodextrina modificado con imidazol, y (ii) una fracción dirigida que comprende adamantano-PEG-ligando,
10 formando el polímero y la fracción dirigida nanopartículas que encapsulan el ácido nucleico.

A

TTAGAAGTCCCAGTCGGTGTCCGGTGGTGGGTTGGTGGGTGCCCATTAOGTATGAGCTTCGGGAGCCGG
 AGAAAAAGTCGTGGTTCTCCCTGCACCGGGGTCGAGAGCTGGCGCACGGGCGGGTTCACTGGCAG
 GTGTACAGATCGAATGCAGGCTGGTATCCAGGTTGGCTAGCGCCTTGTGGGGTTGTAAGGCATGTA
 GGGCAAACGTCGTGGTCCAGCCAACTOGTCGTACAAGTCGTGGCAGTATGTCGATCTCGTTCGCGT
 AGAGCGTGTGCAGCAGCTGCGAGGTGTATTGCGGTGGTCCGGCCGCTCGGGGTCGGTCAGGTCCGGCC
 AAACCTCGTTGACATTTGTAGCCGATGTAGTAGCCGTGGACGGCTTCATCTCGGATGATCAGCCGGAT
 CAGATCGGCGGTGTTGGTGAGCTTACCCCGCAGCAGACAGTACATGGGCAGGTAGAAGCCGGAGTAGA
 ACAGGAAGGACTCCAGCATTACCGAOGATGCTTTGOGCTTGAGCCGGTCGTCACCGCGGTAGTAGTGG
 ACGATGATCTGGCTTTTCGCTGCAGGTAAGGGTCTGTTCGACAGTTCGAAGGCATCGTCGATCTG
 CTTGGTCGAGCACAGGGTCGAGAAGATCGAGCTGTAGCTCTTGGCGTGCACTGACTCCATGAACGGCA
 TGTTGGTCAGGACCGCTCTTCGTGGGGGGTGACCGGTCGTCGATCATGGCCACTGCTCCACCCGTC
 GCCTGCGCGGTGTGAGCAGGGTCAAGCCGGTGAACACCCGGATCGTCGCTPGCTGCTCGGTGGAACT
 CAACGTTTGCCAAGATGCCAGGTGCTTGGAGAGCGGAATCTTTTCGGGCAACCAAAGTTACCGGTCA
 AACGTTCCAGACCTGCAAATCTTTAGCATCGAGCAACCGGTTCCAATTGATTGCGTGACCGCGCTCA
 ACGAGCTTGCCGGTCAT

B

ATGTCCAAGTTGTTGTACGTGCGTGATCATGAGGGCTTTGCCCTGCCCTAACGGTGGAAAACCACGGCAA
 CCGCTGGTTCCGGCTCACATGTCTCACCAAGGACTGCGGGTGTCTCAAGCTACTCAATGAGAGGG
 ACTTGGAGTTTACAAGTTCCTCTTTACGTTCCCTGGCCATGGCCGAGAAGCTTGTGAACCTTAACATT
 GATGAACTGGTCACCAGCTTCGAGAGCCACGACATTGATCACTACTACACCGAGCAGAAGGCCATGGGA
 GAACGTCCACGGGGAGACTTATGCTAACATTTTAAACATGCTCTTTGATGGGGACAGGGCGGGGATGA
 ACGCCTACGCAGAGGCCATCATGGCCGACGAGGCCCTGCAAGCCAAGATTTCCCTGGCTCCGTGACAAG
 GTGGCGGCGCCGTCACCTGCGGAGAGAAGATTCTTGTGTTCCCTGCTGATTGAAGGCATCTTCTTCAT
 TAGCTCCTTCTACAGCATAGCCCTGCTGCGGGTCCGGGGCTAATGCCCTGGCATCTGCCCTGGCCAATA
 ACTACATAAGTAGGGATGAGCTGCTCCACACCCGCGCTGCCCTCCCTGTTATACAAATAGCATGACAGCC
 AAGGCTGACCGACCAAGGGCCACTGGATCCAGGAGCTGTTTGGCACTGCGGTGGAGGTAGAGACTGC
 CTTTCATCGAGGCTCGTGGAGAGGGGTTACCTTGGTGGATGTGGAGCCATAAAGCAGTTTCTGGAGG
 CCACGGCCGATCGCATCCGCGTGACATTGGTCAGGCTCCCTTGTATGGCACACCACCCCCCAAGGAC
 TGCCCGCTCACCTACATGACTAGCATCAAGCAAACATAATTTCTTTGAGCAAGAGAGTTCCGATTACAC
 CATGCTGGTGGTAGATGACCTTGA

FIGURA 2

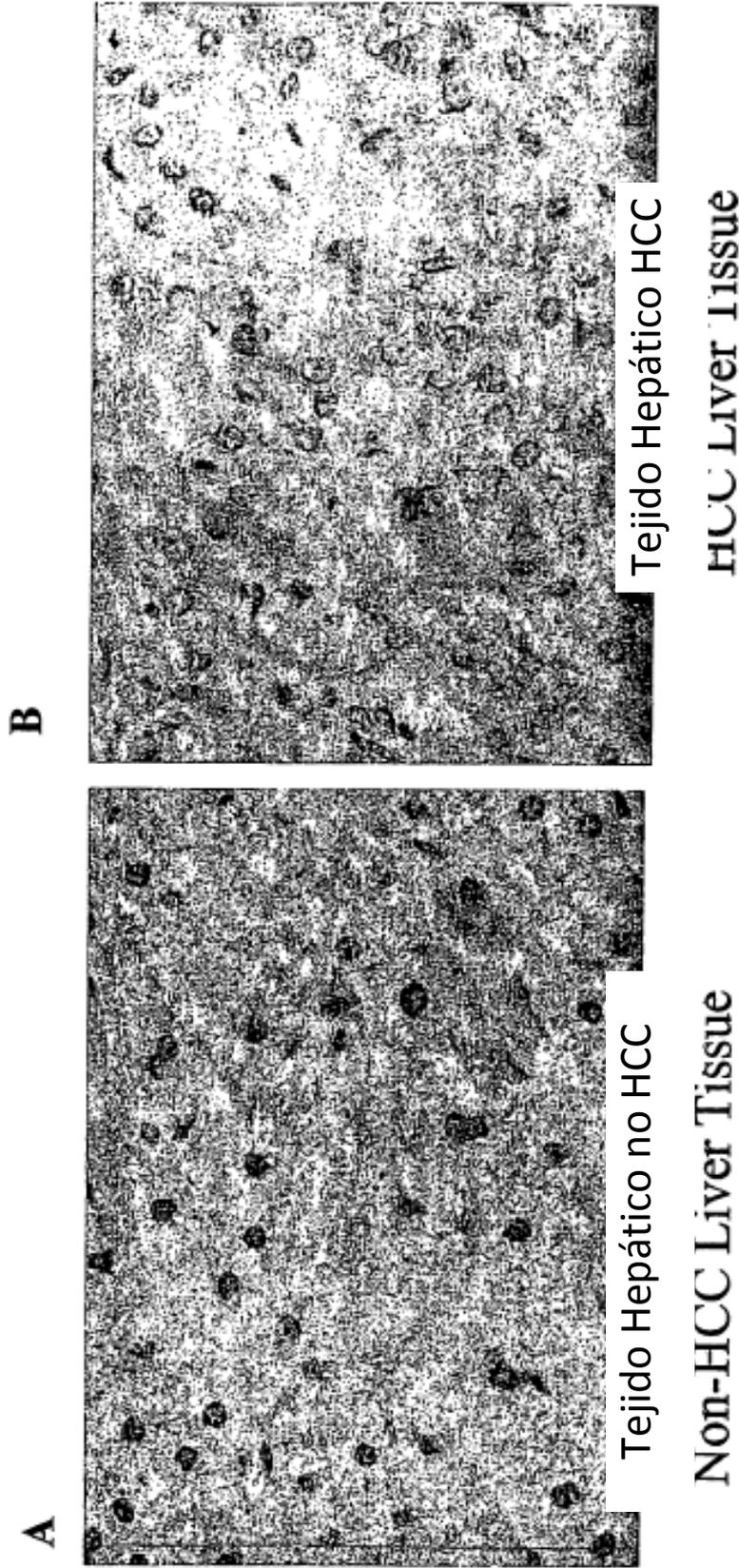


FIGURA 3

FIGURE 3



FIGURA 4

FIGURE 4

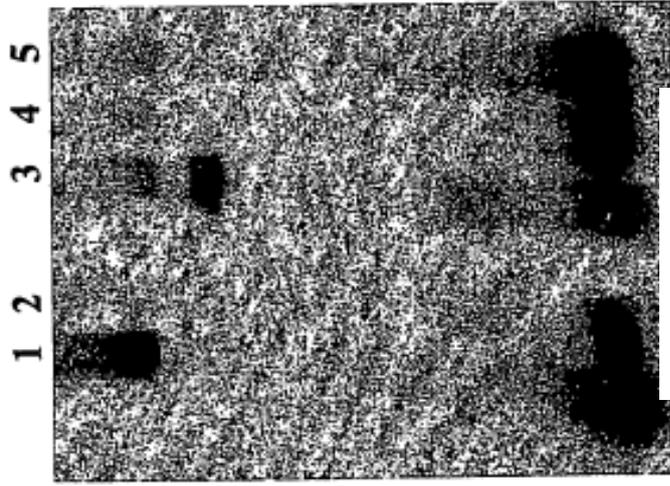


FIGURA 5

FIGURE 5

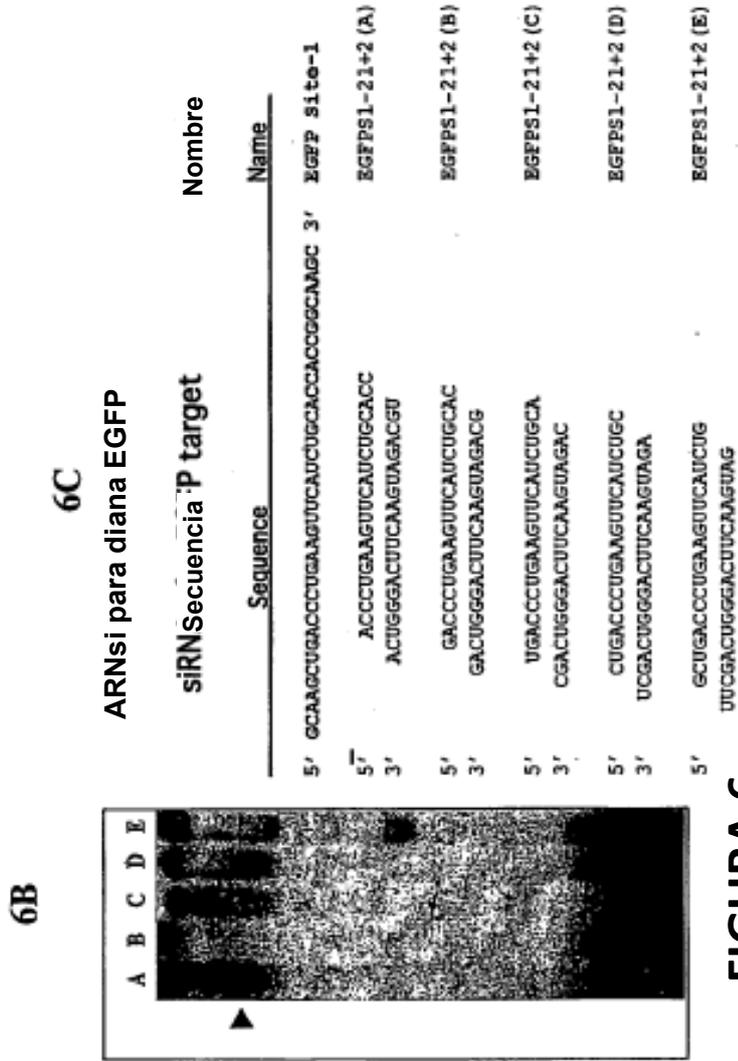
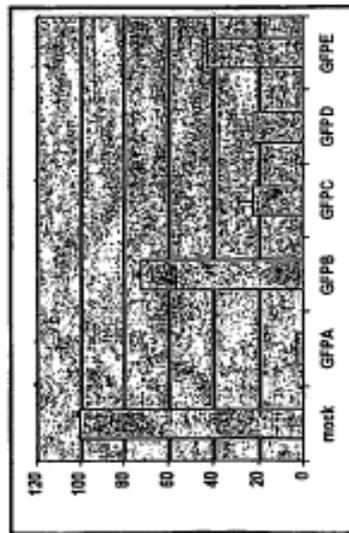


FIGURA 6

FIGURE 6



Nivel de Proteína hRRM2
(48 h después de transfección; Western blot)

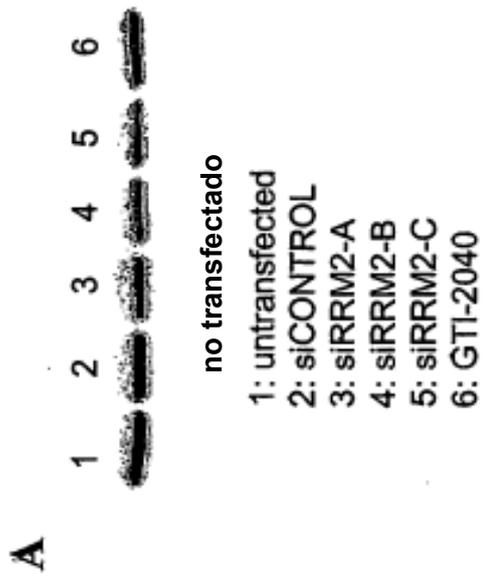
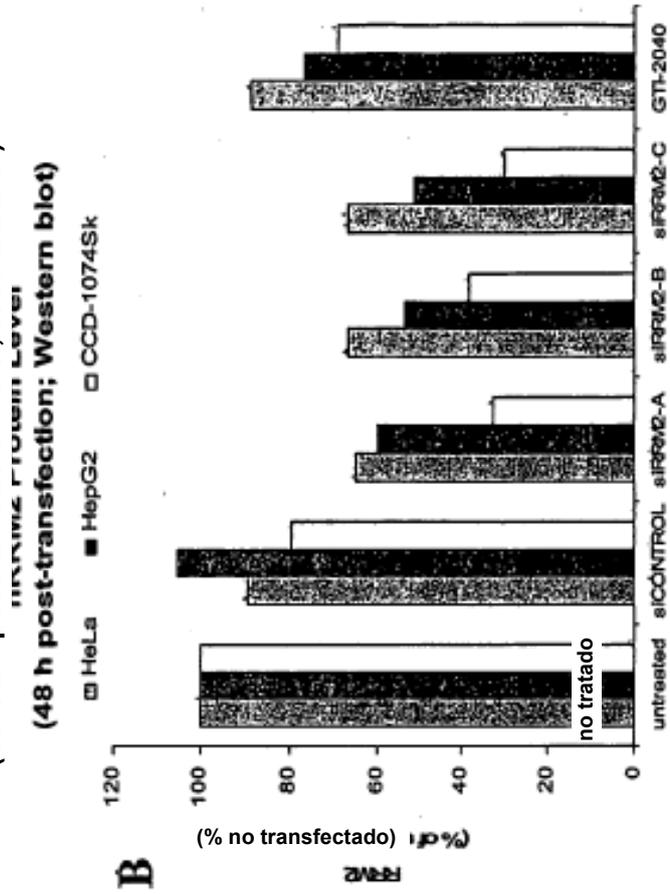


FIGURA 7
FIGURE 7

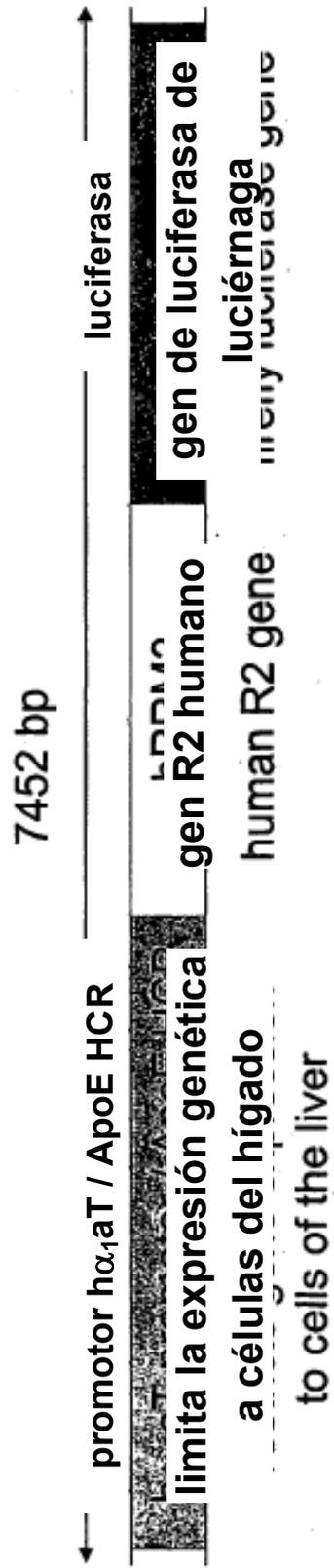


FIGURA 8

FIGURE 8

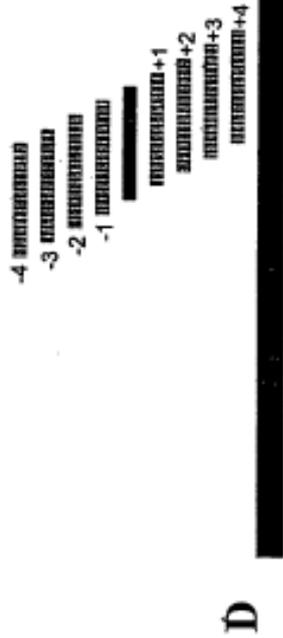
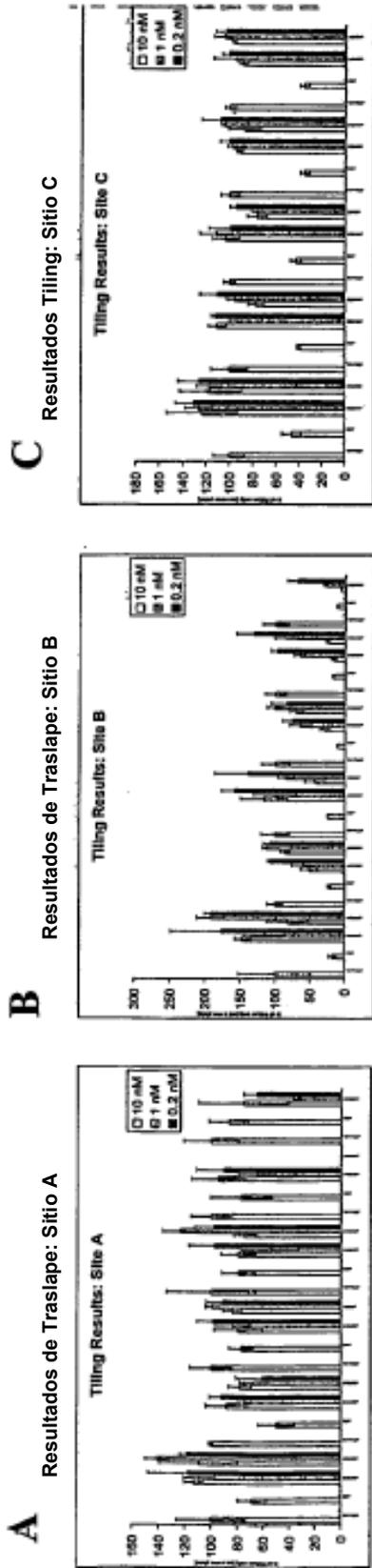


FIGURA 9

FIGURE 9

Reducción de pR2Luc Co-suministrado en Células HepG2
(48 h después de la transfección), 10 nM
in HepG2 Cells (48 h post-transfection), 10 nM

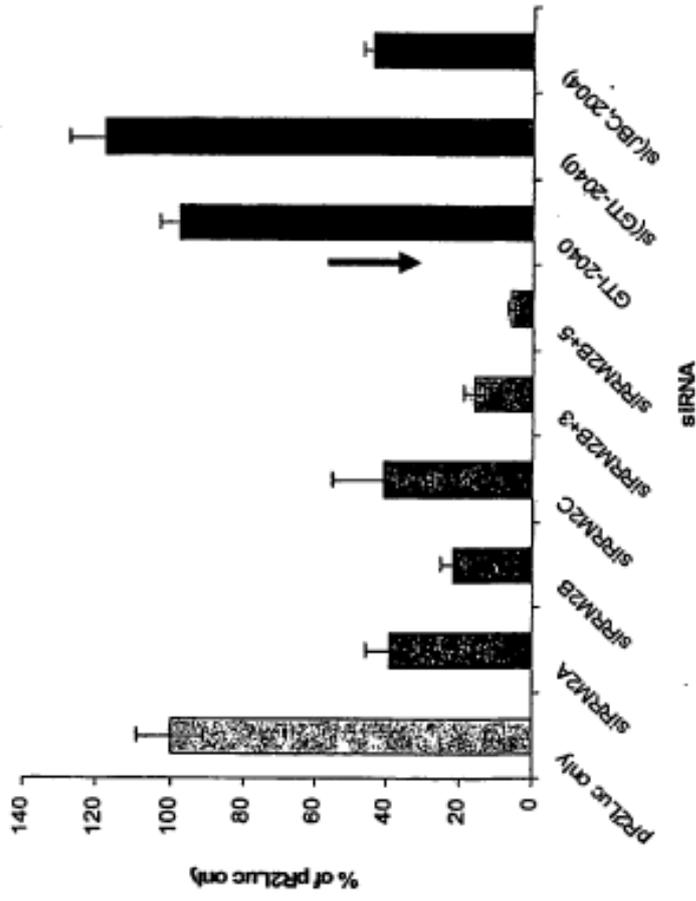


FIGURA 10

FIGURE 10

**Sub-regulación de pR2Luc co-suministrado en
Células HepG2 (48 h después de transfección)
in HepG2 Cells (48 h post-transfection)**

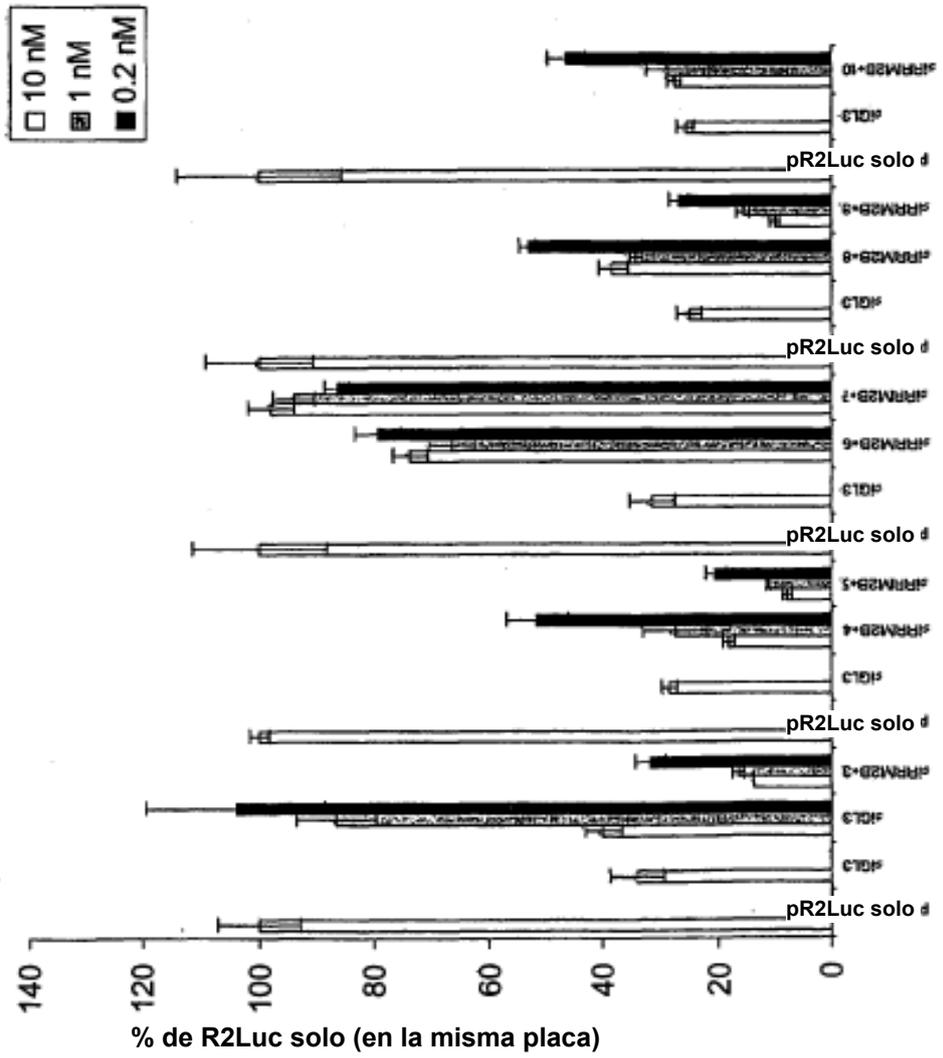


FIGURA 11
FIGURE 11

Sub-regulación de pR2Luc co-suministrado
 en Células HepG2 (48 h después de la transfección)
 Down-Regulation of Co-Delivered pR2Luc
 in HepG2 Cells (48 h post-transfection)

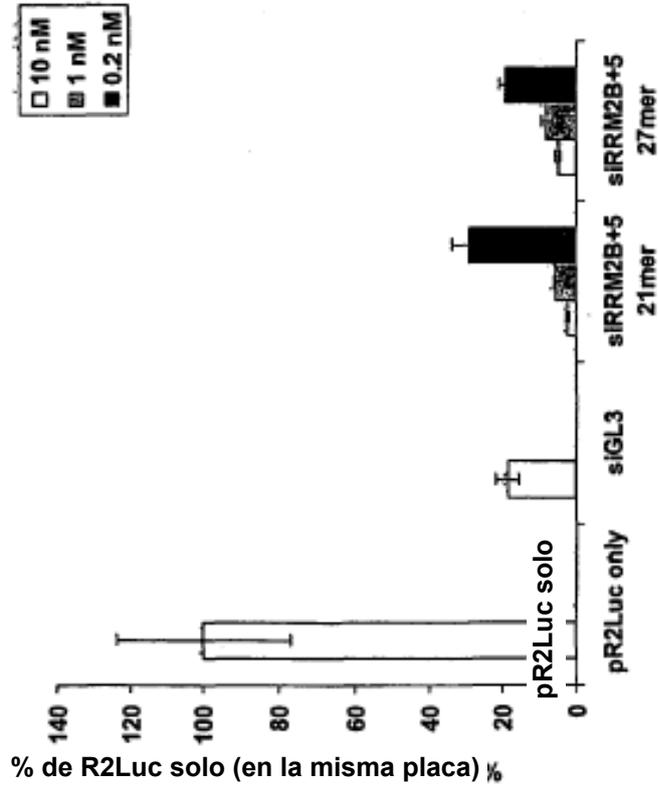


FIGURA 12

FIGURE 12

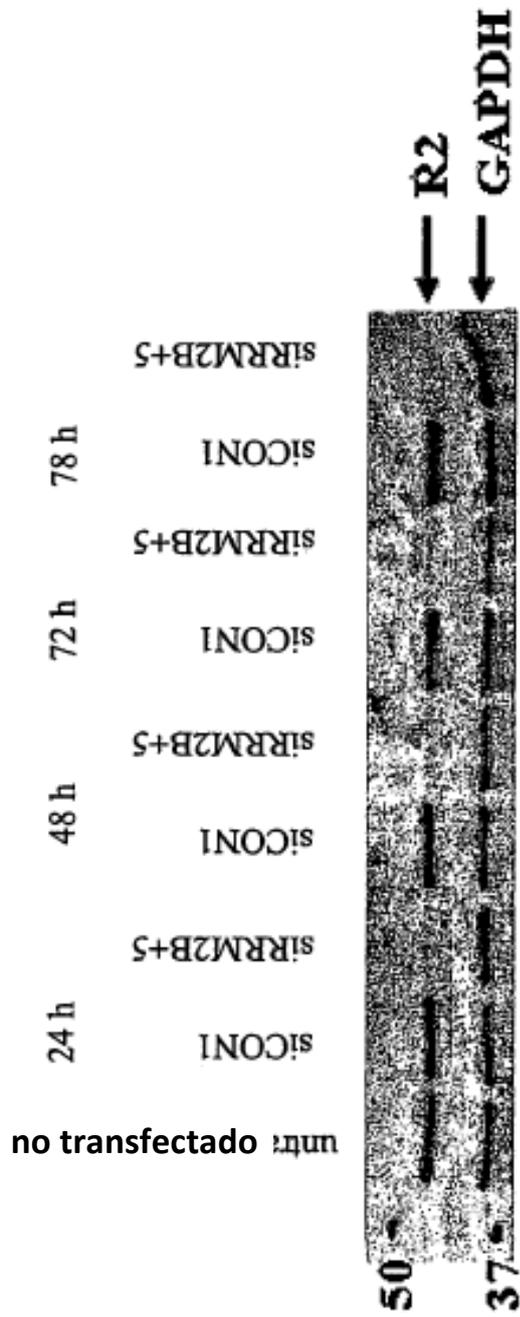


FIGURA 13
FIGURE 13

Inducción de Apoptosis mediante ARNs en Células HepG2
(en función del tiempo después de la transfección)

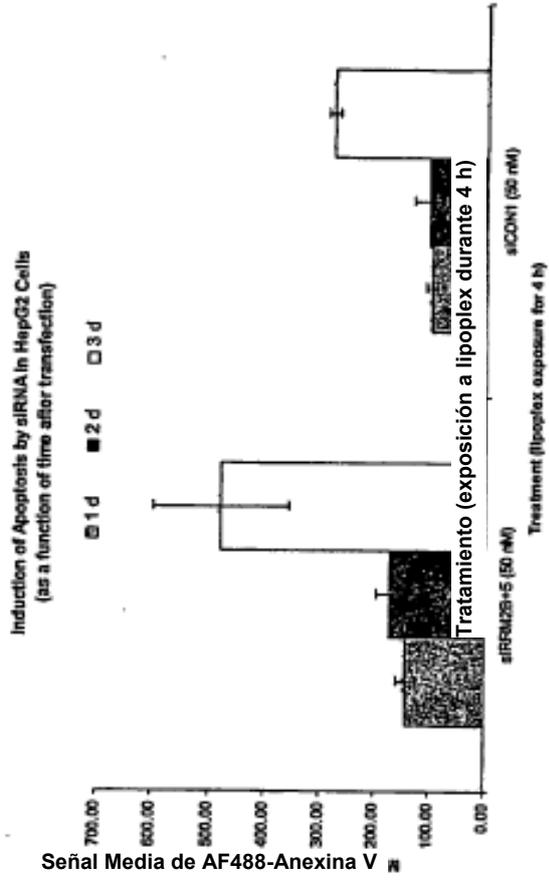


FIGURA 14

FIGURE 14

El ARNsi Contra la R2 Aumenta la Apoptosis Inducida por Adriamicina de Células HepG2

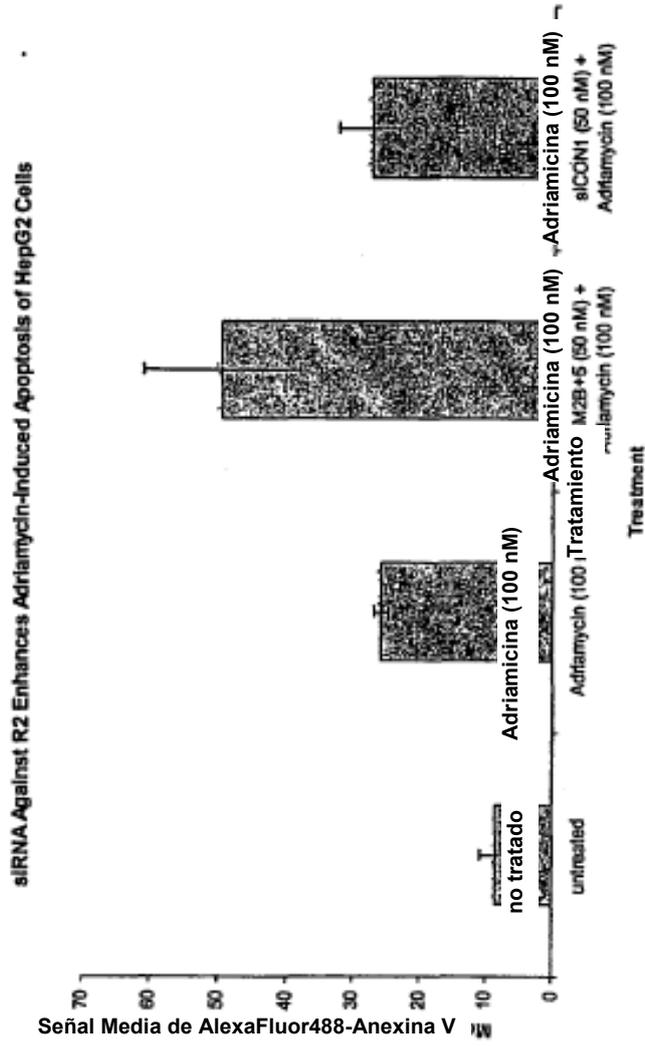


FIGURA 15
FIGURE 15

Imágenes tomadas 2 d después de la inyección
(todas a la misma escala)

pR2Luc solo **ten 2 d post-injection (all at same scale)**



B

Inyecciones HPTV en Ratones BALB/c Hembra
con pR2Luc (0,25 mg/kg) y ARNsi (1,25 mg/kg)

HPTV injections of Female BALB/c Mice with
pR2Luc (0.25 mg/kg) and siRNA (1.25 mg/kg)

■ 2 d ■ 6 d
□ 11 d □ 17 d



A

Bioluminiscencia Integrada
(% de pR2Luc medio en cada ocasión)

FIGURA 16

FIGURE 16

Ensayo de Formación de Colonias:
 Células Hep3B: ARNsi de Control (siCON1) frente a ARNsi contra la R2 (siR2B+5)

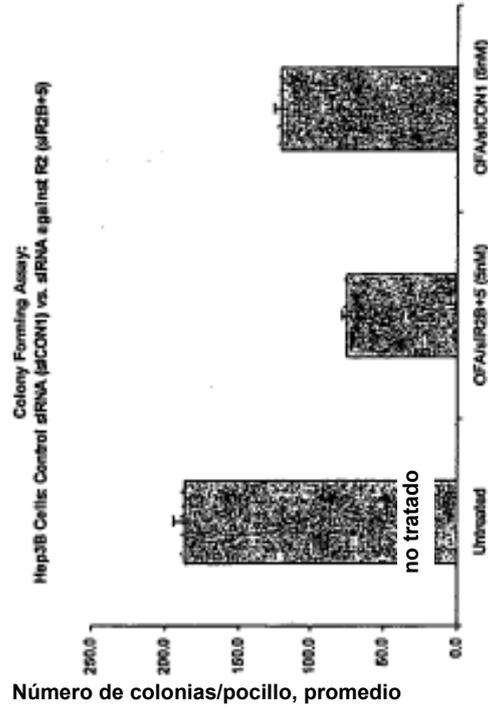


FIGURA 17

FIGURE 17

Ensayo de Formación de Colonias:
 Células Hep3B: Diversos ARNsi Contra la R2

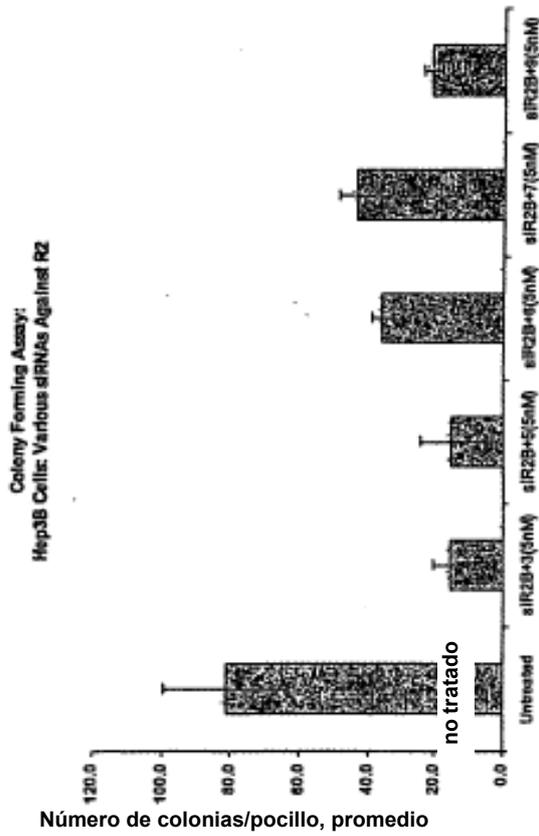


FIGURA 18

FIGURE 18

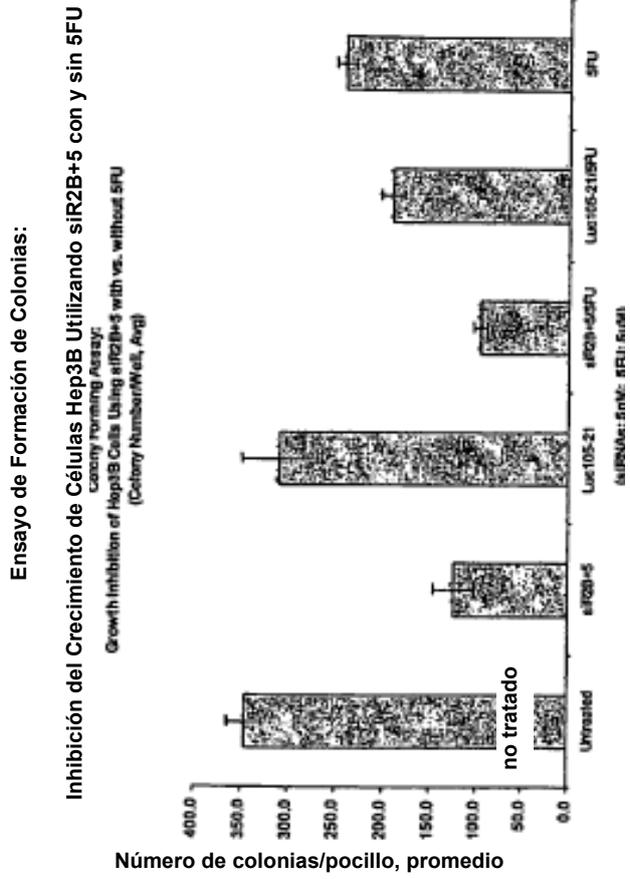


FIGURA 19

FIGURE 19

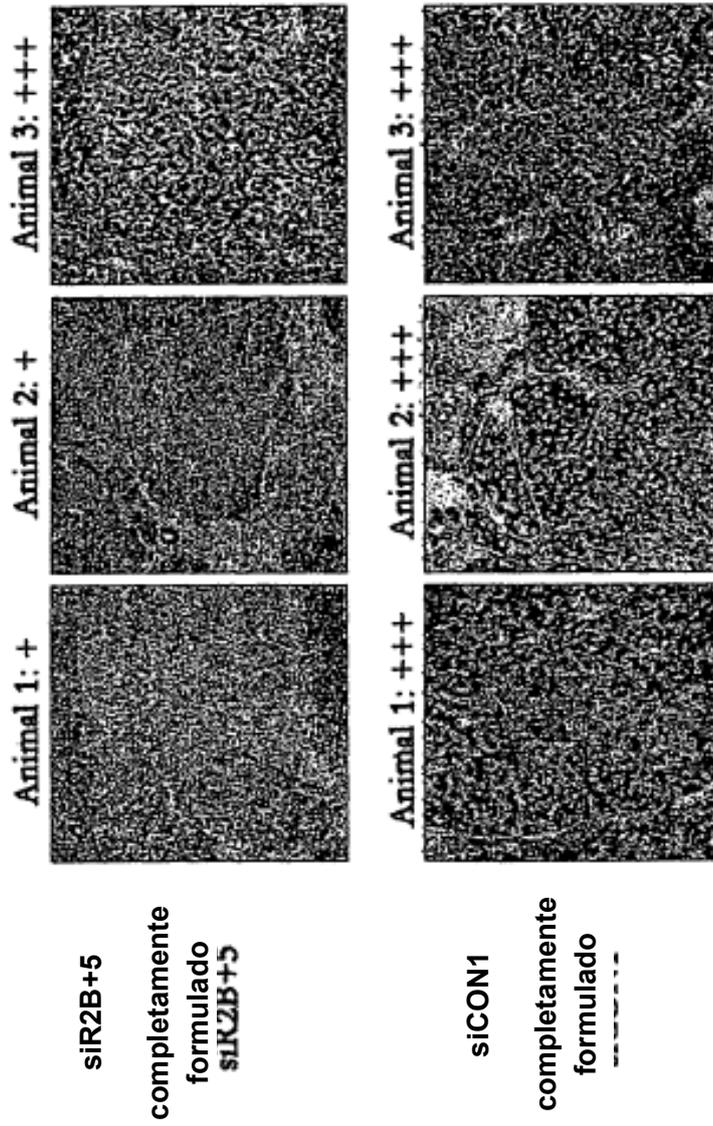


FIGURA 20
FIGURE 20

Cuantificación de los Niveles de la Proteína R2 en Células de Hepatoma de Rata Transfectado (McA-RH7777) mediante Western Blot

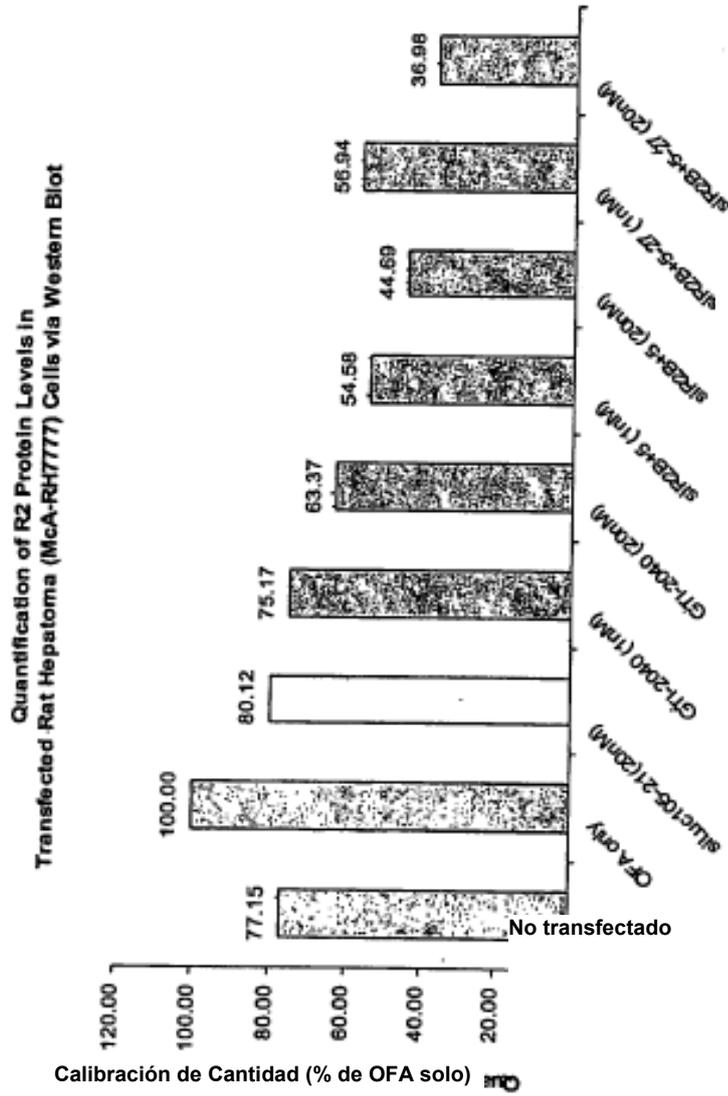


FIGURA 21

FIGURE 21

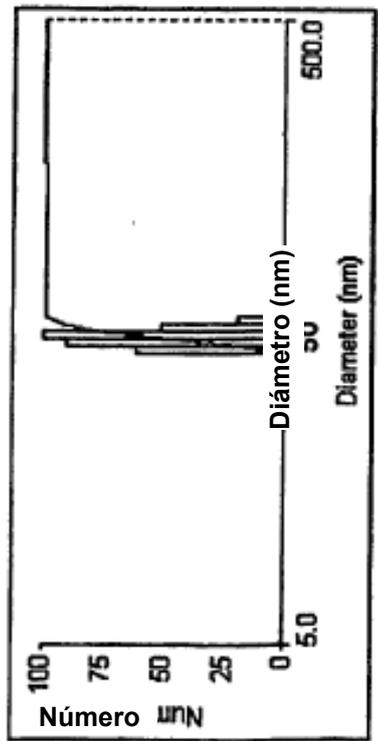
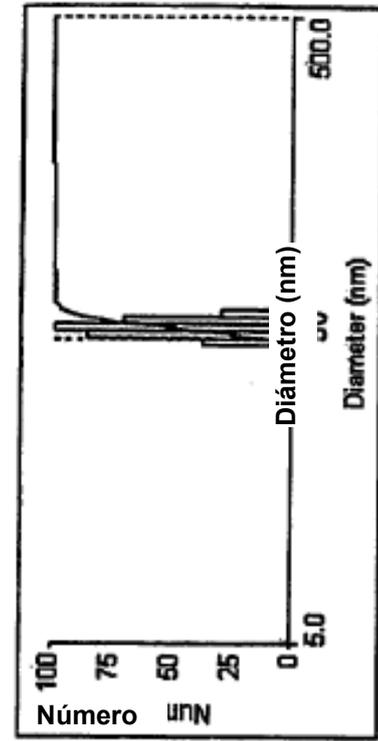


FIGURA 23

FIGURE 23

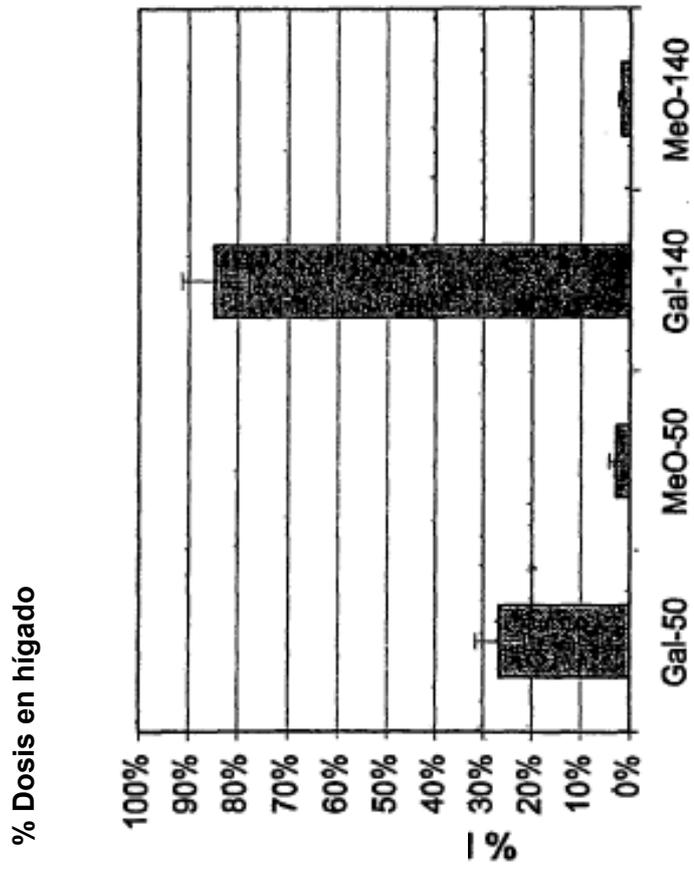


FIGURA 24

FIGURE 24



B



A

FIGURA 25

FIGURE 25

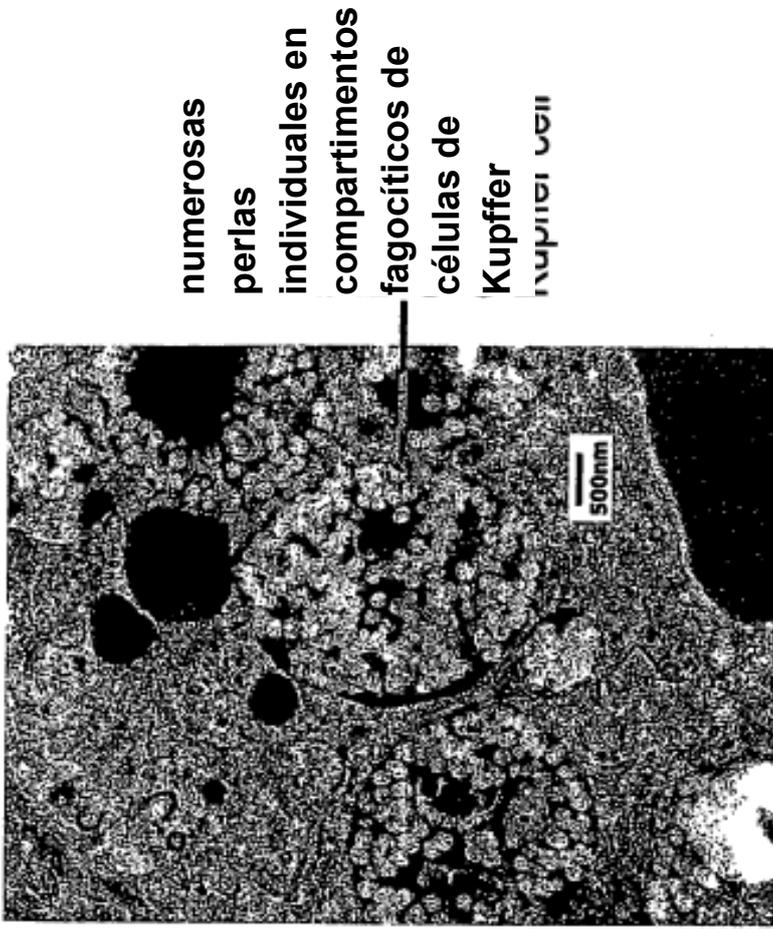


FIGURA 26

FIGURE 26

Toxicidad con Células BHK-21

Toxicity with BHK-21 Cells

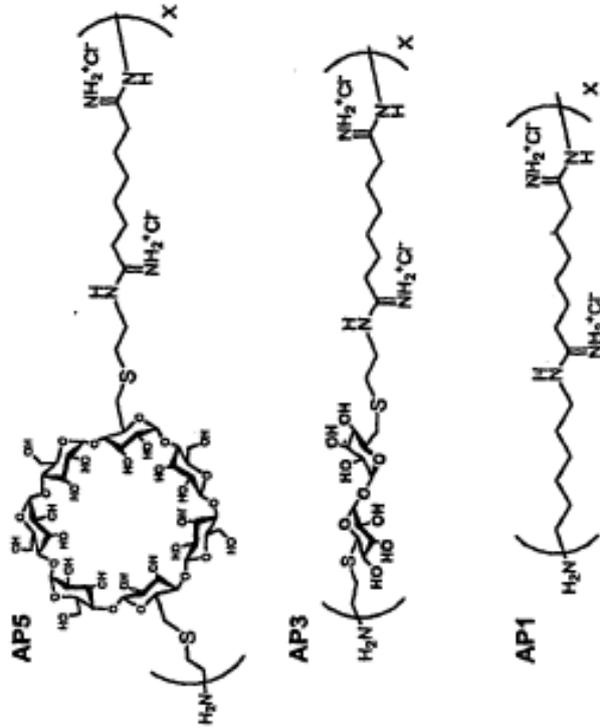
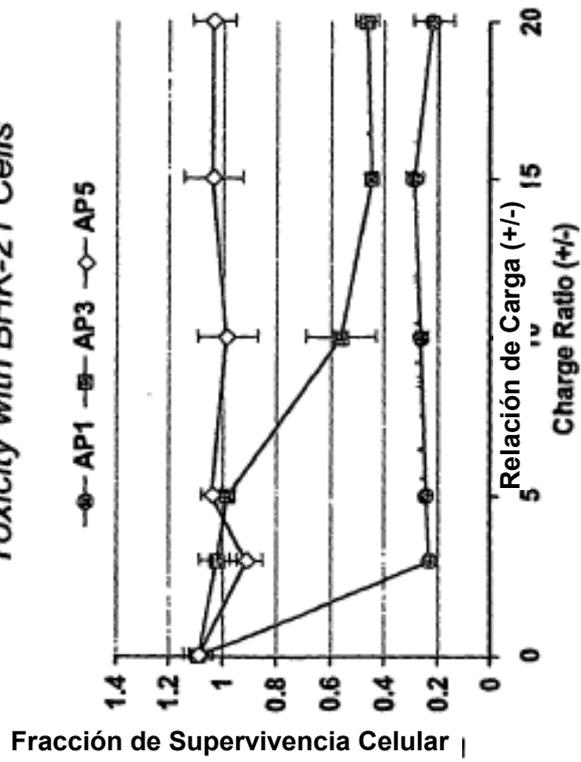


FIGURA 28
FIGURE 28

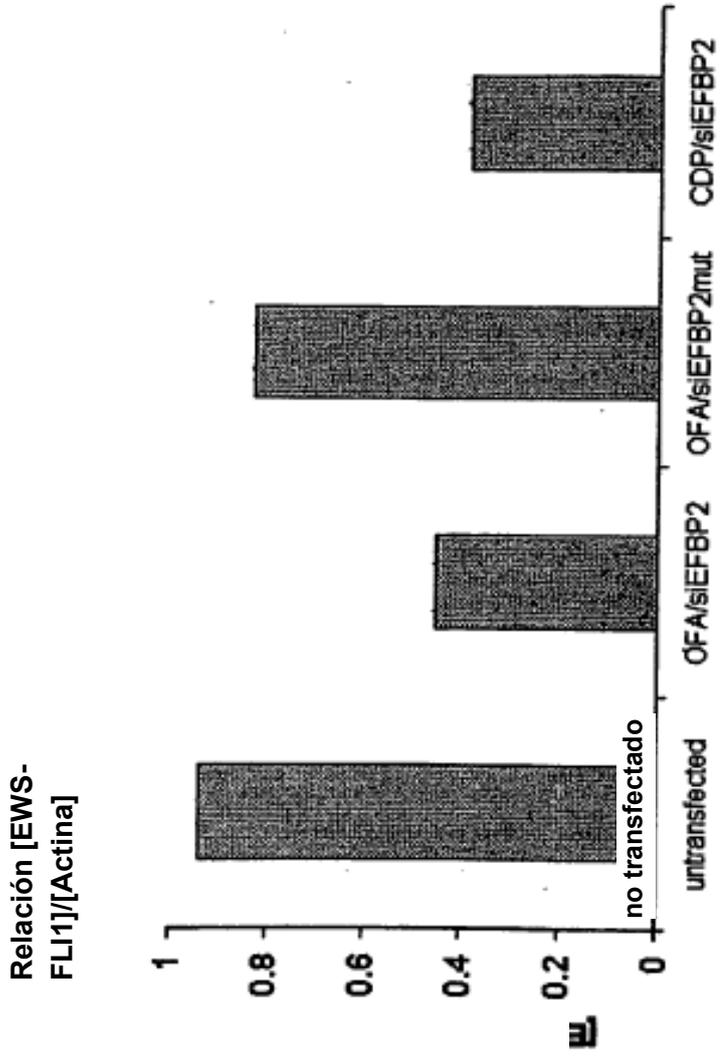


FIGURA 29

FIGURE 29

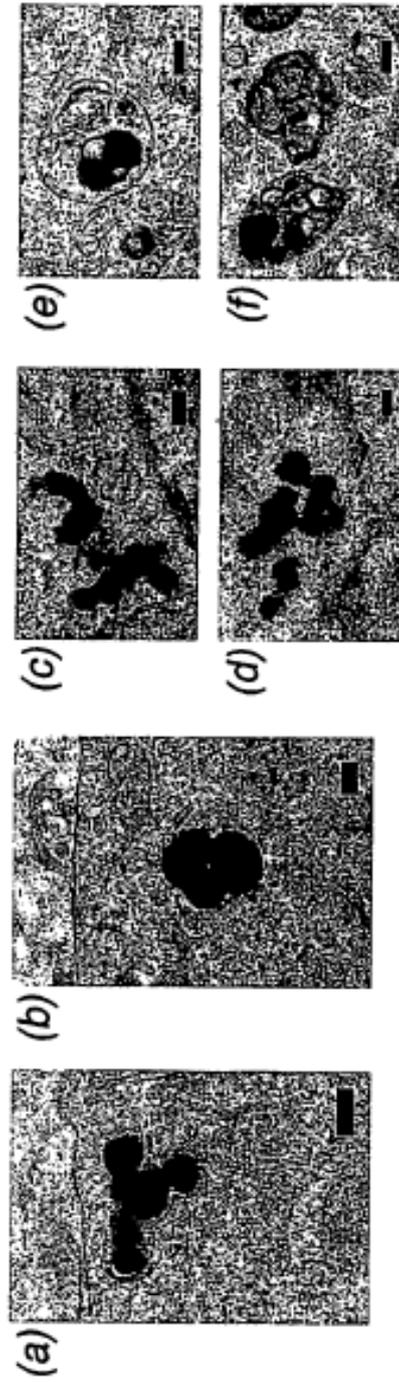


FIGURA 30

FIGURE 30

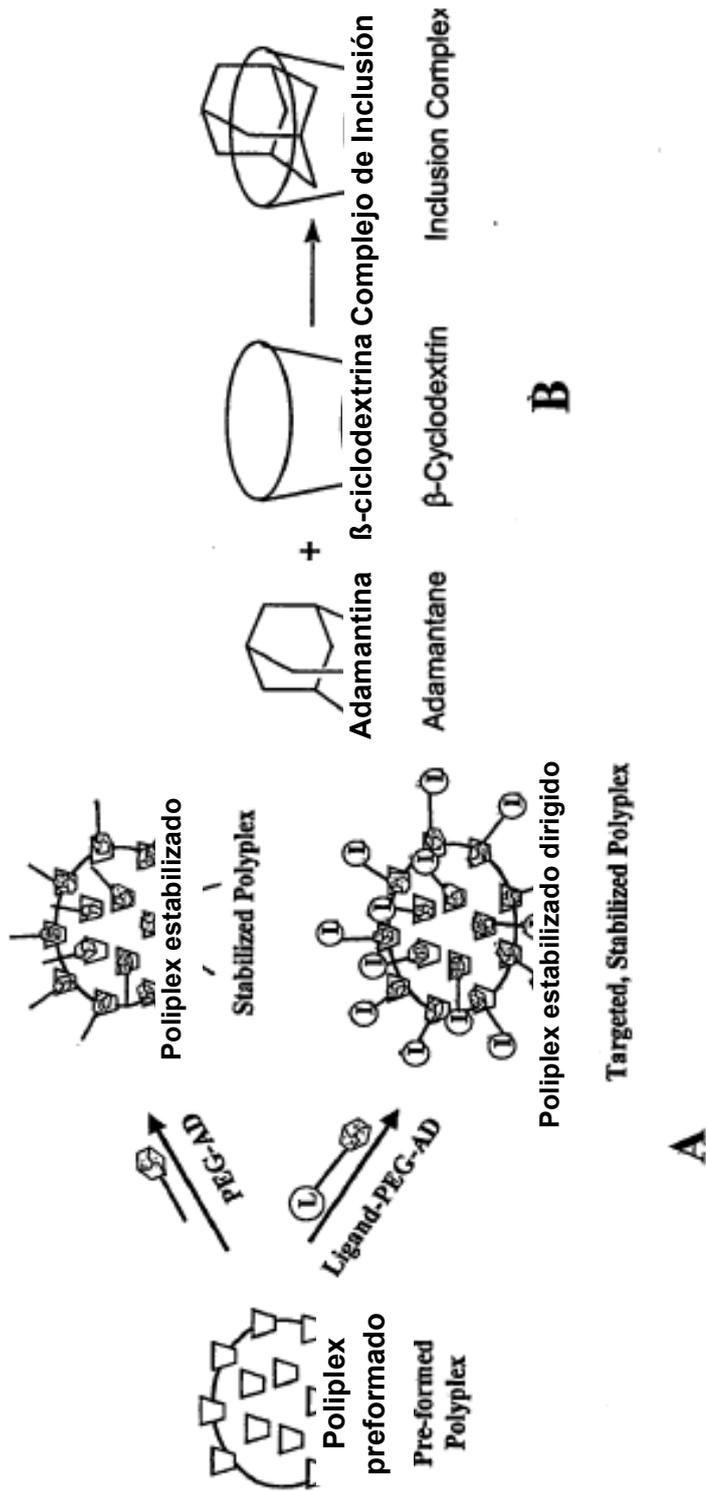


FIGURA 31

FIGURE 31

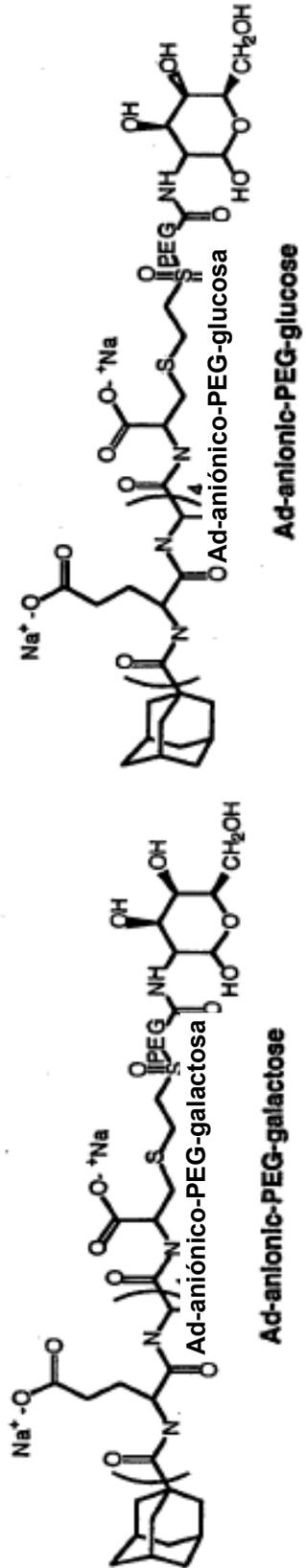


FIGURA 32

FIGURE 32

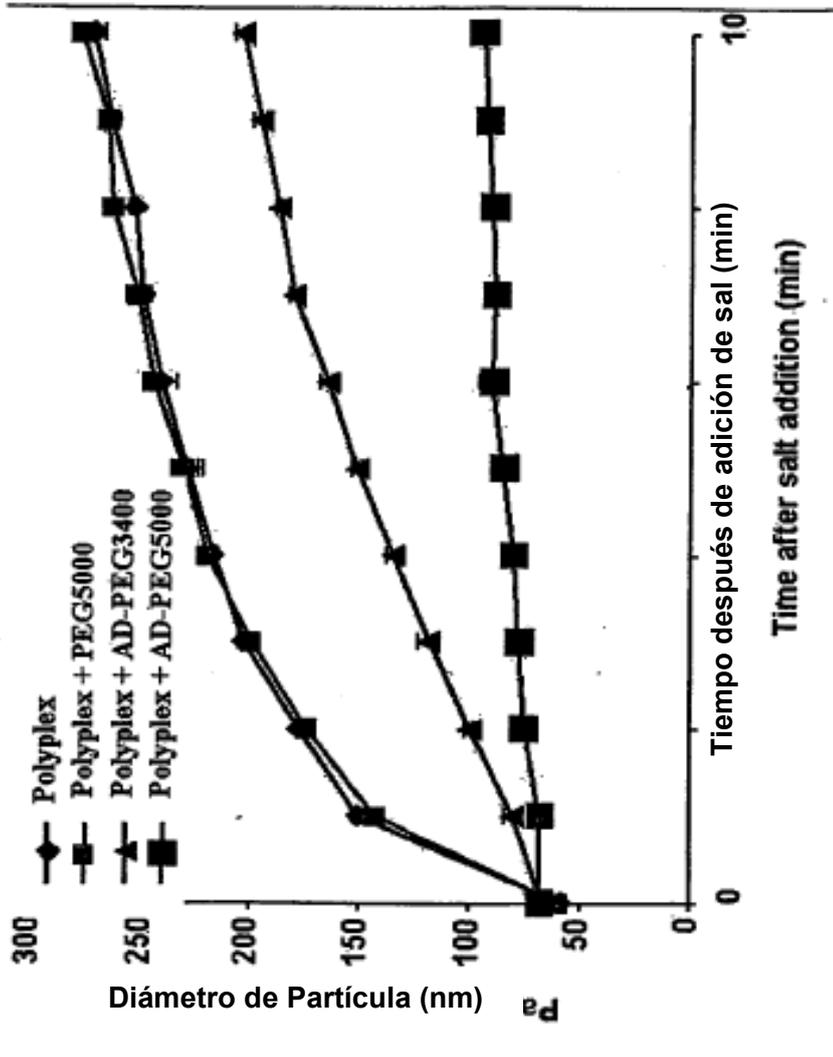


FIGURA 33
FIGURE 33

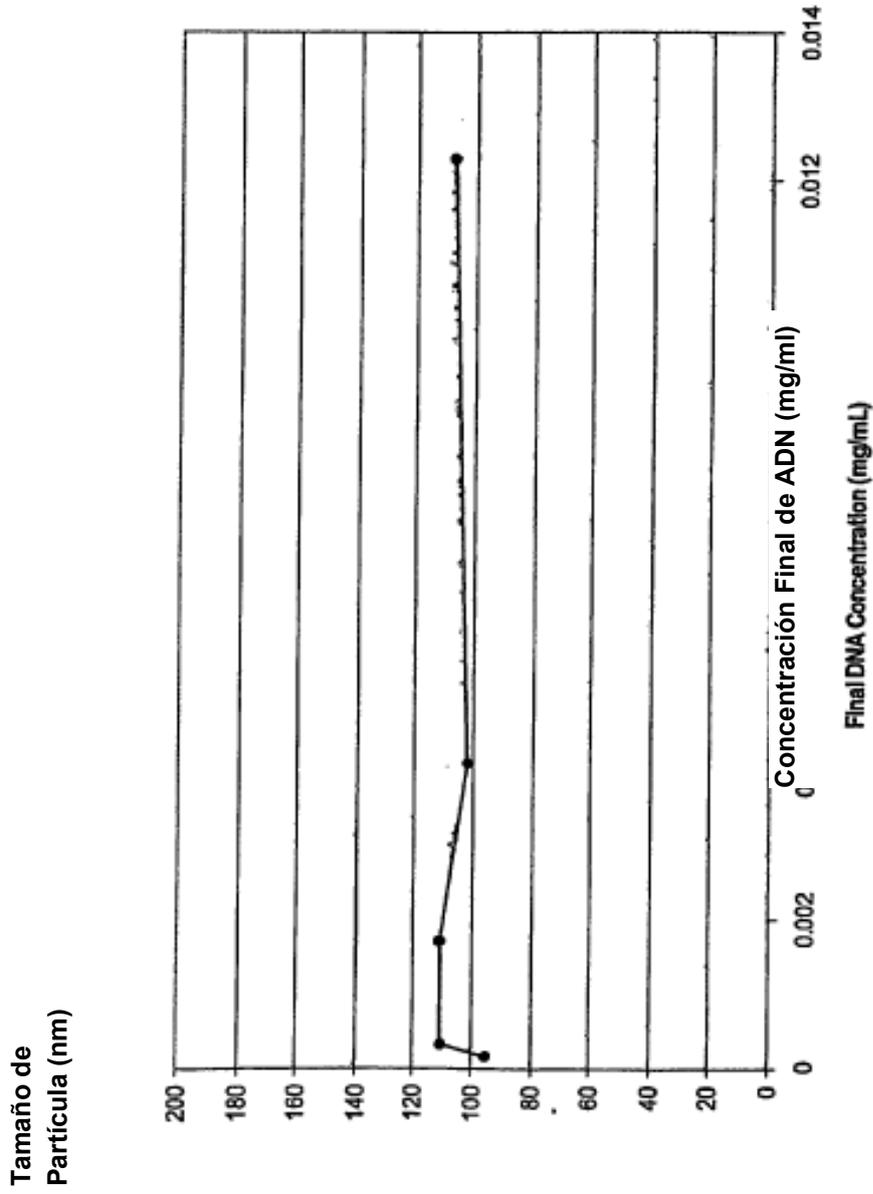


FIGURA 34

FIGURE 34

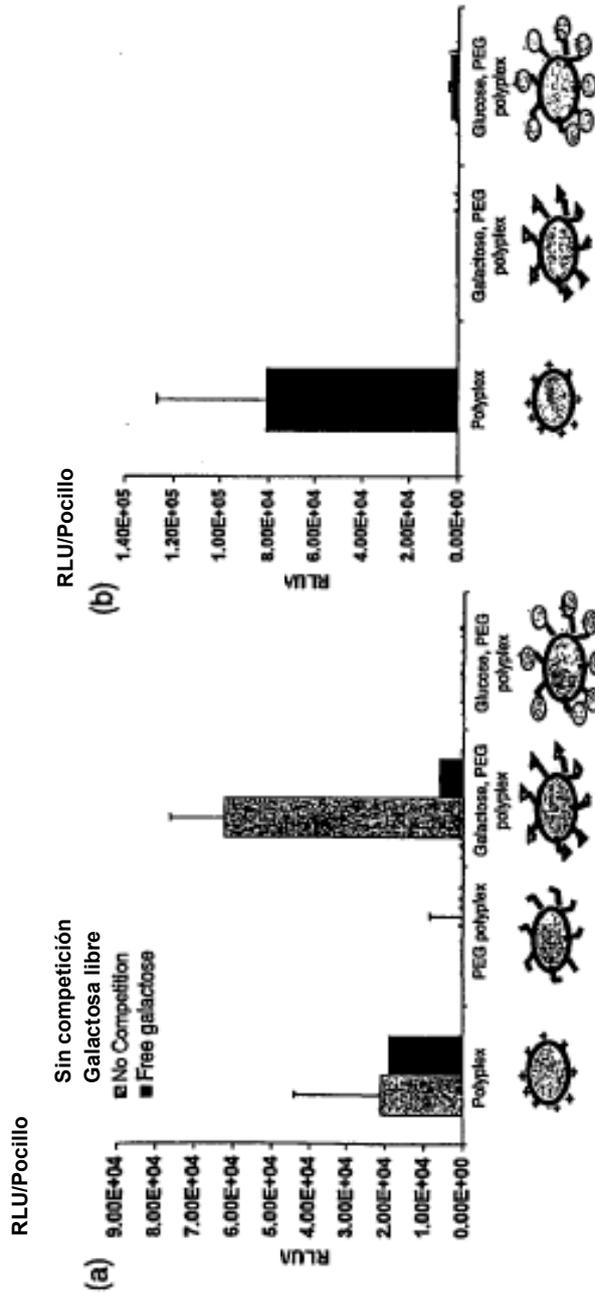


FIGURA 35

FIGURE 35

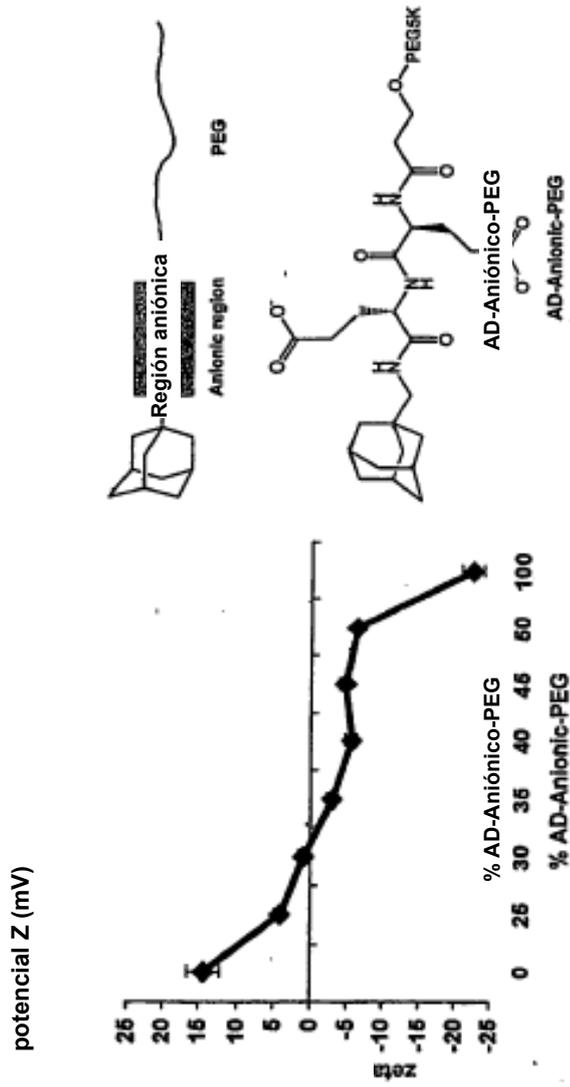


FIGURA 36
FIGURE 36

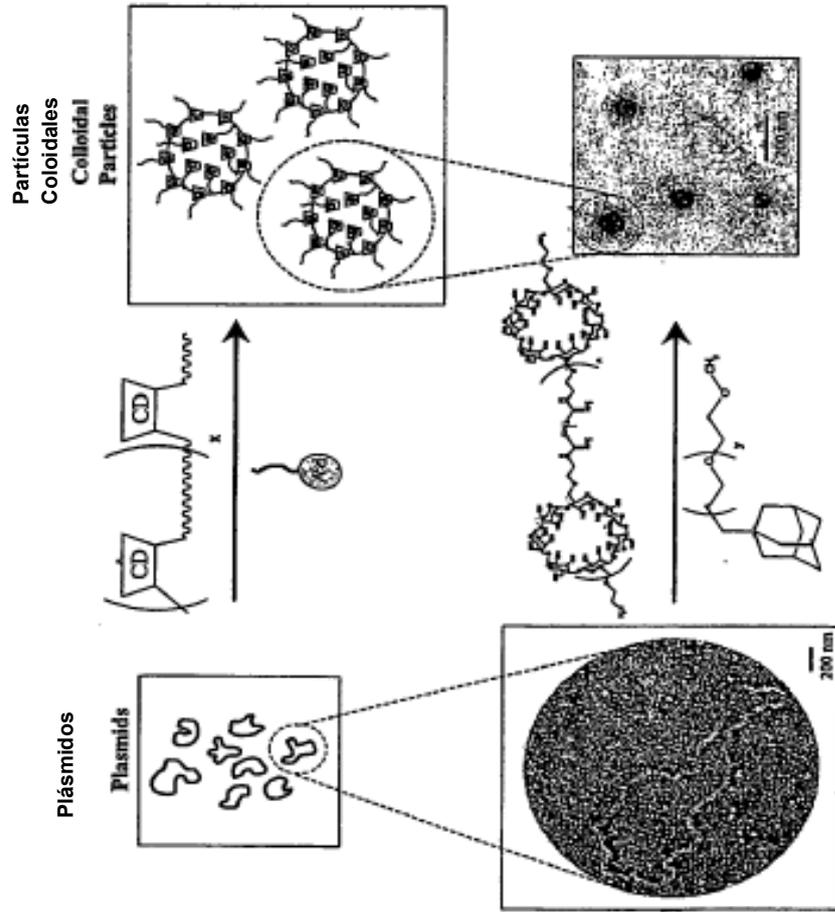


FIGURA 37

FIGURE 37

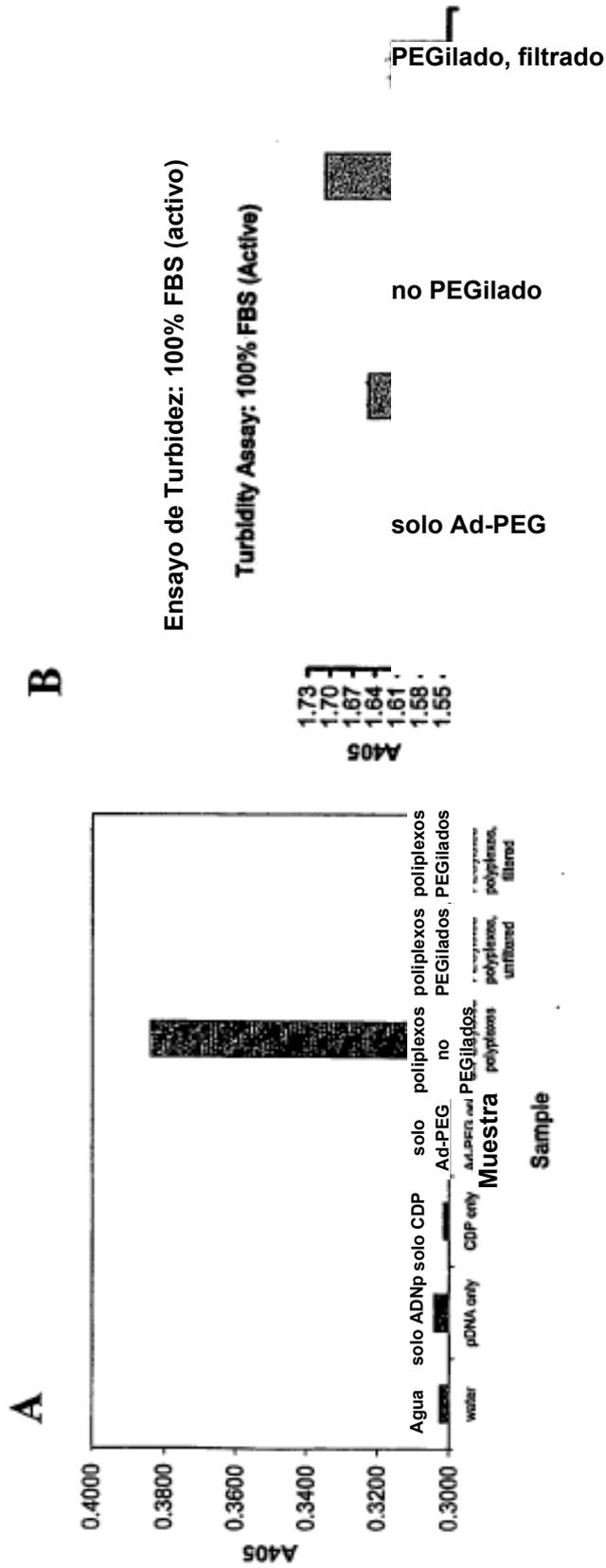


FIGURA 38

FIGURE 38

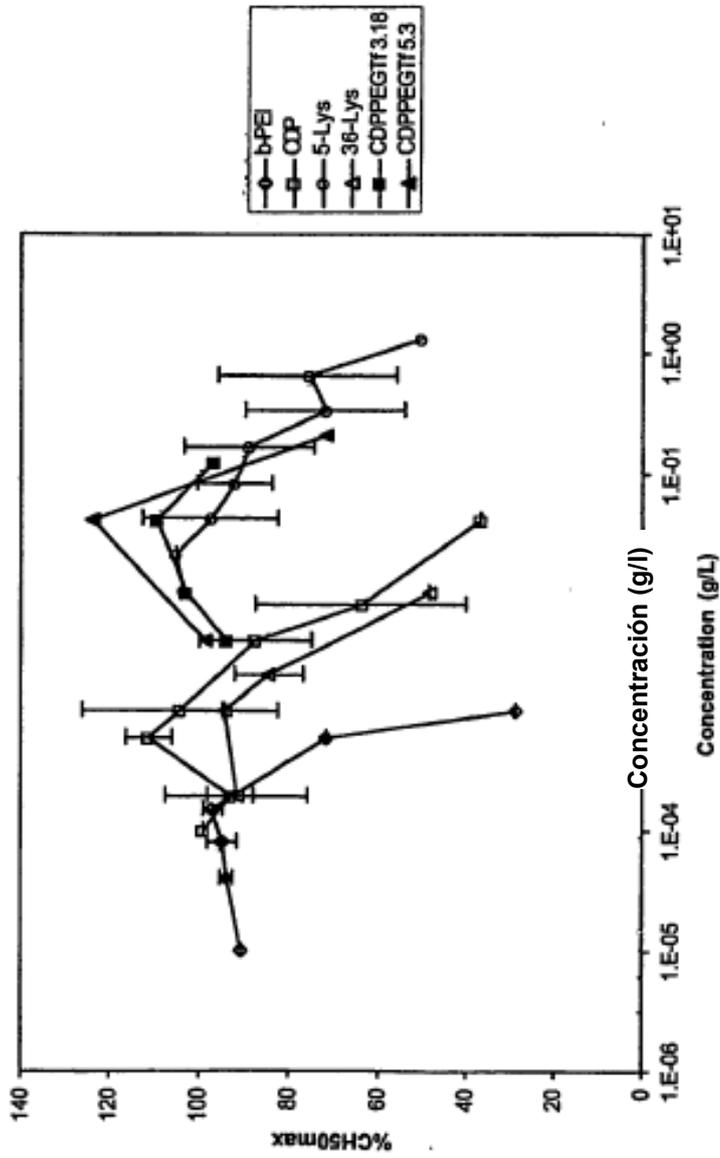


FIGURA 39

FIGURE 39

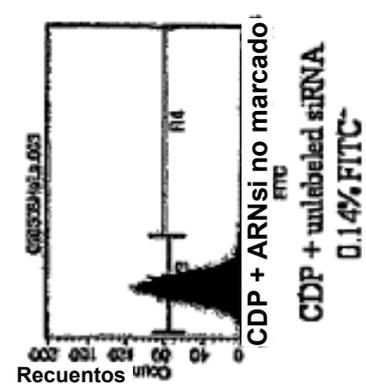
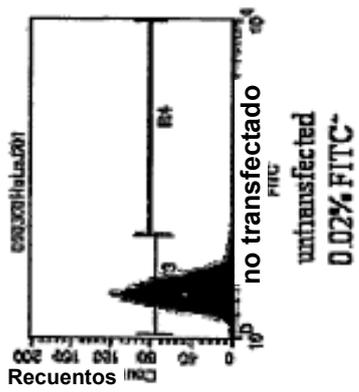
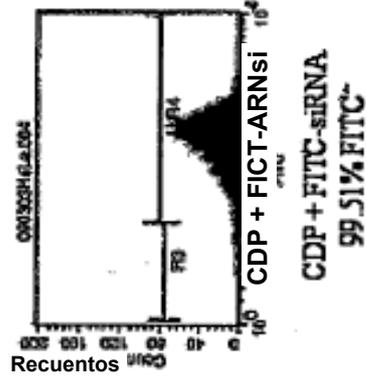
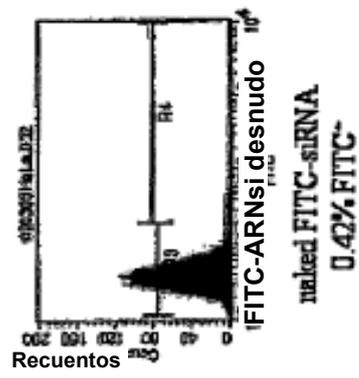
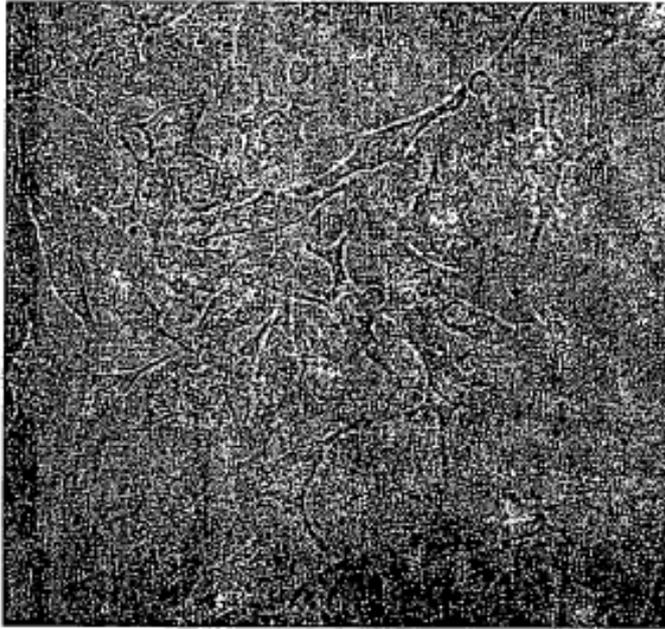


FIGURA 40
FIGURE 40

Resumen de Resultados de qRT/PCR
 (Hígados recogidos 24 h después de la inyección)

(Livers harvested 24 h post-injection)

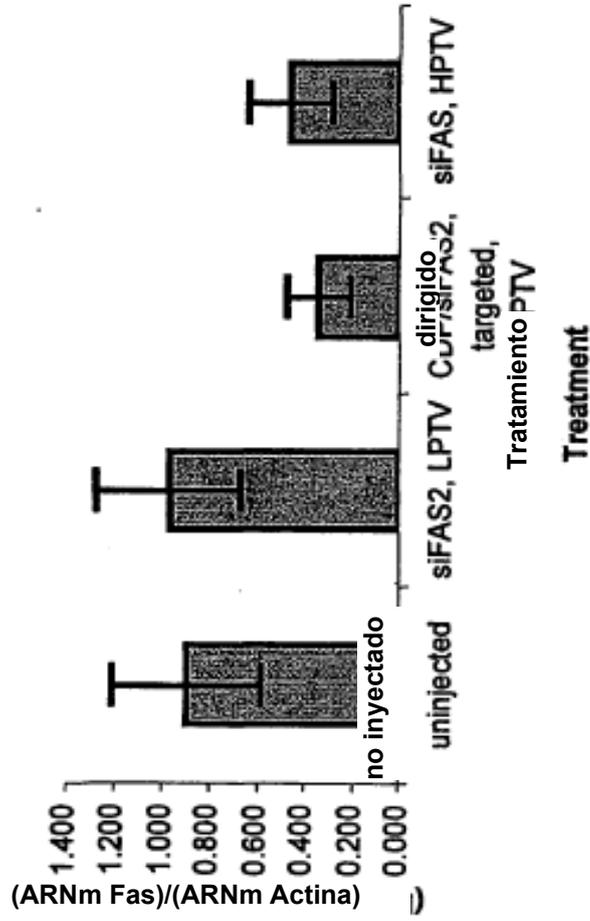


FIGURA 41

FIGURE 41

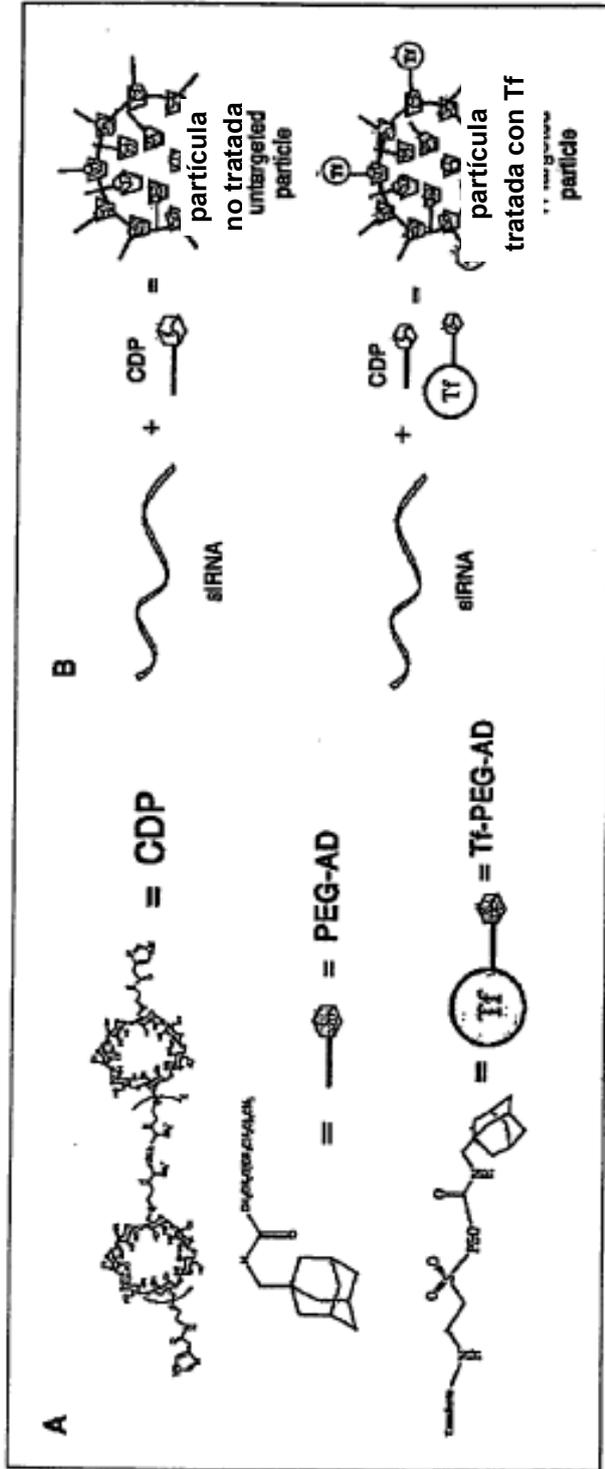


FIGURA 42

FIGURE 42

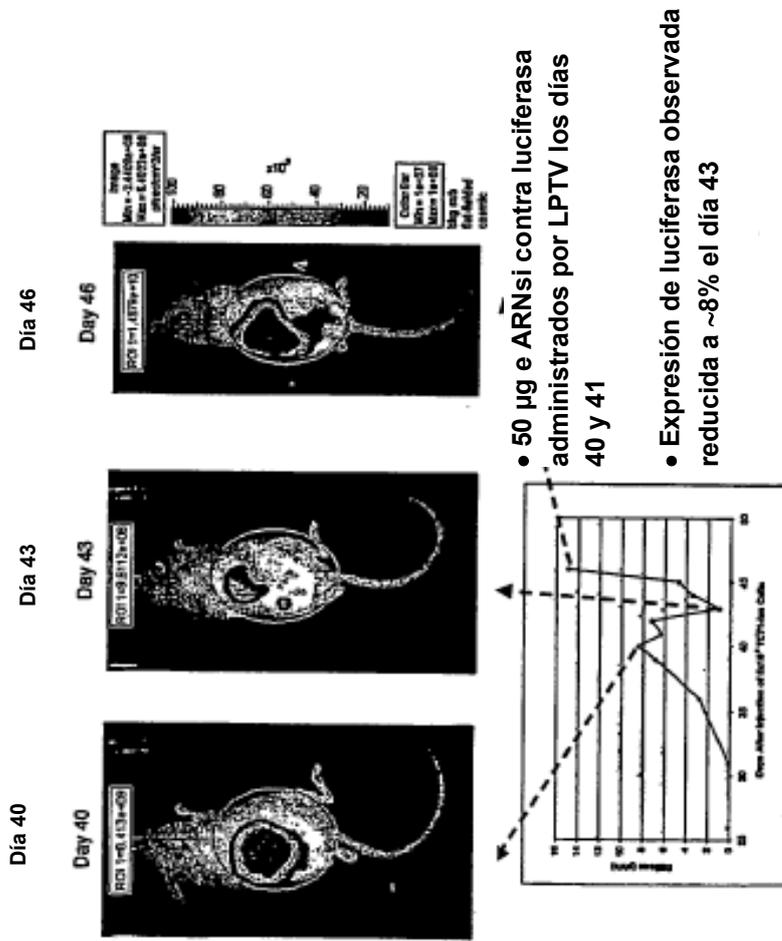


FIGURA 43
FIGURE 43

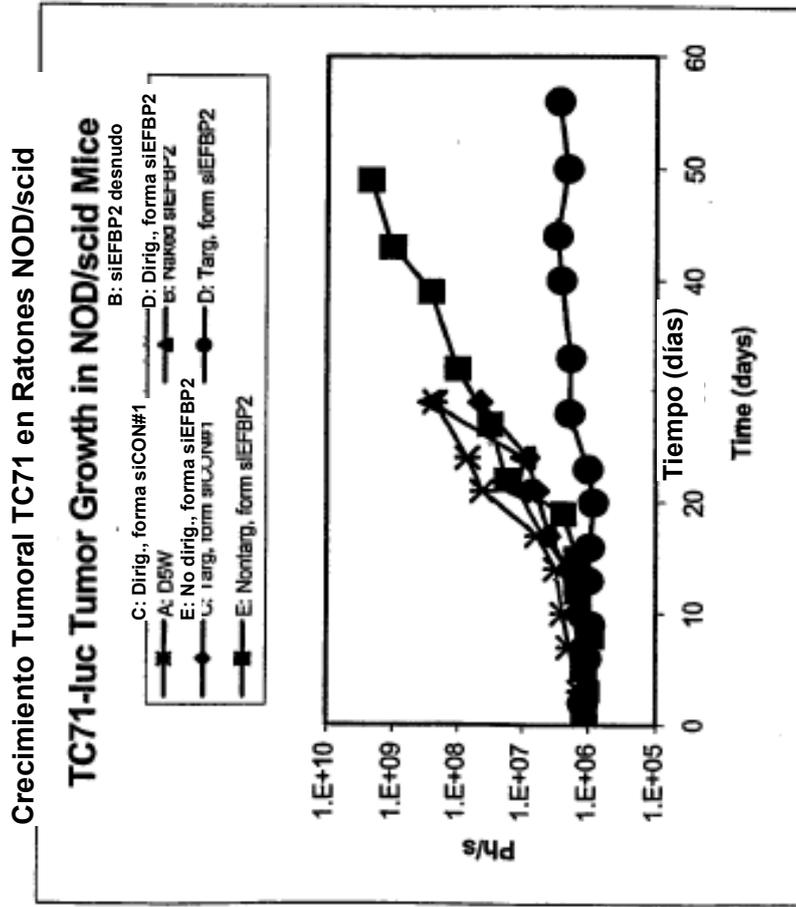


FIGURA 44

FIGURE 44

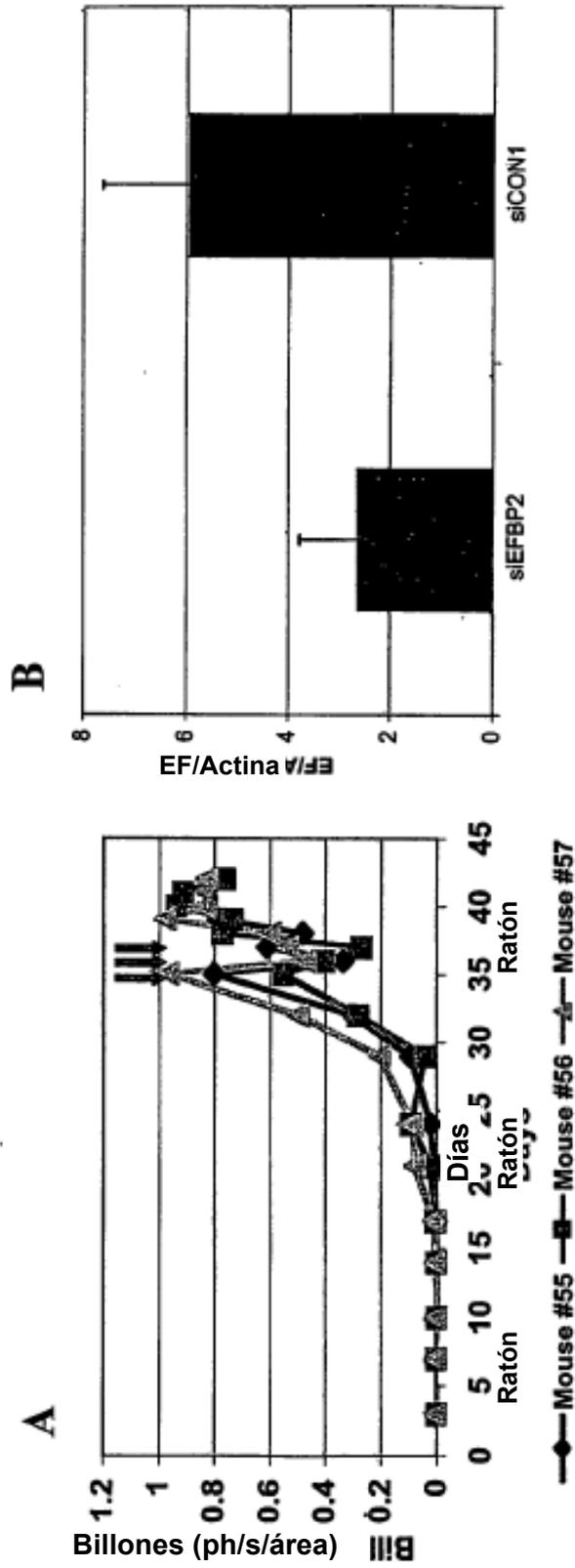


FIGURA 45

FIGURE 45