

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 024**

51 Int. Cl.:
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/713 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02017601 .2**
96 Fecha de presentación: **05.08.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1389637**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.02.2004**

54 Título: **Moléculas de RNA interferentes de extremos romos**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.10.2012

73 Titular/es:
**SILENCE THERAPEUTICS
AKTIENGESELLSCHAFT
ROBERT-RÖSSLE-STRASSE 10
13125 BERLIN, DE**

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

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 389 024 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

Moléculas de RNA interferentes de extremos romos.

La presente invención se refiere a un ácido ribonucleico que media en la interferencia de RNA que comprende una estructura de doble hebra, en donde la estructura de doble hebra comprende una primera hebra y una segunda hebra, en donde la primera hebra comprende un primer tramo de nucleótidos contiguos y en donde dicho primer tramo es al menos parcialmente complementario a un ácido nucleico diana, y la segunda hebra comprende un segundo tramo de nucleótidos contiguos en donde dicho segundo tramo es al menos parcialmente idéntico a un ácido nucleico diana, al uso de tal ácido ribonucleico, a una célula y un organismo, respectivamente, que comprenden tal ácido ribonucleico, a una composición que contiene tal ácido ribonucleico y a una composición farmacéutica que contiene tal ácido ribonucleico.

La interferencia mediada por RNA (RNAi) es un mecanismo de silenciamiento de genes post-transcripcional iniciado por RNA de doble hebra (dsRNA) homólogo en secuencia al gen silenciado (Fire (1999), Trends Genet 15, 358-63, Tuschl, *et al.*, (1999), Genes Dev 13, 3191-7, Waterhouse, *et al.*, (2001), Nature 411, 834-42, Elbashir, *et al.* (2001), Nature 411, 494-8, para revisión véase Sharp (2001), Genes Dev 15, 485-90, Barstead (2001), Curr Opin Chem Biol 5, 63-6). El RNAi se ha usado extensamente para determinar la función de genes en varios organismos, que incluyen plantas (Baulcombe (1999), Curr Opin Plant Biol 2, 109-13), nematodos (Montgomery, *et al.* (1998), Proc Natl Acad Sci U S A 95, 15502-7), *Drosophila* (Kennerdell, *et al.* (1998), Cell 95, 1017-26, Kennerdell, *et al.* (2000), Nat Biotechnol 18, 896-8). En el nematodo *C. elegans* aproximadamente un tercio del genoma ya ha sido sometido a análisis funcional por RNAi (Kim (2001), Curr Biol 11, R85-7, Maeda, *et al.* (2001), Curr Biol 11, 171-6).

Hasta hace poco el RNAi en células de mamíferos no era generalmente aplicable, con la excepción del desarrollo temprano en ratones (Wianny, *et al.* (2000), Nat Cell Biol 2, 70-5). El descubrimiento de que la transfección de dúplex de 21-nt en células de mamíferos interfería con la expresión de genes y no inducía una respuesta antivírica dirigida por interferón independiente de secuencia obtenida usualmente con dsRNA largos condujo a una nueva aplicación potencial en células de mamíferos diferenciadas (Elbashir *et al.* (2001), Nature 411, 494-8). De modo interesante, estos RNAs interferentes pequeños (siRNAs) se asemejan a los productos de proceso de dsRNAs largos, lo que sugiere un mecanismo de circunvalación potencial en células de mamíferos diferenciadas. El complejo Dicer, un miembro de la familia RNasa III, necesario para el procesamiento inicial del dsDNA, ha sido identificado (Bernstein, *et al.* (2001), Nature 409, 363-6, Billy, *et al.* (2001), Proc Natl Acad Sci U S A 98, 14428-33). Uno de los problemas encontrados previamente cuando se usaban ribooligonucleótidos no modificados era la rápida degradación en células o incluso en el medio que contenía suero (Wickstrom (1986), J Biochem Biophys Methods 13, 97-102, Cazenave, *et al.* (1987), Nucleic Acids Res 15, 10507-21). Dependerá de la función genética particular y los sistemas de ensayo usados el que la reducción ("knock down") respectiva inducida por siRNA transfectado se mantenga el tiempo suficiente para conseguir un cambio fenotípico.

La solicitud de patente internacional WO 02/44321 describe moléculas de RNA pequeñas que median en la interferencia de RNA.

Elbashir *et al.* (Elbashir SM *et al.*, Genes & Development 15: 188-200, 2001) describen que la interferencia de RNA es mediada por RNAs de 21 y 22 nucleótidos.

El problema que subyace en la presente invención era proporcionar moléculas de RNA interferentes sintéticas que sean tanto estables como activas en un entorno bioquímico tal como una célula viva.

Este problema es solventado por el tema de las reivindicaciones independientes adjuntas. Las realizaciones preferidas se pueden tomar de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

Más específicamente, en un primer aspecto de la presente invención, el problema es resuelto por un ácido ribonucleico que media en la interferencia de RNA que comprende una estructura de doble hebra, en donde la estructura de doble hebra comprende una primera hebra y una segunda hebra, en donde la primera hebra comprende un primer tramo de nucleótidos contiguos y en donde dicho primer tramo es al menos parcialmente complementario a un ácido nucleico diana, y la segunda hebra comprende un segundo tramo de nucleótidos contiguos, en donde dicho segundo tramo es al menos parcialmente idéntico al ácido nucleico diana, en donde la estructura de doble hebra es de extremos romos en ambos lados de la doble hebra, y la longitud de dicha primera hebra y dicho primer tramo y la longitud de dicha segunda hebra y dicho segundo tramo es de 18 o 19 bases, para uso en un método para el tratamiento de una enfermedad.

En una realización del ácido ribonucleico acorde con la presente invención, al menos un nucleótido del ácido ribonucleico tiene una modificación en la posición 2', y la modificación se selecciona preferiblemente del grupo que comprende amino, fluoro, metoxi y alquilo.

En una realización preferida del ácido ribonucleico acorde con la presente invención, la complementariedad entre dicha primera hebra y el ácido nucleico diana es perfecta.

En una realización del ácido nucleico acorde con la presente invención, el dúplex formado entre la primera hebra y el

ácido nucleico diana comprende al menos 15 nucleótidos, en donde hay una discordancia o dos discordancias entre dicha primera hebra y el ácido nucleico diana que forman dicha estructura de doble hebra.

5 En una realización preferida del ácido ribonucleico acorde con la presente invención, el gen diana se selecciona del grupo que comprende genes estructurales, genes constitutivos, factores de transcripción, factores de motilidad, factores de ciclo celular, inhibidores de ciclo celular, enzimas, factores de crecimiento, citocinas y supresores de tumores.

En una realización, la enfermedad se selecciona del grupo que comprende glioblastoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer pancreático y leucemia, diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares y enfermedades metabólicas.

10 En un segundo aspecto, el problema que subyace en la presente invención es resuelto por el uso de un ácido ribonucleico acorde con cualquiera de los aspectos de la presente invención, para la fabricación de un medicamento.

15 En una realización del uso según el segundo aspecto de la presente invención, el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad o de una afección que se selecciona del grupo que comprende glioblastoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer pancreático y leucemia, diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares y enfermedades metabólicas.

En un tercer aspecto, el problema que subyace en la presente invención es resuelto por una célula, preferiblemente una célula reducida, que contiene un ácido ribonucleico acorde con el primer aspecto de la presente invención, en donde si la célula es una célula humana, la célula humana es una célula humana aislada.

20 En un cuarto aspecto, el problema que subyace en la presente invención es resuelto por un organismo, preferiblemente un organismo reducido, que contiene un ácido ribonucleico acorde con el primer aspecto de la presente invención, en donde el organismo es diferente de un ser humano.

En un quinto aspecto, el problema que subyace en la presente invención es resuelto por una composición que contiene un ácido ribonucleico acorde con el primer aspecto de la presente invención.

25 En un sexto aspecto, el problema que subyace en la presente invención es resuelto por una composición farmacéutica que contiene un ácido ribonucleico acorde con el primer aspecto de la presente invención.

También se describe un método para inhibir la expresión de un gen diana en una célula o un derivado de la misma, que comprende la introducción de un ácido ribonucleico acorde con cualquiera de los aspectos de la presente invención en la célula en una cantidad suficiente para inhibir la expresión del gen diana, en donde el gen diana es el gen diana del ácido ribonucleico acorde con cualquiera de los aspectos de la presente invención.

30 La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que se pueden diseñar RNAs interferentes pequeños, tal como para ser tanto altamente específicos como activos, así como estables bajo las condiciones de reacción que se encuentran típicamente en sistemas biológicos tales como ensayos bioquímicos o entornos celulares. Los diversos RNAs interferentes descritos en la técnica anterior, tal como por Tuschl et al. (solicitud de patente internacional WO 01/75164) proporcionan una longitud de 21 a 23 nucleótidos y una modificación en el extremo 3' del RNA de doble hebra. Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que el problema de la estabilidad del RNA interferente, incluyendo RNA interferente pequeño (siRNA), que se denomina generalmente en la presente memoria en lo sucesivo RNAi, reside en realidad en el ataque de endonucleasas en lugar de exonucleasas como se pensaba antes. En base a este hallazgo, los presentes inventores han percibido varias estrategias que son el tema de la presente solicitud.

40 La presente invención se refiere por tanto a nuevas formas de RNA interferente. El RNAi consiste en un ácido ribonucleico que comprende una estructura de doble hebra. Dicha estructura de doble hebra está formada por una primera hebra y una segunda hebra. Dicha primera hebra comprende un tramo de nucleótidos contiguos, denominado también primer tramo de nucleótidos contiguos en la presente memoria, y este primer tramo es al menos parcialmente complementario a un ácido nucleico diana. Dicha segunda hebra comprende también un tramo de nucleótidos contiguos, en donde dicho segundo tramo es al menos parcialmente idéntico a un ácido nucleico diana. La propia estructura básica de este ácido ribonucleico se muestra esquemáticamente en la Fig. 1. Dicha primera hebra y dicha segunda hebra están preferiblemente hibridadas una a la otra y forman la estructura de doble hebra. La hibridación se produce típicamente por emparejamiento de bases de Watson y Crick. Dependiendo de la secuencia particular del primer tramo y del segundo tramo, la hibridación o emparejamiento de bases no es necesariamente completa o perfecta, lo que significa que el primer y el segundo tramos no están emparejados de bases al 100% debido a discordancias. Podría haber también una o dos discordancias dentro del dúplex. Dichas discordancias no tienen efecto sobre la actividad del RNAi si están situadas fuera de un tramo de 17 nucleótidos concordantes. Si las discordancias están situadas para dar sólo 15 o menos nucleótidos concordantes contiguos, la molécula de RNAi muestra típicamente una actividad reducida en la regulación en descenso de mRNA para una diana dada, comparado con un dúplex de 17 nucleótidos concordantes.

El primer tramo de nucleótidos contiguos es esencialmente complementario a un ácido nucleico diana, más

preferiblemente a una parte del ácido nucleico diana. Complementario, tal como se emplea en la presente memoria, significa preferiblemente que la secuencia de nucleótidos de la primera hebra es hibridizante a una secuencia de ácidos nucleicos o una parte de la misma de una secuencia de ácidos nucleicos diana. Por regla general, la secuencia de ácidos nucleicos diana es, de acuerdo con el modo de acción de los ácidos ribonucleicos interferentes, un RNA de hebra única, más preferiblemente un mRNA. Tal hibridación se produce, lo más probablemente, mediante emparejamiento de bases de Watson y Crick, sin embargo, no está necesariamente limitado al mismo. El grado al que dicha primera hebra y más particularmente el primer tramo de nucleótidos contiguos de dicha primera hebra es complementario a una secuencia de ácidos nucleicos diana puede ser tan alto como 100% y ser tan bajo como 80%, preferiblemente 80-100%, más preferiblemente 85-100%, lo más preferiblemente 90-100%. La complementariedad óptima parece ser 95-100%. Complementariedad, en este sentido, significa que el intervalo de nucleótidos mencionado anteriormente, tal como, p.ej., 80%-100%, dependiendo del intervalo particular de los nucleótidos, son perfectos por emparejamiento de bases de Watson y Crick. Se muestra en un aspecto de la presente invención que la complementariedad entre dicho primer tramo de nucleótidos y el RNA diana tiene que ser 18-19 nucleótidos, los tramos de tan poco como 17 nucleótidos, incluso con dos salientes específicos de secuencia, no son funcionales en la mediación de RNAi. Por consiguiente, dado un dúplex que tiene una longitud de 19 nucleótidos o pares de bases, una complementariedad mínima de 17 nucleótidos o pares de bases de nucleótidos sería aceptable, permitiendo un discordancia de dos nucleótidos. Se describe que en caso de un dúplex que consiste en 20 nucleótidos o pares de bases, una complementariedad de 17 nucleótidos o pares de bases de nucleótidos sería permisible y funcionalmente activa. Lo mismo se aplica a un dúplex de 21 nucleótidos o pares de bases con un total de 17 nucleótidos o pares de bases complementarios. Básicamente, el grado de complementariedad requerido para una longitud de un dúplex, es decir, de una estructura de doble hebra, también se puede basar en la temperatura de fusión del complejo formado bien por la estructura de doble hebra descrita en la presente memoria o bien por el complejo del primer tramo de la primera hebra y el ácido nucleico diana.

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

También se describe una estrategia según la cual una molécula de ácido ribonucleico interferente que puede ser diseñada según la presente invención es para tener una longitud óptima de 18 o 19 nucleótidos del tramo que es complementario al ácido nucleico diana. También está dentro de la presente invención que dicha longitud óptima de 18 o 19 nucleótidos es la longitud de la estructura de doble hebra en el RNAi usado. Este requisito de longitud es claramente diferente de la enseñanza técnica de la técnica anterior, tal como, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 01/75164. Está dentro de la presente invención que cualquier diseño adicional, tanto según la presente invención como descrito en la técnica anterior, puede ser realizado en relación a un ácido ribonucleico interferente que tenga dichas características de longitud, es decir, una longitud de 18 o 19 nucleótidos.

Está dentro de la presente invención que la molécula de ácido ribonucleico interferente que se puede diseñar es para tener un grupo hidroxilo 5' libre, denominado también en la presente memoria grupo OH 5' libre, en la primera hebra. Un grupo OH 5' libre significa que el nucleótido más terminal que forma la primera hebra está presente y por tanto no está modificado, particularmente no por una modificación terminal. Por regla general, el grupo 5'-hidroxilo terminal de la segunda hebra, respectivamente, también está presente de una manera no modificada. En una realización más preferida, también el extremo 3' de la primera hebra y primer tramo, respectivamente, está no modificado, tal como para presentar un grupo OH libre que se denomina también en la presente memoria grupo OH 3' libre. Preferiblemente, tal grupo OH libre también está presente en el extremo 3' de la segunda hebra y segundo tramo, respectivamente. En otras realizaciones de las moléculas de ácido ribonucleico acordes con la presente invención, el extremo 3' de la primera hebra y primer tramo, respectivamente, y/o el extremo 3' de la segunda hebra y segundo tramo, respectivamente, pueden tener una modificación terminal en el extremo 3'.

Tal como se emplea en la presente memoria, los términos grupo OH 5' libre y grupo OH 3' libre también indican que el nucleótido más terminal respectivo en el extremo 5' y el extremo 3' del polinucleótido, respectivamente, presenta un grupo OH. Tal grupo OH puede provenir bien del resto de azúcar del nucleótido, más preferiblemente de la posición 5' en el caso del grupo OH 5' y de la posición 3' en el caso del grupo OH 3', o bien de un grupo fosfato unido al resto de azúcar del nucleótido terminal respectivo. El grupo fosfato puede en principio estar unido a cualquier grupo OH del resto de azúcar del nucleótido. Preferiblemente, el grupo fosfato está unido al grupo 5' OH del resto de azúcar en caso del grupo OH 5' libre y/o el grupo OH 3' del resto de azúcar en caso del grupo OH 3' libre.

Tal como se emplea en la presente memoria con cualquier estrategia para el diseño de RNAi o cualquier realización de RNAi descrita en la presente memoria, el término modificación terminal significa una entidad química añadida al nucleótido más 5' o 3' de la primera y/o la segunda hebra. Los ejemplos para tales modificaciones terminales incluyen, pero no se limitan a, abásicos invertidos (desoxi), amino, fluoro, cloro, bromo, CN, CF, metoxi, imidazol, carboxilato, tioato, alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alcarilo o aralquilo, OCF₃, OCN, O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueno; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino o sililo sustituido, como, entre otros, se describen en las patentes europeas EP 0 586 520 B1 o EP 0 618 925 B1.

5 Una modificación terminal adicional es un grupo biotina. Tal grupo biotina puede estar preferiblemente unido bien al nucleótido más 5' o el nucleótido más 3' de la primera y/o segunda hebra o a ambos extremos. En una realización más preferida, el grupo biotina está acoplado a un polipéptido o una proteína. Está también dentro del alcance de la presente invención que el polipéptido o proteína esté unido mediante cualquiera de las otras modificaciones terminales mencionadas anteriormente. El polipéptido o proteína puede conferir características adicionales a las moléculas de ácido nucleico inventivas. Entre otros, el polipéptido o proteína puede actuar como ligando para otra molécula. Si dicha otra molécula es un receptor, la función y actividad del receptor pueden ser activadas por el ligando de unión. El receptor puede mostrar una actividad de internalización que permite una transfección eficaz de las moléculas de ácido nucleico inventivas unidas al ligando. Un ejemplo para el ligando a ser acoplado a la molécula de ácido nucleico inventiva es VEGF, y el receptor correspondiente es el receptor VEGF.

10 Se presentan diversas realizaciones posibles del RNAi de la presente invención que tienen diferentes tipos de modificación(es) terminal(es) en la siguiente tabla 1.

Tabla 1: Diversas realizaciones del ácido ribonucleico interferente acorde con la presente invención

	1ª hebra/1er tramo	2ª hebra/2º tramo
1.) extremo 5'	OH libre	OH libre
extremo 3'	OH libre	OH libre
2.) extremo 5'	OH libre	OH libre
extremo 3'	modificación terminal	modificación terminal
3.) extremo 5'	OH libre	OH libre
extremo 3'	OH libre	modificación terminal
4.) extremo 5'	OH libre	OH libre
extremo 3'	modificación terminal	OH libre
5.) extremo 5'	OH libre	modificación terminal
extremo 3'	OH libre	OH libre
6.) extremo 5'	OH libre	modificación terminal
extremo 3'	modificación terminal	OH libre
7.) extremo 5'	OH libre	modificación terminal
extremo 3'	OH libre	modificación terminal
8.) extremo 5'	OH libre	modificación terminal
extremo 3'	modificación terminal	modificación terminal

15 Las diversas modificaciones terminales descritas en la presente memoria están situadas preferiblemente en el resto de ribosa de un nucleótido del ácido ribonucleico. Más particularmente, la modificación terminal puede estar unida a

o reemplazar a cualquiera de los grupos OH del resto de ribosa, que incluyen, pero no se limitan a, la posición OH 2', OH 3' y OH 5', a condición de que el nucleótido así modificado sea un nucleótido terminal. Los abásicos invertidos son nucleótidos, bien desoxirribonucleótidos o bien ribonucleótidos, que no tienen un resto de nucleobase. Este tipo de compuesto es descrito, entre otros, en Sternberg et al. (2002), Antisense. Nucl. Ac. Drug Dev., en impresión.

Cualquiera de las modificaciones terminales mencionadas anteriormente se puede usar en relación con las diversas realizaciones de RNAi representadas en la tabla 1. En relación con ello, hay que señalar que cualquiera de las formas o realizaciones de RNAi descritas en la presente memoria con la hebra sentido estando inactivada, preferiblemente por tener una modificación terminal, más preferiblemente en el extremo 5', son particularmente ventajosas. Esto surge de la inactivación de la hebra sentido, que corresponde a la segunda hebra de los ácidos ribonucleicos descritos en la presente memoria, que podrían de lo contrario interferir con un RNA de hebra única no relacionado en la célula. Por tanto la expresión, y más particularmente el patrón de traducción del transcriptoma de una célula, es influido más específicamente. Este efecto también se denomina efecto fuera de objetivo ("off-target"). Haciendo referencia a la tabla 1, las realizaciones representadas como realizaciones 7 y 8 son particularmente ventajosas en el sentido anterior, ya que la modificación da como resultado una inactivación de la parte -inespecífica a la diana- del RNAi (que es la segunda hebra), reduciendo así cualquier interacción inespecífica de la segunda hebra con RNA de hebra única en un sistema celular o similar donde el RNAi acorde con la presente invención va a ser usado para reducir ácidos ribonucleicos y proteínas específicos, respectivamente.

De acuerdo con la presente invención, el ácido ribonucleico comprende una estructura de doble hebra, en donde la estructura de doble hebra comprende una primera hebra y una segunda hebra, en donde la primera hebra comprende un primer tramo de nucleótidos contiguos, y en donde dicho primer tramo es al menos parcialmente complementario a un ácido nucleico diana, y la segunda hebra comprende un segundo tramo de nucleótidos contiguos, en donde dicho segundo tramo es al menos parcialmente idéntico a un ácido nucleico diana, en donde la estructura de doble hebra es de extremos romos. Tal como se usa en relación con la presente descripción, el término estructura de doble hebra también se denomina dúplex. Este diseño de RNAi es por tanto claramente diferente de, p.ej., el de Tuschii et al., que se especifica en la solicitud de patente internacional WO 01/75164, que describe un saliente 3'. Tal como se emplea en la presente memoria, saliente se refiere a una estructura de doble hebra en la que al menos un extremo de una hebra es más largo que el extremo correspondiente de la otra hebra que forma la estructura de doble hebra, que se denomina también en la presente memoria contrahebra. Preferiblemente, el primer tramo es idéntico a la primera hebra y el segundo tramo es idéntico a la segunda hebra.

Asumida la eficacia del RNAi de extremos romos y las ventajas de una modificación terminal bien de la primera o bien la segunda hebra o ambas, respectivamente, del ácido ribonucleico respectivo, se prefiere tener una combinación de ambos principios de diseño. En otras palabras, está dentro de la presente invención tener un RNAi de extremos romos que lleve cualquier esquema de modificación terminal como los representados en la tabla 1.

También se describe una estrategia según la cual el ácido ribonucleico tiene un saliente en el extremo 5' del ácido ribonucleico. Más particularmente, tal saliente puede en principio estar presente en cualquiera o ambas de la primera hebra y la segunda hebra del ácido ribonucleico. La longitud de dicho saliente puede ser tan poca como un nucleótido y tan larga como 2 a 8 nucleótidos, preferiblemente 2, 4, 6 o 8 nucleótidos. El saliente en 5' puede estar situado en la primera hebra y/o la segunda hebra del ácido ribonucleico. El (los) nucleótido(s) que forman el saliente puede(n) ser (a) desoxirribonucleótido(s), (b) ribonucleótido(s) o una combinación de los mismos.

El saliente comprende preferiblemente al menos un desoxirribonucleótido, en donde dicho desoxirribonucleótido es preferiblemente el más 5' terminal. El extremo 3' de la respectiva contrahebra del ácido ribonucleico no tiene un saliente, más preferiblemente no un saliente de desoxirribonucleótido. De nuevo aquí, cualquiera de los ácidos ribonucleicos puede comprender un esquema de modificación terminal como los bosquejados en relación con la tabla 1 y/o una modificación terminal como se bosqueja en la presente memoria.

De acuerdo con la presente invención, los ácidos ribonucleicos de la presente invención forman un cierto patrón de nucleótidos modificados en al menos una de las hebras y más particularmente en uno de los tramos de nucleótidos contiguos del (de los) ácido(s) ribonucleico(s) acordes con la presente invención. El tipo de modificación de dichos nucleótidos puede ser el mismo que el discutido en relación con las otras estrategias para diseñar RNA interferente descritas en la presente memoria, y más particularmente el tipo de modificación descrito en la presente memoria para o como modificación terminal, tal como, p.ej., abásicos invertidos, metoxi o amino y similares en el resto de ribosa de al menos un nucleótido que forma los ácidos ribonucleicos acordes con la presente solicitud. Hay que señalar que la modificación de dichos nucleótidos puede ser cualquier forma de modificación descrita en la presente memoria, más particularmente el tipo de modificación descrita en la presente memoria como modificación terminal, con la particularidad de que la llamada modificación terminal no está situada necesariamente en nucleótidos terminales. Más bien la modificación se está produciendo en un nucleótido no terminal. Bajo tales condiciones la modificación está unida preferiblemente al resto de ribosa del nucleótido -a ser- modificado, e incluso más preferiblemente a la posición 2' del resto de ribosa.

También está dentro de la presente invención que cualquier ácido ribonucleico diseñado según esta estrategia puede tener también los rasgos conferidos a un ácido ribonucleico acorde con la presente invención por cualquiera

de las otras estrategias de diseño descritas en la presente memoria. Por consiguiente, el ácido ribonucleico interferente que tiene un patrón de nucleótidos modificados puede tener una modificación terminal, un esquema de modificación terminal, o cualquier combinación de estos elementos o características.

5 Aparte de las modificaciones mencionadas anteriormente, que se pueden presentar bien como modificaciones terminales o bien como patrón de modificación, la cadena principal del ácido ribonucleico como tal puede ser modificada adicionalmente formando diferentes enlaces entre los nucleótidos. Tales enlaces diferentes se describen, entre otros, en la patente europea EP 0 586 520 B1 y la patente europea EP 0 618 925 B1. De particular interés aquí son modificaciones internas de la cadena principal del ácido ribonucleico que han demostrado conferir una resistencia a la nucleasa más alta de los ribooligonucleótidos. En una realización preferida, la modificación del nucleótido modificado es una metoxilación del grupo OH 2' del resto de ribosa del nucleótido.

10 En una realización preferida, ambas hebras, y más particularmente tanto el primer tramo como el segundo tramo, muestran este tipo de modificación de los nucleótidos que forman dichas hebras y tramos, respectivamente. Sin embargo, también está dentro de la presente invención que la primer hebra y el primer tramo, respectivamente, o bien la segunda hebra y el segundo tramo, respectivamente, muestren este patrón particular de modificación de los nucleótidos. Tal como se emplea en la presente memoria, el término grupo de nucleótido modificado o grupo flanqueante de nucleótido puede comprender o representar tan pocos nucleótidos como un nucleótido.

15 Tomado el tramo de nucleótidos contiguos hay un patrón de modificación de los nucleótidos que forman el tramo que se puede realizar de tal modo que un único nucleótido o grupo de nucleótidos que están enlazados covalentemente unos a otros por medio de enlaces de fosforodiéster estándar o, al menos parcialmente, mediante enlaces de fosforotioato, muestran tal tipo de modificación. En caso de que tal nucleótido o grupo de nucleótidos no esté formando el extremo 5' o el extremo 3' de dicho tramo, un nucleótido o grupo de nucleótidos sigue en ambos lados del nucleótido que no tiene la modificación del nucleótido o grupo de nucleótidos precedente. Hay que señalar que este tipo de nucleótido o grupo de nucleótidos, sin embargo, puede tener una modificación diferente. Esta secuencia de nucleótido y grupo de nucleótidos modificados, respectivamente, y nucleótido o grupo de nucleótidos no modificados o modificados de manera diferente puede estar repetida una o varias veces. Preferiblemente, la secuencia está repetida más que una vez. Por razones de claridad, el patrón se discute en más detalle en lo que sigue, haciendo referencia generalmente a un grupo de nucleótidos modificados o a un grupo de nucleótidos no modificados en los que cada uno de dicho grupo puede comprender en realidad tan poco como un único nucleótido. Nucleótido no modificado, tal como se emplea en la presente memoria, significa bien que no tiene ninguna de las modificaciones mencionadas anteriormente en el nucleótido que forma el nucleótido o grupo de nucleótidos respectivo, o bien que tiene una modificación que es diferente de la del nucleótido y grupo de nucleótidos modificados, respectivamente.

20 También está dentro de la presente invención que la modificación del (de los) nucleótido(s) no modificado(s) en donde tal(es) nucleótido(s) no modificado(s) está(n) modificados en realidad de una manera diferente de la modificación del (de los) nucleótido(s) modificado(s), puede ser la misma o incluso diferente para los diversos nucleótidos que forman dichos nucleótidos no modificados.

25 El patrón de nucleótidos modificados y no modificados puede ser tal que el nucleótido 5'-terminal de la hebra o del tramo empieza con un grupo modificado de nucleótidos o empieza con un grupo no modificado de nucleótidos. Sin embargo, en una realización alternativa, también es posible que el nucleótido 5'-terminal esté formado por un grupo no modificado de nucleótidos.

30 Este tipo de patrón se puede realizar bien en el primer tramo o bien en el segundo tramo del RNA interferente o en ambos. Se tiene que advertir que se requiere un fosfato 5' en la hebra complementaria a la diana del dúplex siRNA para la función del siRNA, sugiriendo que las células comprueban la autenticidad de los siRNAs mediante un OH 5' libre (que puede estar fosforilado) y permiten sólo a tales siRNAs que son auténticos dirigir la destrucción del RNA diana (Nykanen, *et al.*, (2001), Cell 107, 309-21).

35 Preferiblemente, el primer tramo muestra un tipo de patrón de grupos modificados y no modificados de nucleótidos, mientras que el segundo tramo no muestra este tipo de patrón. Esto puede ser útil en la medida en que el primer tramo sea en realidad el más importante para el proceso de degradación específico a diana que subyace en el fenómeno de interferencia del RNA, de tal modo que por razones de especificidad el segundo tramo puede ser modificado químicamente para que no sea funcional en la mediación de la interferencia del RNA.

40 Sin embargo, también está dentro de la presente invención que tanto el primer tramo como el segundo tramo tengan este tipo de patrón. Preferiblemente, el patrón de modificación y no modificación es el mismo tanto para el primer tramo como el segundo tramo.

45 En una realización preferida, el grupo de nucleótidos que forman el segundo tramo y que corresponden al grupo modificado de nucleótidos del primer tramo también están modificados, mientras que el grupo no modificado de nucleótidos de o que forma el segundo tramo corresponden al grupo no modificado de nucleótidos de o que forma el primer tramo. Esta posibilidad se representa esquemáticamente en la Fig. 2A. Otra alternativa es que haya un desplazamiento de fase del patrón de modificación del primer tramo y primera hebra, respectivamente, en relación al

patrón de modificación del segundo tramo y segunda hebra, respectivamente. Preferiblemente, el desplazamiento es tal que el grupo modificado de nucleótidos de la primera hebra corresponde al grupo no modificado de nucleótidos de la segunda hebra, y viceversa. Esta posibilidad se muestra en la Fig. 2B. También está dentro de la presente invención que el desplazamiento de fase del patrón de modificación no sea completo sino solapante, como se ilustra en la Fig. 2C.

En una realización preferida, el segundo nucleótido en el término de la hebra y tramo, respectivamente, es un nucleótido no modificado o el comienzo de un grupo de nucleótidos no modificados. Preferiblemente, este nucleótido no modificado o grupo no modificado de nucleótidos está situado en el extremo 5' de la primera hebra y primer tramo, respectivamente. En una realización preferida, el patrón consiste en nucleótidos modificados y no modificados simples alternantes.

Aunque no se limita a ello, la estructura de doble hebra del ácido ribonucleico inventivo, que también se denomina dúplex, está formada por la primera hebra y la segunda hebra, respectivamente, o el primer y segundo tramo de nucleótidos contiguos. La longitud del primer tramo y segundo tramo, respectivamente, es de 18 o 19 bases. En relación con esto, hay que señalar que una longitud de menos que 30 nucleótidos, preferiblemente menos que 21 nucleótidos, no causa ningún sistema biológico que sea básicamente capaz de mostrar interferencia de RNA y también respuesta al interferón, para desarrollar una respuesta al interferón. La razón para esto reside en la observación de que una célula dada está experimentando profundos cambios fisiológicos cuando un DNA de doble hebra más largo que 30 pares de bases se une a y activa la proteína cinasa PKR y la 2',5'-oligoadenilato sintetasa. La PKR activada detiene la traducción por medio de fosforilación del eIF2a, la 2',5'-AS activada causa degradación del mRNA. Estos efectos no se desean en validación de dianas y modelos animales porque invalidan el efecto de la reducción específica a diana sobre el fenotipo.

También se describe una estrategia para el diseño de ácidos ribonucleicos interferentes según la cual el ácido ribonucleico comprende una estructura de doble hebra, en donde la estructura de doble hebra comprende una primera hebra y una segunda hebra, en donde la primera hebra comprende un primer tramo de nucleótidos contiguos y en donde dicho primer tramo es al menos parcialmente complementario a un ácido nucleico diana, y la segunda hebra comprende un segundo tramo de nucleótidos contiguos, en donde dicho segundo tramo es al menos parcialmente idéntico a un ácido nucleico diana, en donde un término de la primera hebra y un término de la segunda hebra están enlazados por una estructura de bucle.

En una realización, la estructura de bucle está comprendida de un polímero distinto a un ácido nucleico. Tal polímero distinto a un ácido nucleico puede ser polietilenglicol o polímeros similares. Los polímeros distintos a un ácido nucleico se pueden elegir, en principio, del grupo que comprende polímeros que no comprenden un polinucleótido y permiten que las dos hebras a ser enlazadas puedan hibridarse realmente una a otra. Para permitir tal hibridación, la molécula o resto de la molécula que enlaza los dos tramos que se hibridan uno con el otro tiene que tener una cierta estructura molecular o flexibilidad molecular para permitir el plegado de la molécula para permitir que ambos tramos se pongan en estrecho contacto y en una orientación tridimensional que permite la hibridación. Tal molécula o resto actúa de hecho como una bisagra. Además del polietilenglicol se pueden usar moléculas basadas en aminoácidos. Tales moléculas basadas en aminoácidos pueden ser homopolímeros o bien heteropolímeros. Un ejemplo útil es un homopolímero que consiste en siete residuos de glicina que permite la generación de una bisagra requerida para llevar los dos tramos a hibridarse en estrecha proximidad según se necesite. Esta bisagra basada en glicina se describe, p.ej., en Guan k. L. y Dixon J. E. (1991), *Anal. Biochem.* 192, 262. En otra realización, la bisagra puede estar formada por éteres corona conocidos en la técnica.

En una alternativa, el bucle está comprendido de un ácido nucleico. Tal como se emplea en la presente memoria, el LNA, como se describe en Elayadi y Corey (2001) *Curr Opin Investig drugs.* 2(4):558-61. Review; Orum y Wengel (2001) *Curr Opin Mol Ther.* 3(3):239-43; y el PNA están contemplados como ácidos nucleicos, y se pueden usar también como polímeros formadores de bucles. Básicamente, el término 5' de la primera hebra puede estar enlazado al término 3' de la segunda hebra. Como alternativa, el término 3' de la primera hebra puede estar enlazado al término 5' de la segunda hebra. La secuencia de nucleótidos que forma dicha estructura de bucle está contemplada como no crítica. Sin embargo, la longitud de la secuencia de nucleótidos que forma tal bucle parece ser crítica por razones estéricas. Por consiguiente, una longitud mínima de cuatro nucleótidos parece ser apropiada para formar la estructura de bucle requerida. En principio, el número máximo de nucleótidos que forman la bisagra o el enlace entre ambos tramos a ser hibridados no está limitado. Sin embargo, cuanto más largo es un polinucleótido, más probable es que se formen estructuras secundarias y terciarias, y por tanto la orientación requerida de los tramos es afectada. Preferiblemente, un número máximo de nucleótidos que forman la bisagra es aproximadamente 12 nucleótidos. Está dentro de la descripción de esta solicitud que cualquiera de los diseños descritos anteriormente pueda ser combinado con la presente sexta estrategia, es decir, enlazando las dos hebras covalentemente de una manera que se puede producir retoplegado (bucle) mediante una estructura de bucle.

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que si el bucle está situado 3' de la hebra antisentido, es decir, la primera hebra del (de los) ácido(s) ribonucleico(s) acordes con la presente invención, las actividades de este tipo de RNAi son más altas comparado con la situación del bucle 5' de la hebra antisentido. Por consiguiente, la disposición particular del bucle en relación a la hebra antisentido y la hebra sentido, es decir, la primera hebra y la segunda hebra, respectivamente, es crucial, y está por tanto en contraste con el conocimiento expresado en la

técnica anterior, donde se dice que la orientación no es de relevancia. Sin embargo, esto parece no ser verdad, dados los resultados experimentales presentados en la presente memoria. El conocimiento expresado en la técnica anterior se basa en la suposición de que cualquier RNAi es sometido a un procesamiento durante el que se genera RNAi no enlazado en bucle. Sin embargo, si este fuera el caso, la claramente observada actividad aumentada de aquellas estructuras que tienen el bucle situado 3' del antisentido no podrían ser explicadas. Si acaso una disposición preferida en dirección 5' → 3' de este tipo de RNAi interferente pequeño es segunda hebra-bucle-primera hebra. Los constructos respectivos se pueden incorporar en sistemas de vectores adecuados. Preferiblemente, el vector comprende un promotor para la expresión de RNAi. Preferiblemente, el promotor respectivo es pol III, y más preferiblemente los promotores son los promotores U6, H1, 7SK descritos en Good et al. (1997) *Gene Ther*, 4, 45-54.

Debido a la aplicabilidad general del concepto de RNA interferente y por tanto la reducción o eliminación para un nucleótido codificante tal como un mRNA, cualquier gen que produce tal RNA puede ser modificado en su expresión usando la molécula de ácido ribonucleico acorde con la presente invención. Debido a este básico y generalmente aplicable mecanismo, se puede realizar cualquier aplicación basada en el mismo, lo que implica la reducción o eliminación de un gen. Una aplicación preferida es el uso del ácido ribonucleico inventivo para validación de dianas. Tal como se emplea en la presente memoria, validación de dianas significará un procedimiento que implica dar pasos para probar que un DNA, RNA o molécula de proteína está implicado directamente en un proceso biológico, preferiblemente en un proceso -causalmente- implicado en una enfermedad o afección no estándar, y es por lo tanto una diana adecuada para el desarrollo de un nuevo compuesto terapéutico. Estudios de homología de secuencias han clasificado con éxito los genes en familias diana. La enorme tarea de descifrar cuál de estas dianas desempeñan papeles clave en enfermedades y cuáles se deben usar para el posterior desarrollo de fármacos necesita ser afrontada de una manera eficaz. Por lo tanto, la reducción de la expresión de genes debe ser reducido en un 50-100%, preferiblemente en un 90% para ver efectos significativos sobre el fenotipo. En otros casos, dependiendo del gen, una reducción de tan poco como 20% podría ser suficiente para dar un fenotipo. Un fenotipo será definido por comparación de células que contienen moléculas de RNAi funcionales con células que contienen moléculas de RNAi no funcionales. Esto asegurará una lectura significativa incluso bajo condiciones donde la función de la proteína es inhibida sólo parcialmente. De manera general, no hay una correlación lineal entre el grado de reducción del mRNA y la extensión del fenotipo. Se tiene que reconocer que para algunas proteínas una reducción de aproximadamente 20% de la proteína es suficiente para crear un cambio en el fenotipo, mientras que en el caso de otros genes y mRNA, respectivamente, tan poco como 5 a 10% de proteína remanente es suficiente para mantener el fenotipo observado.

Un uso adicional de las moléculas de ácido ribonucleico acordes con la presente invención es su uso para la fabricación de un medicamento o su uso como medicamento. Tal medicamento podría ser usado bien para enfermedades o bien afecciones tales como cualquier tipo de cáncer donde un gen y su producto han estado relacionados con el comienzo, causa o progresión de esta enfermedad. Adicionalmente, tal medicamento se podría usar para tratar enfermedades donde la presencia o sobreexpresión de un producto genético está causando un fenotipo patológico. En una realización preferida, la enfermedad se caracteriza por una ganancia de función, y puede ser remediada mediante la aplicación o administración del RNAi biológicamente activo correspondiente. Las enfermedades o afecciones que pueden ser tratadas por el medicamento que comprende un ácido ribonucleico como los descritos en la presente memoria se pueden seleccionar del grupo que comprende cáncer, enfermedades del corazón, enfermedades metabólicas, enfermedades dermatológicas, enfermedades inflamatorias, trastornos del sistema inmunitario o trastornos autoinmunes. Las diversas formas de cáncer incluyen, pero no se limitan a, tumores sólidos y tumores del sistema hematopoyético, tales como glioblastoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer pancreático y leucemia. Las enfermedades metabólicas incluyen, pero no se limitan a, obesidad y diabetes. Las enfermedades dermatológicas incluye, pero no se limitan a, psoriasis. En otro aspecto, las moléculas de ácido ribonucleico acordes con la presente invención se pueden usar como diagnósticos, preferiblemente para aquellas enfermedades especificadas en relación con las enfermedades y afecciones mencionadas anteriormente. Tal diagnosis podría basarse en la observación de que tras aplicar las moléculas de ácido ribonucleico acordes con la presente invención a una muestra se produce un cambio en el patrón de expresión de la muestra. Preferiblemente, tal muestra comprende células de un sujeto del que se supone que puede exhibir dicha enfermedad o afección a ser tratada.

También se describe una aplicación adicional de los ácidos nucleicos acordes con la presente invención, que es su uso en el cribado de compuestos farmacéuticamente activos y optimización de prototipos. Esta última se hace para comparar el efecto de fármacos candidatos, tales como moléculas pequeñas, y comparar el efecto creado por dichos fármacos candidatos con el efecto observado tras administrar un RNAi específico diseñado en base a los principios descritos en la presente memoria. Al hacer esto, los fármacos candidatos que tienen efectos fuera de objetivo se pueden eliminar del procedimiento de cribado, mientras que los fármacos candidatos que crean un fenotipo similar o idéntico se juzgan como compuestos principales altamente relevantes, o pueden ser incluso un compuesto farmacéuticamente activo en sí. En este método, las moléculas de RNAi altamente específicas actúan como patrón de referencia frente al que se miden los fármacos candidatos.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una célula, preferiblemente una célula reducida, que contiene un ácido ribonucleico como los descritos en la presente memoria. Tal célula es preferiblemente una célula que o bien está aislada o bien está contenida en un tejido o incluso un órgano que, de nuevo preferiblemente, no está contenido

en un organismo. Sin embargo, la célula también puede estar contenida en un organismo. La célula es preferiblemente una célula que está implicada en la enfermedad o afección que es para ser tratada por los ácidos ribonucleicos inventivos. Este tipo de células reducidas se pueden usar para generar un perfil de expresión basado en, p.ej., mRNA o proteína, a fin de elucidar la relación funcional y determinar dianas corriente abajo.

5 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un organismo que contiene un ácido ribonucleico como el descrito en la presente memoria. Preferiblemente tal organismo es un organismo vertebrado, y más preferiblemente el organismo vertebrado es un mamífero. Un mamífero, tal como se emplea en la presente memoria, es, entre otros, y no limitado a ellos, un simio, un perro, un gato, una cabra, una oveja, un cerdo, un conejillo de indias, un conejo, un
10 ratón y una rata. En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición que contiene un ácido ribonucleico acorde con la presente invención. Preferiblemente, tal composición comprende controles negativos y positivos, bien en combinación con el ácido nucleico eficaz o bien separados del mismo. Tal composición puede comprender además un disolvente, preferiblemente un tampón. En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene un ácido ribonucleico acorde con la presente invención y un
15 excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son conocidos por un experto en la técnica, y comprenden, entre otros, diluyentes, tampones y similares. La composición farmacéutica puede comprender además compuestos farmacéuticamente activos. En el caso de que en la enfermedad o afección a ser tratada se usen las moléculas de ácido ribonucleico acordes con la presente invención, son preferiblemente aquellos que ya se usan ahora en relación con el tratamiento de dichas enfermedades o afecciones. Debido al
20 diferente modo de acción de las moléculas de ácido ribonucleico acordes con la presente invención y de los medicamentos usados para el tratamiento de dichas enfermedades o afecciones según la técnica anterior, se producirán efectos sinérgicos.

La invención, definida por las reivindicaciones, será ilustrada ahora además por referencia a las figuras y ejemplos, de los que se pueden deducir rasgos, realizaciones y ventajas adicionales de la presente invención.

25 La Fig. 1 muestra una ilustración esquemática que define la terminología empleada en la presente memoria. La superior de las dos hebras es la primera hebra y la hebra antisentido del ácido nucleico que se tiene como diana, tal como mRNA. La segunda hebra es la que corresponde esencialmente en su secuencia al ácido nucleico que se tiene como diana, y por tanto forma la hebra sentido. Ambas, la primera hebra y la segunda hebra forman una estructura de doble hebra, típicamente mediante emparejamiento de bases de Watson y Crick.

30 La Fig. 2 ilustra algunas realizaciones de las moléculas de ácido ribonucleico de la presente invención con patrones de grupos modificados y no modificados de nucleótidos, lo que también se denomina en la presente memoria patrón de modificación. En la Fig. 2A los grupos modificados y no modificados de nucleótidos tanto en el primer tramo como el segundo tramo están situados en partes correspondientes de los tramos, mientras que en la Fig. 2B el patrón
35 realizado en la primera hebra también está realizado en la segunda hebra, sin embargo, con un desplazamiento de fase tal que el grupo modificado de nucleótidos del primer tramo está emparejado en bases con un grupo no modificado de nucleótidos del segundo tramo, y viceversa. En la Fig. 2C se realiza una posibilidad adicional de disposición de los grupos modificados y no modificados. También está dentro de la presente invención que el patrón del primer tramo sea independiente del patrón del segundo tramo, y que ambos patrones se solapen parcialmente en términos de posición relativa uno al otro en la estructura de doble hebra definida por el emparejamiento de bases.

40 La Fig. 3 muestra el resultado de un experimento de reducción usando moléculas de RNAi con diferentes grupos de protección terminal. Más particularmente, la Fig. 3A muestra que las diversas formas de moléculas de RNAi protegidas terminalmente son funcionales en la reducción de mRNA de PTEN.

45 La Fig. 3B muestra la secuencia de las diferentes moléculas de RNAi usadas en el experimento, el resultado del cual se representa en la Fig. 3A. La Fig. 3C muestra el resultado de un análisis inmunoblot de proteína PTEN después del tratamiento con moléculas de RNAi modificadas en comparación con constructos antisentido específicos de PTEN.

La Fig. 4 muestra que el saliente 3' de moléculas de RNAi no es importante para la interferencia de RNA. Más particularmente, la Fig. 4A muestra una curva de respuesta a la dosis de diferentes moléculas de RNAi, y la Fig. 4B muestra la secuencia de moléculas de RNAi usadas en el experimento, el resultado del cual se muestra en la Fig. 4A.

50 La Fig. 5 muestra que la longitud del dúplex de las moléculas de RNAi tiene que ser al menos 18-19 nucleótidos. Más particularmente, la Fig. 5B muestra la secuencia de las moléculas de RNAi específicas a PTEN usadas en el experimento, el resultado del cual se representa en la Fig. 5A como curva de respuesta a la dosis.

55 La Fig. 6 muestra que cuatro nucleótidos discordantes terminales en moléculas de RNAi con una longitud de 19 nucleótidos son aún funcionales en la mediación de la reducción de Akt1. Más particularmente, la Fig. 6B muestra la secuencia de las moléculas de RNAi usadas en el experimento, el resultado del cual se representa en la Fig. 6A.

La Fig. 7 muestra el resultado de estudios sobre la estabilidad en suero conferida a moléculas de RNAi por metilación 2'-O, y que las modificaciones terminales no tienen efectos beneficiosos sobre la estabilidad del RNAi. Más particularmente, la Fig. 7A muestra el resultado de una electroforesis en gel de las diversas moléculas de RNAi

representadas en la Fig. 7B que son sometidas a una incubación con suero de ternero fetal.

La Fig. 8 muestra que una modificación terminal de amino da como resultado la pérdida de actividad. La Fig. 8B muestra las moléculas de RNAi particulares usadas en los experimentos, el resultado de los cuales se muestra en la Fig. 8A. La Fig. 8C muestra los principios de diseño que se pueden deducir a partir de los resultados representados en la Fig. 8A. Tal como se emplea en la Fig. 8C, el término funcional significa funcionalmente activo en el sistema de ensayo particular descrito en el ejemplo, y "no funcional" significa no funcionalmente activo en dicho sistema.

La Fig. 9 muestra que modificaciones de 2'-O-Alquilo (metilo) estabilizan moléculas de RNAi pero también dan como resultado la reducción de su actividad. Más particularmente, la Fig. 9C muestra la secuencia de las moléculas de RNAi usadas en el experimento, el resultado del cual se representa como una curva de respuesta a la dosis en la Fig. 9A. La Fig. 9B muestra el resultado de una electroforesis en gel de las diversas moléculas de RNAi representadas en la Fig. 9C que son sometidas a una incubación de dos horas en suero de ternero fetal.

La Fig. 10 muestra el resultado de un experimento sobre la eficacia de moléculas de RNAi con bloques de modificaciones 2'-O-metilo, representando gráficamente la Fig. 10A los resultados de dichos experimentos como curva de respuesta a la dosis, y mostrando la Fig. 10C las secuencias de las moléculas de RNAi particulares usadas en dichos experimentos. La Fig. 10B muestra el resultado de una electroforesis en gel de las diversas moléculas de RNAi representadas en la Fig. 10C que son sometidas a una incubación de dos horas en suero de ternero fetal.

La Fig. 11 muestra que la modificación con 2'-O-metilo alternante da como resultado actividad de las moléculas de RNAi comparado con formas no modificadas. Más particularmente, la Fig. 11B muestra la secuencia de las moléculas de RNAi usadas en este experimento, el resultado del cual se representa en la Fig. 11A. La Fig. 11C muestra la estabilidad de dichas moléculas de RNAi después de una incubación en suero durante dos horas, mientras que la Fig. 11D muestra un inmunoblot para la proteína PTEN tras la aplicación de diferentes moléculas de RNAi a células HeLa. Como se puede deducir de la misma, las moléculas de RNAi con modificaciones alternantes están estabilizadas contra la degradación por endonucleasa y son activas en la mediación de una reducción de la proteína PTEN.

La Fig. 12 muestra el resultado de un análisis Western Blot para determinar el transcurso de tiempo de la reducción de la proteína PTEN. Las células se transfectaron de manera continua con moléculas de RNAi modificadas con 2'-O-metilo frente a no modificadas usando lípidos catiónicos durante 72 h. Se prepararon lisados de proteína y se analizaron por inmunoblot después de 48 y 120 h. Para los puntos de tiempo de 96 h y 120 h las células se dividieron, se pusieron en placa de nuevo y se incubaron en ausencia de moléculas de RNAi durante 24 y 48 h adicionales.

La Fig. 13 muestra un Western Blot que representa la reducción de proteína PTEN que es persistente usando moléculas de RNAi modificadas frente a moléculas de RNAi no modificadas. La transfección se realizó durante sólo 5 h, y se añadió medio nuevo sin reactivos de transfección. Los lisados se analizaron por inmunoblot 72 h y 96 h después de la transfección con las moléculas de RNAi indicadas.

La Fig. 14 muestra la eficacia de diversas moléculas de RNAi con estructuras de horquilla como curva de respuesta a la dosis, mientras que la Fig. 14B muestra la estructura de dichas moléculas de RNAi, el resultado de la cual se representa en la Fig. 14A. Los siRNAs sintéticos con diferentes bucles son funcionales en reducir la expresión de p110 β , Akt1 y Akt2. (14A) Inhibición de la expresión de mRNA de p110 β en células HeLa transfectadas con siRNA. Las muestras se analizaron en paralelo en cuanto al nivel de expresión de mRNA de p110 β 24 h después de la transfección de los siRNAs indicados. Los siRNAs bimoleculares transfectados (21mero con salientes TT 3', molécula 1AB) o los siRNAs monomoleculares con estructuras de bucle se muestran esquemáticamente. Nótese que la posición de los bucles (bucle pA derivado de HIV; bucle (A)₁₂) en relación a la secuencia antisentido está invertida en 3A, 4A en relación a 3B, 4B. La molécula de siRNA 2AB contiene 6 discordancias en el dúplex 21mero y sirve como control negativo junto con la muestra no tratada. El RNA se preparó y sometió a análisis RT-PCR en tiempo real (Taqman). Los niveles de mRNA de p110 β se muestran en relación a los niveles de mRNA de p110 α , que sirven como referencia interna. Cada barra representa transfecciones triplicadas (\pm desviación estándar). Las células HeLa fueron transfectadas a 50% de confluencia (2500 células por 96 pocillos) con siRNAs a las concentraciones indicadas en medio de crecimiento.

La Fig. 15 muestra la eficacia de diversas moléculas de RNAi con estructuras de bucle intermoleculares e intramoleculares como curvas de respuesta a la dosis. (15A) Inhibición de la expresión de mRNA de Akt1 en células HeLa transfectadas con siRNA. Las muestras se analizaron en paralelo en cuanto al nivel de expresión de Akt1 y Akt2 24 h después de la transfección de los siRNAs indicados. Los diferentes bucles (bucles A; bucle GAGA y un enlazador de polietilenglicol (PEG)) y su estructura secundaria putativa se muestran esquemáticamente. La molécula de siRNA 9A es específica para Akt2 y sirve como control negativo. Nótese que 10A y 10B no contienen secuencias autocomplementarias y son transfectadas en combinación. Los niveles de mRNA de Akt1 se muestran en relación a los niveles de mRNA de p110 β , que sirvieron como control interno. (15B) Inhibición de la expresión de mRNA de Akt2 en células HeLa transfectadas con las moléculas de siRNA indicadas. Los niveles de mRNA de Akt2 se muestran en relación a los niveles de mRNA de p110 β . La molécula específica de Akt1 7A sirve aquí como control negativo.

La Fig. 15C muestra un análisis Western Blot sobre proteína Akt que representa la funcionalidad de siRNAs sintéticos con diferentes bucles en reducir específicamente la expresión de Akt1 y Akt2. La inhibición de la expresión de proteínas Akt1 y Akt2 fue analizada por inmunoblot. Las células fueron recolectadas 48 h después de la transfección de los siRNAs de horquilla indicados (20 nM). Los extractos de células fueron separados por SDS-PAGE y analizados por inmunoblotting usando anticuerpo anti-p110, anti Akt 1/2. Se obtuvieron resultados similares con un anticuerpo específico para la forma fosforilada de Akt1. Las posiciones de p110 α , otra subunidad catalítica de la cinasa PI 3, que se usó como control de carga, y de Akt1, Akt2 y Akt fosforilado (P*-Akt) se indican a la izquierda.

La Fig. 16 muestra una modificación con NH₂, denominada también en la presente memoria modificación con amino, que puede estar presente bien en el nucleótido terminal en 3'-OH o bien en el nucleótido terminal en 5'. El grupo amino está unido al fosfato, que a su vez está unido al grupo OH del resto de azúcar, mediante un grupo alquilo que comprende una cadena alquílica de 1 a 8, preferiblemente 6 átomos de C, en donde el segundo átomo de C cercano al grupo fosfato tiene un grupo CH₂OH unido al mismo. Como alternativa, el enlazador puede estar formado por un éter, en donde el éter está comprendido de dos alcoholes, en donde un alcohol es un aminoalcohol y el otro es un dialcohol, con un grupo alcohol implicado en la formación del grupo éter y siendo el otro un grupo OH situado en cualquiera de los átomos de C, preferiblemente en el segundo átomo de C en relación al grupo fosfato.

Ejemplo 1: Respuesta a la dosis de moléculas de RNAi dúplex sintéticas

En este ejemplo se investigó el impacto de los grupos de protección terminal NH₂ sobre la actividad de las moléculas de RNAi dúplex. Se adquirieron siRNAs sintéticos en Biospring (Frankfurt, Alemania). Los ribo-oligonucleótidos se resuspendieron en tampón TE exento de RNasa hasta una concentración final de 50 μ M. En el caso de moléculas de siRNA bimoleculares, se combinaron alícuotas iguales (100 μ M) hasta una concentración final de 50 μ M. Para la formación de dúplex intramoleculares los siRNAs se incubaron a 50 °C durante 2 min en tampón de recocado (NaCl 25 mM; MgCl₂ 5 mM) y se enfriaron hasta la temperatura ambiente. Se llevaron a cabo transfecciones en placas de 96 pocillos o de 10 cm (a 30% a 50% de confluencia) usando diversos lípidos catiónicos tales como Oligofectamine, Lipofectamine (Life Technologies), NC388 (Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., Boulder, CO), o FuGene 6 (Roche) según las instrucciones del fabricante. Las moléculas de RNAi fueron transfectadas añadiendo complejo concentrado 5x preformado de RNAi recocado y lípido en medio exento de suero a células en medio completo. Antes de la transfección, se pusieron en placa 2500 células HeLa por pocillo, 15-18 horas antes de la transfección para el formato de 96 pocillos.

El volumen de transfección total fue 100 μ l para las células puestas en placa de 96 pocillos y 10 ml para las células en placas de 10 cm. La concentración de lípido final fue 0,8 a 1,2 μ g/ml dependiendo de la densidad celular; la concentración de RNAi se indica en cada experimento.

La formación de los complejos se dejó tener lugar durante 30 min a 37 °C. Los complejos se añadieron a las células para dar una concentración final 1x, tanto de lípido como de RNAi. Dependiendo del análisis realizado después de la transfección, las células se lisaron usando un tampón de lisis celular estándar para extracción de proteínas (Klippel, A., Escobedo, J. A., Hirano, M., y Williams, L. T. (1994). *Mol Cell Biol* 14, 2675-2685) o un tampón de desnaturalización para el aislamiento de RNA según el kit de aislamiento de RNA (Invitex, Berlín (Alemania)) 24 a 48 horas después de la transfección para el análisis de RNA y 48 a 72 horas después de la transfección para el análisis de proteínas por Western Blot.

Determinación de las cantidades relativas de los niveles de RNA por análisis Taqman:

24 h después de la transfección, el RNA de las células transfectadas en 96 pocillos se aisló y purificó usando el kit Invisorb RNA HTS 96 (Invitex GmbH, Alemania). La inhibición de la expresión de mRNA de PTEN fue detectada por análisis RT-PCR en tiempo real (Taqman) usando 300 nM del cebador 5' PTEN CACGCCAAATTTAACTGCAGA, 300 nM del cebador 3' de PTEN AAGGGTTTGATAAGTTCTAGCTGT y 100 nM de la sonda Taqman de PTEN Fam-TGCACAGTATCCTTTTGAAGACCATAACCCA-Tamra en combinación con 40 nM del cebador 5' de β -actina GTTTGAGACCTTCAACACCCCA, 40 nM del cebador 3' de β -actina GACCAGAGGCATACAGGGACA y 100 nM de la sonda Taqman de β -actina Vic-CCATGTACGTAGCCATCCAGGCTGTG-Tamra. Los cebadores y sondas de Akt se determinan en Sternberger et al. (Sternberger, a.a.O.) y se usan según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystem; uso de Set Amplicon). También, dichos cebadores y sondas se pueden diseñar usando el programa informático Primer Express (Applied Biosystem). La reacción se llevó a cabo en 50 μ l y se ensayó en el detector ABI PRISM 770 Sequence según las instrucciones del fabricante, bajo las siguientes condiciones: 48°C durante 30 min, 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C.

La reducción del RNA es mostrada por análisis RT-PCR en tiempo real de células HeLa transfectadas con moléculas dúplex de siRNA de 21 nt no modificadas y modificadas bien con grupos NH₂ o bien con abásicos invertidos en el extremo 5' a una concentración de lípido vehículo de 1,0 μ g/ml. La densidad celular fue 2000 células/pocillo. Las modificaciones en el extremo 3' son bien salientes de RNA, salientes de RNA con grupos amino o bien salientes de DNA.

Preparación de extractos celulares e inmunoblotting. Las células se lavaron dos veces con suero salino frío tamponado con fosfato, y se lisaron a 4°C en tampón de lisis que contenía Tris 20 mM (pH 7,5), NaCl 137 mM,

5 glicerol al 15% (vol/vol), Nonidet P-40 (NP-40), fluoruro de fenilmetilsulfonilo 2 mM, 10 mg de aprotinina por ml, leupeptina 20 mM, benzamidina 2 mM, vanadato de sodio 1 mM, fosfato de β -glicerol 25 mM, NaF 50 mM y NaPPI 10 mM. Los lisados se aclararon por centrifugación a 14.000 x g durante 5 minutos, y alícuotas de los extractos celulares que contenían cantidades iguales de proteína se analizaron en cuanto a la expresión de proteína por Western-blotting: Las muestras fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a filtros de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell). Los filtros fueron bloqueados en tampón TBST (Tris-HCl 10 mM (pH 7,5)), NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05% (vol/vol), azida de sodio al 0,5% (p/vol), que contenía 5% de leche seca (p/vol). Los anticuerpos respectivos se añadieron en TBST a diluciones apropiadas. El anticuerpo unido se detectó usando peroxidasa de rábano picante conjugada anti-ratón o anti-conejo (Transduction Laboratories) en TBST, se lavó, y se desarrolló usando los sustratos de quimioluminiscencia SuperSignal West Dura (Pierce) o ECL (Amersham) (véase Sternberger et al. (2002). *Antisense Nucl. Ac. Drug Dev.*, en impresión.

15 **Anticuerpos.** Se han descrito el anticuerpo anti-p110 monoclonal de murino U3A y el anticuerpo anti-p85 monoclonal de murino N7B (Klippel et al., 1994, aaO). Se obtuvieron anticuerpos anti-Akt y anti-fosfo Akt (S473) policlonales de conejo en Cell Signalling Technology. El anticuerpo anti-PTEN monoclonal de murino fue de Santa Cruz Biotechnology. La molécula antisentido específica PTEN 53, es decir, GeneBloc, se describe en Sternberg et al. [Sternberg, citado anteriormente] que tiene la secuencia siguiente (ucuccuuTTGTTTCTGcuaacga), en donde los nucleótidos representados en minúsculas son ribonucleótidos, mientras que los nucleótidos en letras mayúsculas son desoxirribonucleótidos. Esta molécula antisentido es también idéntica al RNAi 1A sin TT.

20 Los resultados se muestran en la Fig. 3A y las moléculas de RNAi respectivas en la Fig. 3B, que están dirigidas al mRNA de PTEN. Los nucleótidos escritos en letras minúsculas representan ribonucleótidos, mientras que las letras mayúsculas representan desoxirribonucleótidos. El término NH₂ indica que la posición 3' del ribonucleótido fue modificada por un grupo amino. Las moléculas de RNAi usadas en este y otros ejemplos descritos en la presente memoria también se denominan moléculas de RNA interferentes pequeñas, siRNA por sus siglas en inglés. Hay que señalar que en cualquiera de las figuras contenidas en la presente memoria la hebra superior es el antisentido o primera hebra, mientras que la hebra inferior es el sentido o segunda hebra de la molécula de RNA interferente.

25 Como se puede deducir de la Fig. 3A, las modificaciones terminales con amino, tales como modificación de amino y modificación de abásicos invertidos del grupo OH terminal del ácido nucleico, son tan potentes como los extremos no modificados cuando la modificación está situada en el extremo 3' de la hebra antisentido (véase también la Fig. 8A; 8B). Por lo tanto, la modificación química para estabilizar o proporcionar otras propiedades beneficiosas (administración) será tolerada sin pérdida de actividad cuando esté situada en el OH 3'; especialmente cuando el OH 3' esté situado en un nucleótido saliente.

30 Para el experimento mostrado en la Fig. 3C se usaron condiciones similares a las bosquejadas anteriormente. La primera hebra y la segunda hebra del RNAi fueron modificadas bien por un grupo NH₂ en la posición 3' del resto de ribosa o bien por un abásico invertido en dichas posiciones. El primer constructo se designa como siRNA-NH₂ (3A3B), el segundo como siRNA-iB (4A4B). La secuencia de ambas moléculas se representa en la Fig. 3B. El término 3A3B indica que el ácido ribonucleico interferente consiste en la hebra 3A como hebra antisentido y la hebra 3B como hebra sentido. Por razones de comparación, se generó un oligonucleótido antisentido designado como GB53 (Steinberger et al., citado anteriormente), que fue dirigido contra el mRNA de PTEN también. Las particularidades de este último experimento fueron como sigue.

40 Como se puede deducir de la Fig. 3C, las moléculas de RNAi protegidas terminalmente representadas en la Fig. 3B son funcionales en dar una reducción de la proteína PTEN.

De este ejemplo se puede deducir que ambos grupos de protección terminal dan moléculas de RNAi activas en reducir la proteína PTEN. Esta inhibición es tan eficaz como la inhibición con constructos antisentido pero a concentraciones usadas más bajas, lo que es una clara ventaja sobre la ya muy poderosa tecnología antisentido.

45 **Ejemplo 2: Requisitos de los salientes para la actividad del dúplex de RNAi in vivo**

Los procedimientos experimentales fueron los mismos que los representados en relación con el ejemplo 1, excepto que las moléculas de RNAi interferente que tienen como objetivo el mRNA de PTEN fueron diseñadas de manera diferente. Los resultados se muestran en la Fig. 4A como curvas de respuesta a la dosis, mostrando la Fig. 4B la secuencia particular y modificaciones de las moléculas de RNAi interferentes usadas para generar los datos representados en la Fig. 4A. La nomenclatura es tal que, p.ej., el RNAi 18 está compuesto de la hebra 18A como hebra antisentido y la hebra 18B como hebra sentido.

50 Se comparan moléculas de extremo romo con moléculas con salientes 3' (RNAi 18) y salientes 5' (RNAi 30 y RNAi 31) en su actividad para reducir el mRNA de PTEN en células Hela. La actividad de las moléculas de extremo romo (RNAi 28) y moléculas con salientes 5' es comparable a la actividad de moléculas con salientes 3'. Esto muestra que los salientes 3' no son esenciales para la actividad del RNAi.

Ejemplo 3: Requisitos de longitud de dúplex de moléculas de RNA interferente para la actividad de RNAi in vivo

El método experimental fue similar al bosquejado en relación con el ejemplo 1, excepto que las moléculas de RNA interferente fueron dirigidas contra el mRNA de Akt1. El control negativo para mostrar la especificidad de las moléculas de RNA fue de nuevo mRNA de p110. Los resultados experimentales se muestran en la Fig. 5A, siendo representadas las particularidades de las moléculas de RNAi interferente usadas en la Fig. 5B.

El análisis Taqman sobre RNA de Akt de células Hela transfectadas con diferentes moléculas de RNAi muestra que el dúplex de doble hebra de las moléculas de siRNA tiene que ser más largo que 17 pares de bases para mostrar actividad, mientras que las moléculas con dúplex de 17 pares de bases de longitud o más cortos no son funcionales aunque se añadan salientes específicos de secuencia. Las moléculas de RNAi más cortas ensayadas con éxito fueron de 18 a 19 nucleótidos o pares de bases de longitud. Hay que señalar que el diseño de la molécula de RNA interferente 51A/51B, denominada RNAi 51, corresponde a la descrita en la solicitud de patente internacional WO 01/75164. La molécula de RNAi 55A/55B comprende un tramo de 17 nucleótidos y tiene una actividad claramente disminuida en términos de degradación del mRNA de Akt1.

Dados los resultados experimentales, el requisito mínimo para la interferencia mediada por RNAi óptima es por tanto una longitud de dúplex de 18 o 19 nucleótidos, independiente del diseño adicional de las moléculas de RNAi tal como extremo romo o saliente en 5' o cualquier otra forma descrita en la presente memoria, pero aplicable generalmente a las moléculas de RNAi. Sin embargo, se tiene que reconocer que el diseño particular de las moléculas de RNAi puede conferir ventajas adicionales a dichas moléculas, tales como. p.ej., eficacia aumentada y estabilidad aumentada, respectivamente.

Ejemplo 4: Requisitos de homología diana-antisentido para RNAi in vivo

La configuración experimental fue similar a la descrita en el ejemplo 1, en donde el RNAi es específico para Akt1. Además, se diseñó una molécula de RNA interferente específica a PTEN y se usó como control negativo. Los resultados se muestran en la Fig. 6A y La Fig. 6B.

Habiendo establecido la longitud mínima del dúplex de 18 o más que 18 nucleótidos para moléculas de siRNA funcionales, los autores de la invención se han hecho la pregunta de cuántos nucleótidos concordantes entre el mRNA diana y el siRNA son necesarios para silenciar la actividad. Como muestra el análisis Taqman sobre RNA de Akt1, un tramo de 19 a 15 nucleótidos que concuerdan perfectamente con el RNA diana, en el presente caso Akt1, es suficiente para mediar en la actividad del RNAi. Una molécula de RNAi específica de PTEN no reduce las cantidades de RNA de Akt1, confirmando así la especificidad de este método. Los discordancias de uno o dos nucleótidos en cualquiera o ambos extremos de una hebra son funcionales, lo que sugiere que un tramo homólogo de 15 nt entre un mRNA diana y RNAi es suficiente para el silenciamiento de genes. Se puede concluir a partir de estos datos que se puede producir un silenciamiento de genes inespecífico por casualidad mediante unión inespecífica a dianas no relacionadas. Esto se basa en el entendimiento de que un tramo de 15 a 17 pares de bases concordantes no es específico para un único gen y se producirá por casualidad considerando la complejidad y tamaño del genoma o transcriptosoma de los vertebrados.

En base a esta observación, la presente invención va a reducir este problema inespecífico del siRNA mediante dos métodos. Primero, reduciendo la longitud de molécula de las moléculas de siRNA a los requisitos mínimos (18-19 nt) y de este modo reduciendo la posibilidad de homología a dianas inespecíficas. Segundo, por inactivación de la hebra sentido para impedir un silenciamiento de RNA no deseado causado por complementariedad accidental de la hebra sentido a un RNA diana no relacionado (véase también el Ejemplo 6).

Ejemplo 5: Estabilidad de moléculas de RNAi modificadas en suero

Se incubaron oligonucleótidos en suero humano durante 15 min y dos horas, y se cargaron en gel de poliacrilamida al 10% con controles no tratados. Los resultados se muestran en la Fig. 7A. Las diversas moléculas de RNAi usadas se muestran y describen en más detalle en la Fig. 7B.

A partir de este ejemplo, se puede deducir que el dúplex RNAi de moléculas de RNA con todos los nucleótidos modificados con grupos 2'-O-metilo (moléculas de RNAi 79A79B y 28A28B) tienen una estabilidad más alta en suero. También se muestra que un dúplex romo es más estable que la molécula dúplex con salientes. A partir de esta conclusión, se puede extraer que la protección terminal (p.ej., iB o Amino) no está aumentando la estabilidad en suero.

Además, también se puede concluir que, en contraste con el conocimiento en la técnica anterior a la presentación de esta solicitud, las endonucleasas, en lugar de las exonucleasas, son más importantes en la protección de las moléculas de RNAi.

A la vista de esto, además de las diversas modificaciones o diseños de las moléculas de RNAi inventivas descritas en esta solicitud, una modificación adicional o posterior de los nucleótidos puede ser el uso de una cadena principal de fosforotioato de las moléculas de RNAi, que puede ser bien completa o bien parcial, a fin de inhibir la función de

la endonucleasa. Una cadena principal de fosforotioato completa significa que cualquiera de los nucleótidos exhibe un grupo fosforotioato, mientras que una cadena principal de fosforotioato parcial significa que no todos los nucleótidos que forman la molécula de RNAi tienen una modificación de fosforotioato. Esta modificación es adecuada para aumentar la vida de moléculas de RNAi independientemente del diseño adicional de las moléculas de RNAi. A este respecto, un RNAi parcial o completamente modificado con fosforotioato es asunto de la presente invención, que se puede realizar en relación con las diferentes estrategias para el diseño de moléculas de RNA interferentes descritas en la presente memoria o con cualquiera de los diseños conocidos en la técnica.

Ejemplo 6: Inactivación de la hebra sentido por grupos de protección terminal NH₂ en los extremos 5' y 3'

La configuración experimental fue similar a la descrita en relación con el ejemplo 1, siendo la secuencia de ácido nucleico diana mRNA de PTEN. La concentración de células Hela fue 2.000 células por pocillo. El RNA de PTEN fue analizado en ensayos Taqman después de la transfección de moléculas de RNAi modificadas de manera diferente. Las diferentes moléculas de RNA interferente usadas se representan en la Fig. 8B, mientras que los resultados experimentales se muestran en la Fig. 8A.

Como se puede deducir a partir de las curvas de respuesta a la dosis de las diversas moléculas de RNAi representadas en la Fig. 8A, las moléculas de RNAi son funcionales cuando la hebra sentido, es decir, la segunda hebra, está modificada en ambos extremos con grupos amino. Particularmente eficaces son las moléculas de RNAi 20A26B, 18A26B y 28A26B. La actividad más baja es mostrada por la molécula de RNAi 26A26B, que corresponde a una modificación terminal en todos los 4 extremos del dúplex (la de Tuschl es 18AB).

Sin embargo, también se consigue actividad del RNAi cuando la hebra antisentido, es decir, la primera hebra, está modificada sólo en el extremo 3' dejando un grupo OH libre en el extremo 5' (constructos de RNAi 22A26B; 20A26B). No hay actividad cuando la hebra antisentido está modificada con grupos amino tanto en el extremo 5' como 3' (26A26B). Esto conduce a la conclusión de que cualquier extremo de la hebra antisentido y más particularmente el extremo 5' del antisentido debería ser mantenido sin modificaciones. Adicionalmente, merece la pena reseñar que la modificación terminal con NH₂ se puede usar para inactivar la hebra sentido en el extremo 5' y 3' y por lo tanto reducir efectos fuera de objetivo mediados por una hebra sentido por lo demás funcional, lo que da como resultado una especificidad significativamente aumentada de la molécula de RNAi, lo que es ventajoso para la validación de objetivos así como para cualquier uso médico de la molécula de RNAi.

La generalización adicional de los resultados de este experimento se representa en la Fig. 8C. Los RNAi funcionalmente activos son por consiguiente los que no tienen una modificación de amino en la hebra antisentido o que tienen una modificación de amino sólo en el extremo 3' de la hebra antisentido, mientras que una modificación de amino en ambos extremos de la hebra antisentido no es funcional, es decir, no da como resultado una reducción del mRNA diana.

Ejemplo 7: Impacto de la modificación con 2'-O-metilo de moléculas de RNAi para protección frente a endonucleasa.

La reducción del RNA se muestra de nuevo usando el análisis RT-PCR en tiempo real sobre células Hela transfectadas con moléculas dúplex de RNAi dirigidas contra el mRNA de PTEN, como se representa en la Fig. 9A. Los procedimientos experimentales fueron básicamente los mismos que los especificados en el ejemplo 1. La estructura de las moléculas de RNAi investigadas y sus respuestas a la dosis, que se representan en la Fig. 9A, se muestran en la Fig. 9C. Los nucleótidos impresos en negrita son los que tienen una modificación 2'-O-metilo.

Las curvas de respuesta a la dosis mostradas para diversas moléculas de RNAi en la Fig. 9A ilustran que los grupos 2'-O-alquilo internos están reduciendo la actividad del RNAi. Preferiblemente, tales grupos 2'-O-alquilo son grupos 2'-O-metilo o 2'-O-etilo. Sin embargo, las moléculas con nucleótidos no modificados en combinación con modificación 2'-O-alquilo muestran actividad significativa. Como se representa también en la Fig. 9A, no hay actividad cuando la hebra antisentido está modificada toda con grupos 2'-O-metilo y la hebra sentido no está modificada (véase, p.ej., la molécula de RNAi 79A28B). Tomados los resultados de un ensayo de estabilidad tal como la incubación de las diversas moléculas de RNAi en suero, como se representa en la Fig. 9B, se muestra que las modificaciones con 2'-O-alquilo estabilizan las moléculas de RNAi contra la degradación. Este efecto claramente beneficioso, sin embargo, es al menos hasta cierto punto contrarrestado por el efecto de que las modificaciones con 2'-O-alquilo dan como resultado generalmente una actividad de reducción disminuida. Por consiguiente, el diseño de moléculas de RNAi tiene que equilibrar estabilidad contra actividad, lo cual hace que sea importante conocer los diversos principios de diseño descritos en la presente solicitud.

Ejemplo 8: Impacto de bloques de modificaciones de 2'-O-metilo internas sobre la estabilidad de moléculas de RNAi en suero

El método experimental en relación con este estudio fue en realidad el mismo que el representado en el ejemplo 1. De nuevo, se analiza mRNA de PTEN por RT-PCR en tiempo real sobre células Hela a una densidad de 2000 células/pocillo que fueron transfectadas con diferentes dosis de moléculas de RNAi. Las moléculas de RNAi fueron incubadas en suero durante dos horas y analizadas en un gel de poliacrilamida al 10%. Los resultados de este estudio se ilustran en la Fig. 10A a 10C, en donde la Fig. 10A muestra la respuesta a la dosis de las diversas

moléculas de RNAi representadas en la Fig. 10C, y la Fig. 10B muestra el resultado de un ensayo de estabilidad usando algunas de las moléculas de RNAi representadas en la Fig. 10C. Se tiene que reconocer que los nucleótidos escritos en negrita en la Fig. 10C son los que llevan una modificación, que es en el presente caso una modificación con 2'-O-metilo del resto de ribosa de los nucleótidos.

- 5 Hay una inhibición dependiente de la dosis por parte de las moléculas de RNAi no modificadas. También se muestra que la modificación con 2'-O-metilo de los 9 nucleótidos centrales hace al RNAi estable en suero y permite la actividad del dúplex en el sentido de mediar en el fenómeno de interferencia que conduce a una degradación del mRNA de PTEN. La modificación total de la hebra sentido hace a la molécula de RNAi estable en suero y permite cierta actividad.
- 10 Bloques alternantes de 5 nucleótidos con modificación con 2'-O-metilo hace a la molécula de RNAi estable en suero y permite la actividad sobre mRNA de PTEN como se muestra incubando el dúplex de RNAi en suero durante dos horas y cargando las muestras en un gel de poliacrilamida al 10%. Como se puede deducir de la Fig. 10B, el dúplex que comprende las hebras 80A y 80B es fuertemente degradado después de la incubación en suero durante dos horas. El dúplex que consiste en las hebras 82A y 82B confirma el resultado de que el extremo 5' de la primera hebra que comprende la hebra antisentido no debe ser modificada en los nucleótidos terminales en 5' (compárese 82A82B con el 81A81B orientado a la inversa). Esto también es confirmado por los resultados obtenidos teniendo el dúplex que consiste en las hebras 86A y 86B que es tanto activo como estabilizado en suero. Es digno de mención que las moléculas con bloques no modificados en el terminal 5' de la hebra antisentido son más activas, por lo que el grupo OH 5' terminal preferiblemente no está derivatizado.
- 20 Se llevaron a cabo experimentos adicionales usando diferentes patrones de modificación con 2'-O-metilo de los nucleótidos. Los resultados de los mismos se muestran en la Fig. 11A a 11C y se discuten adicionalmente en la presente memoria en el ejemplo 9.

Ejemplo 9: El impacto de alternar modificación con 2'-O-alquilo interna sobre la estabilidad en suero de moléculas de RNAi.

- 25 La configuración experimental para realizar este tipo de estudio fue la misma que la usada en relación con los estudios reportados en el ejemplo 1 y en el ejemplo 8, respectivamente, siendo de nuevo el ácido nucleico diana mRNA de PTEN. Se transfectaron células Hela con las diferentes moléculas de RNAi representadas en la Fig. 11B, y la reducción del RNA se demostró usando RT-PCR en tiempo real sobre RNA de PTEN de una manera dependiente de la dosis (Fig. 11A). La estabilidad de las diversas moléculas de RNAi después de 15 min y dos horas en suero a 37°C se representa en la Fig. 11C, y un Western Blot para p110 y PTEN como proteína diana de las diversas moléculas de RNAi se representa en la Fig. 11D, siendo las moléculas de RNAi ensayadas las mismas tanto en los experimentos que subyacen en la Fig. 11C como en la Fig. 11D.

- 35 Como se ilustra en la Fig. 11A y la Fig. 11C, los nucleótidos modificados con grupos 2'-O-metilo alternantes con nucleótidos no modificados hacen a las moléculas de RNAi estables en suero, a la vez que todavía las permiten ser activas en el sentido de interferir con el mRNA diana. Se muestra que la incubación de moléculas dúplex de RNAi durante 15 min y dos horas en suero degradará el dúplex no modificado y el dúplex en el que los 10 nucleótidos más posicionados en 5' son no modificados.

- 40 En las moléculas de RNAi representadas en la Fig. 11B se realizan diversos patrones de nucleótidos modificados y no modificados. La molécula de RNAi 94A1/94B1 comprende una estructura en la que un nucleótido modificado está flanqueado por un nucleótido no modificado, estando el nucleótido no modificado situado en el extremo 5' de la primera hebra. La molécula de RNAi comprendida de las hebras 94A2 y 94B2 es otro ejemplo donde los nucleótidos modificados y los nucleótidos no modificados de la primera y la segunda hebra están situados en sitios opuestos. En contraste a esto, la molécula de RNAi comprendida de las hebras 94A1 y 94B2 tiene el mismo patrón de nucleótidos modificados y no modificados. Sin embargo, hay un desplazamiento de fase tal que el nucleótido modificado forma emparejamiento de bases con un nucleótido no modificado. Las dos moléculas de RNAi comprendidas de las hebras 94A1 y 94B1 y las hebras 94A2 y 94B2 difieren unas de otras de tal modo que en el primer caso la primera hebra empieza con un nucleótido no modificado, y el correspondiente primer nucleótido de la segunda hebra, es decir, el nucleótido en el extremo 3' de la segunda hebra, empieza con un nucleótido no modificado, siendo la disposición opuesta a esta en la molécula de RNAi comprendida de 94A2 y 94B2.

- 50 Adicionalmente, las moléculas de RNAi modificadas de manera alternante que se representan en la Fig. 11B son funcionales en mediar una reducción de la proteína PTEN, como se muestra en la Fig. 11D, pero sólo cuando el segundo nucleótido 5' y segundo nucleótido 3' terminal no está modificado (véase 94A294B1 y 94A294B2). Tomados conjuntamente, estos datos muestran que las moléculas de RNAi más estables y más activas sí tienen residuos de nucleótidos modificados con 2' alquilo y no modificados alternantes. Se debe señalar que estas moléculas sí muestran una reducción del mRNA muy similar cuando se comparan con moléculas de siRNA no modificadas que siendo estables en suero permiten un manejo mayor o más fácil.

Ejemplo 10: Reducción funcional de proteínas mediada por moléculas de RNAi modificadas internamente

El método experimental fue similar al bosquejado en relación con el ejemplo 1.

Se realizaron Western Blots sobre células HeLa recolectadas a diversos puntos de tiempo después de la transfección (48, 72, 96 y 120 horas) con moléculas de RNAi modificadas de manera alternante, representadas en la Fig. 11B. Por razones experimentales, es digno de mención que en el punto de tiempo de 96 horas las células se habían dividido, y la mitad de la población fue vuelta a poner en placa. Se aplicó un total de 40 nM de las diversas moléculas de RNAi a las células. Las células fueron transfectadas de manera continua durante 72 h con lípidos catiónicos como se describe en el ejemplo 1; después, se volvieron a poner en placa en ausencia de reactivos de transfección.

Las transfecciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos o de 10 cm (a 30% a 50% de confluencia) usando diversos lípidos catiónicos tales como Oligofectamine, Lipofectamine (Life Technologies), NC388, L8 (Atugen, Berlín), los RNAi fueron transfectados añadiendo complejo concentrado 5x preformado de siRNAs y lípido en medio exento de suero a células en medio completo. El volumen de transfección total fue 100 μ l para las células puestas en placa de 96 pocillos y 10 ml para las células en placas de 10 cm. La concentración de lípido final fue 0,8 a 1,2 μ g/ml dependiendo de la densidad celular; la concentración de siRNA se indica en cada experimento.

El resultado del análisis Western Blot se representa en la Fig. 12. Como se puede deducir a partir de esta Figura, las moléculas de RNAi modificadas de la versión 94A2B1 y 94A2B2 dan una reducción de la proteína PTEN de duración más larga que las moléculas no modificadas. La falta de reducción de la proteína vista también en la Fig. 11 con las moléculas de la versión 94A1B1 y 94A1B2 es confirmada en este experimento. Las moléculas no modificadas (80AB) no son tan potentes en apoyar la reducción de proteína de larga duración cuando las células no son transfectadas de manera continua.

Ejemplo 11: Reducción persistente de la proteína PTEN con modificaciones de 2'-O-metilo alternantes de moléculas de RNAi

El método experimental fue similar al bosquejado en relación con el ejemplo 10, con la excepción de que la transfección fue terminada después de 5 h reemplazando el medio de transfección con medio nuevo. El protocolo fue ligeramente modificado, de tal modo que para cada una de las moléculas de RNAi se realizó una concentración de 40 nM usando una solución madre de 1 μ g de RNAi/ml de lípido catiónico descrito en relación con el ejemplo 1. 5 horas después de la transfección, se retiró el medio y se añadió EMEM fresco. Las células se dividieron después de 72 h, siendo la mitad de las células lisadas y la otra mitad puesta en placa nuevamente y lisada 24 h más tarde (96 h post-transfección). El resultado de un análisis Western Blot usando 3 moléculas de RNAi diferentes (80AB, 94A1/B2, 94A2/B1) se representa en la Fig. 13. Como control positivo se usaron células no tratadas. La Fig. 13 muestra la expresión de PTEN después de 72 h y 96 h, respectivamente. Tomadas las particularidades estructurales de las diversas moléculas de RNAi, se puede deducir a partir de la Fig. 13 que la reducción de la proteína es persistente con moléculas alternantes del tipo 94A2B1, incluso por encima de 96 h después de dividir y volver a poner en placa las células, en comparación con moléculas de RNAi no modificadas (tales como 80 AB) y la molécula de RNAi 94A1B2.

Ejemplo 12: Diferentes estructuras de bucle son funcionales en mediar la interferencia de RNA

Para ensayar si las moléculas de RNAi, preferiblemente moléculas de RNAi sintéticas con estructuras autocomplementarias, pueden inhibir la expresión de genes tan eficazmente como las moléculas de siRNA de doble hebra estándar, se transfectaron células HeLa con siRNAs sintéticos específicos de p110 β . Las transfecciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos o de 10 cm (a 30% a 50% de confluencia) usando diversos lípidos catiónicos tales como Oligofectamine, Lipofectamine (Life Technologies); se transfectaron GeneBlocs añadiendo complejo concentrado 5 x preformado de GB y lípido en medio exento de suero a células en medio completo. El volumen de transfección total fue 100 μ l para las células puestas en placa de 96 pocillos y 10 ml para las células en placas de 10 cm. La concentración de lípidos final fue 0,8 a 1,2 μ g/ml dependiendo de la densidad celular; la concentración de la molécula de RNAi se indica en cada experimento.

Una titulación dependiente de la dosis no mostró diferencia significativa en la eficacia de reducción del mRNA conseguida por la doble hebra 21mero bimolecular estándar y las correspondientes moléculas monomoleculares analizadas por PCR en tiempo real (Taqman) (Fig. 14A). Dos diferentes estructuras de bucle, un bucle (A)₁₂ y un bucle pA derivado de HIV fueron ensayadas en paralelo, con resultados similares. Una comparación de la posición relativa de la secuencia antisentido y la estructura de bucle reveló una eficacia de reducción mejorada con la secuencia antisentido estando situada 3' al bucle (Fig. 14B; compárense los constructos 3A, 3B y 4A, 4B).

EJEMPLO 13: Estudios sobre la eficacia de diferentes bucles de horquilla intramoleculares y "burbujas" intermoleculares

Se ensayó la influencia de diferentes estructuras de bucle sobre la inhibición de mRNA y la expresión de proteínas. Para estos experimentos, se eligieron como dianas la Akt1 y la Akt2. El método experimental fue similar al descrito en el ejemplo 12.

Significativamente, la reducción en mRNA de Akt1 representada en la Fig. 15A y la Fig. 15B, así como los niveles de proteína Akt1 representados en la Fig. 15C, fue completamente independiente de la estructura de bucle ensayada (compárense las moléculas 5A, 6A, 7A, 8A) (la estructura de la moléculas de RNAi ensayada se representa siempre

- debajo del diagrama de barras). Incluso una molécula que contiene una estructura más bien no fisiológica, tal como un enlazador de polietilenglicol (PEG) como bucle redujo eficazmente la expresión de Akt1, indicando que el tamaño y secuencia de nucleótidos del bucle no es crucial (Fig. 15A; molécula 8A). Se usó una molécula de siRNA sintética específica para Akt2 (9A) para controlar la especificidad, y no tuvo efecto sobre los niveles de Akt1, como se muestra en la Fig. 15A. Esta molécula, sin embargo, silenció eficazmente la expresión de Akt2 (Fig. 15B; Fig. 15C).
- 5 Las moléculas de RNA autocomplementarias con estructuras de bucle tienen la posibilidad de recombinarse como hebras dobles en estructuras monomoleculares o bimoleculares bajo condiciones de hibridación fisiológica (Fig. 15B, estructura de bucle o burbuja). Para responder a la pregunta de si las moléculas de siRNA ejercen su función adaptando un bucle intramolecular o una "burbuja" intermolecular (mostrada esquemáticamente en la Fig. 15B), se
- 10 transfectaron dos moléculas no capaces de retroplegarse sobre sí mismas. Estos constructos contenían secuencias específicas a Akt1 y Akt2 dentro de la misma molécula (Fig. 15B, constructos 10A, 10B) y fueron diseñados para ser restringidos para formar un dúplex molecular ("burbuja"). Sorprendentemente, esta molécula medió eficazmente tanto en la reducción de mRNA de Akt1 como de Akt2, así como en la reducción de proteína cuando se transfectó después de la recombinación de ambas hebras.
- 15 El que las estructuras de bucle y de burbuja sean en efecto sustratos para enzimas procesadoras de RNA, p.ej., *Dicer*, no está claro en este punto. Un reciente estudio de Paddison y colaboradores sugiere que siRNAs que contienen horquillas son más dependientes de la actividad del *Dicer* que siRNAs de doble hebra. Sin embargo, estos datos que demuestran la actividad de interferencia de RNA usando una molécula enlazadora de PEG indican que es probable que la secuencia del enlazador sea irrelevante.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ácido ribonucleico que media en la interferencia de RNA, que comprende una estructura de doble hebra, en donde la estructura de doble hebra comprende una primera hebra y una segunda hebra, en donde la primera hebra comprende un primer tramo de nucleótidos contiguos y en donde dicho primer tramo es al menos parcialmente complementario a un ácido nucleico diana, y la segunda hebra comprende un segundo tramo de nucleótidos contiguos, en donde dicho segundo tramo es al menos parcialmente idéntico al ácido nucleico diana, caracterizado porque la estructura de doble hebra es de extremo romo en ambos lados de la doble hebra y la longitud de dicha primera hebra y dicho primer tramo y la longitud de dicha segunda hebra y dicho segundo tramo es de 18 o 19 bases, para uso en un método para el tratamiento de una enfermedad.
- 10 2. El ácido ribonucleico según la reivindicación 1, en donde al menos un nucleótido del ácido ribonucleico tiene una modificación en la posición 2', y la modificación se selecciona preferiblemente del grupo que comprende amino, fluoro, metoxi y alquilo.
3. El ácido ribonucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la complementariedad entre dicha primera hebra y el ácido nucleico diana es perfecta.
- 15 4. El ácido ribonucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el dúplex formado entre la primera hebra y el ácido nucleico diana comprende al menos 15 nucleótidos, en donde hay un discordancia o dos discordancias entre dicha primera hebra y el ácido nucleico diana que forman dicha estructura de doble hebra.
- 20 5. El ácido ribonucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el gen diana se selecciona del grupo que comprende genes estructurales, genes constitutivos, factores de transcripción, factores de motilidad, factores del ciclo celular, inhibidores del ciclo celular, enzimas, factores de crecimiento, citocinas y supresores de tumores.
- 25 6. El ácido ribonucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la enfermedad se selecciona del grupo que comprende glioblastoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer pancreático y leucemia, diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares y enfermedades metabólicas.
7. Uso de un ácido ribonucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la fabricación de un medicamento.
- 30 8. El uso según la reivindicación 7, en donde el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad o de una afección que se selecciona del grupo que comprende glioblastoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer pancreático y leucemia, diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares y enfermedades metabólicas.
9. Una célula, preferiblemente una célula reducida, que contiene un ácido ribonucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde si la célula es una célula humana, la célula humana es una célula humana aislada.
- 35 10. Un organismo, preferiblemente un organismo reducido, que contiene un ácido ribonucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el organismo es diferente de un ser humano.
11. Una composición que contiene un ácido ribonucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
12. Una composición farmacéutica que contiene un ácido ribonucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Fig. 1:

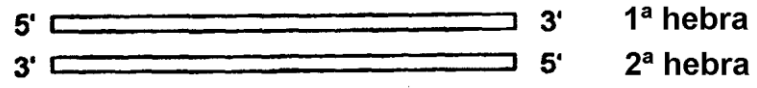


Fig. 2:

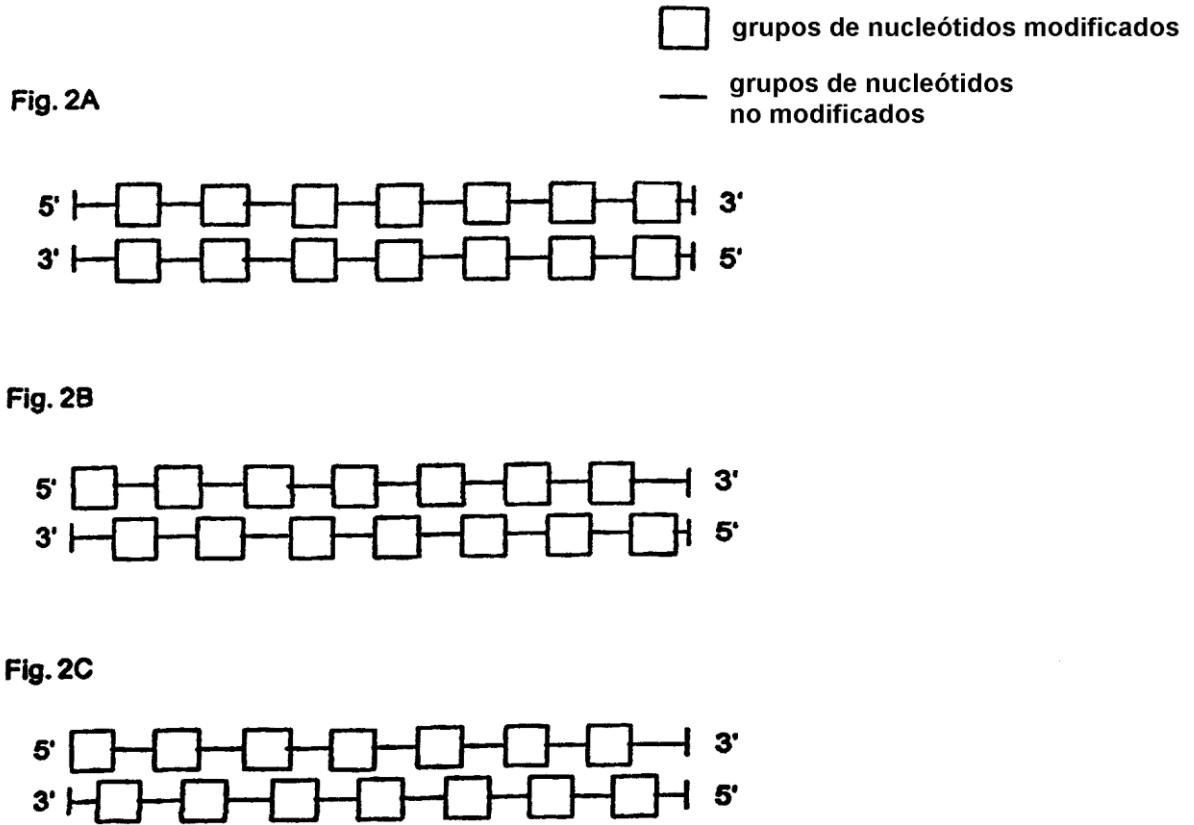
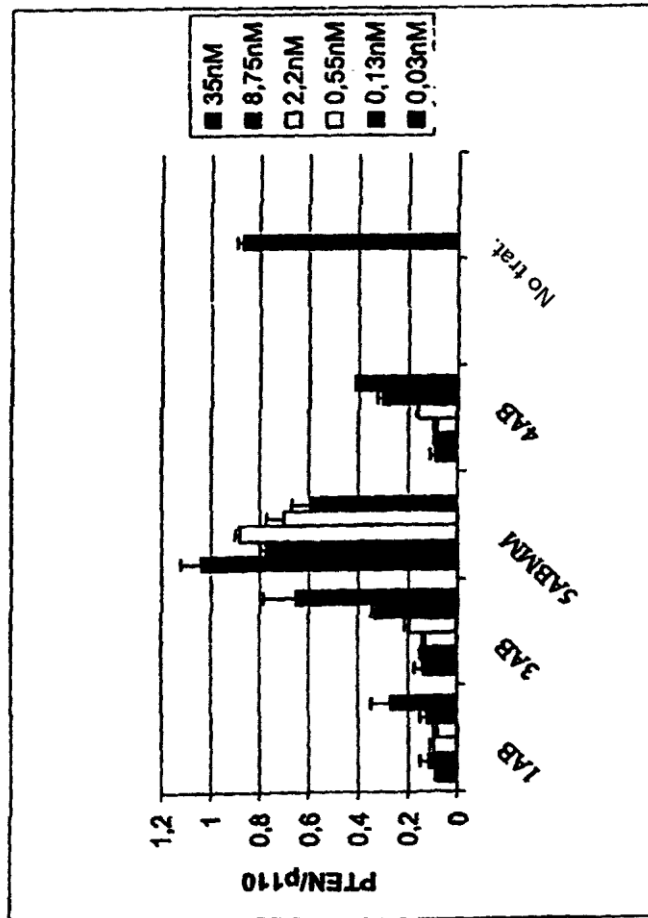


Fig.3



3A

SÓLO RNA CON 2 DESOXI EN CADA EXTREMO
1A 5'- cuccuuuuuuucugcuaacg-tt
1B 3'-tt-gaggaacacaaagacgaugc

SÓLO RNA CON GRUPOS NH2 EN CADA EXTREMO 3' Y 2 DESOXI
3A 5'- cuccuuuuuuucugcuaacg-tt-nh2
3B 3'-nh2-tt-gaggaacacaaagacgaugc

SÓLO RNA CON ABÁSICO INVERTIDO Y 2 TT
4. 16153-1B (1B at the 3' ends)
4A 5'- cuccuuuuuuucugcuaacg-tt-1b
4B 3'-1b-tt-gaggaacacaaagacgaugc

SÓLO RNA CON 2 DESOXI EN CADA EXTREMO
5AM 5'- cuccuuuuuuucugcuaacg-tt
5BM 3'-tt-gaggaacacaaagacgaugc

3B

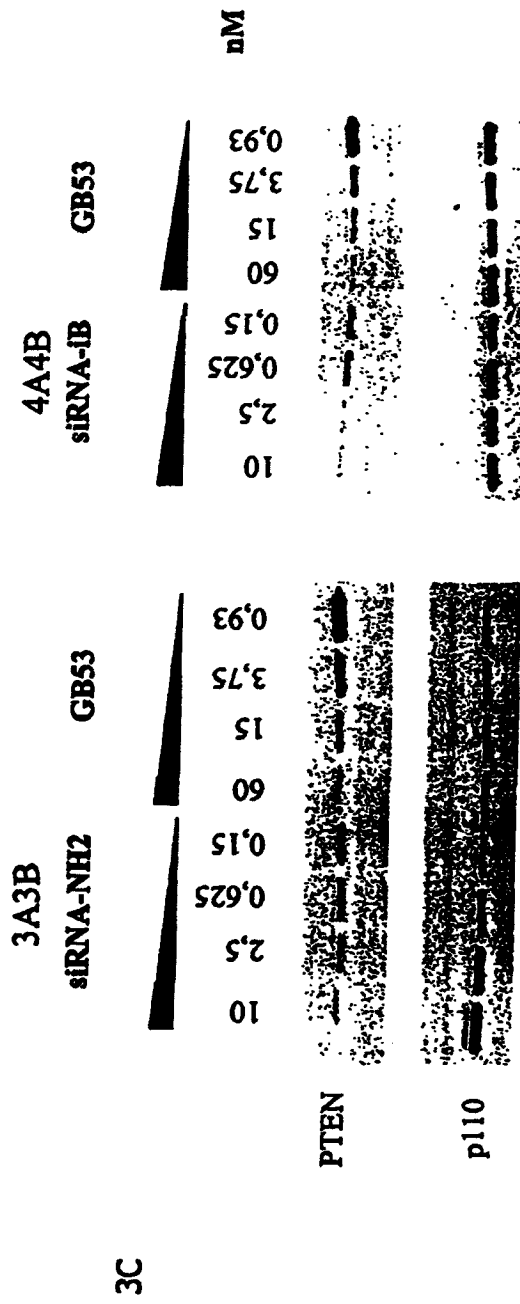
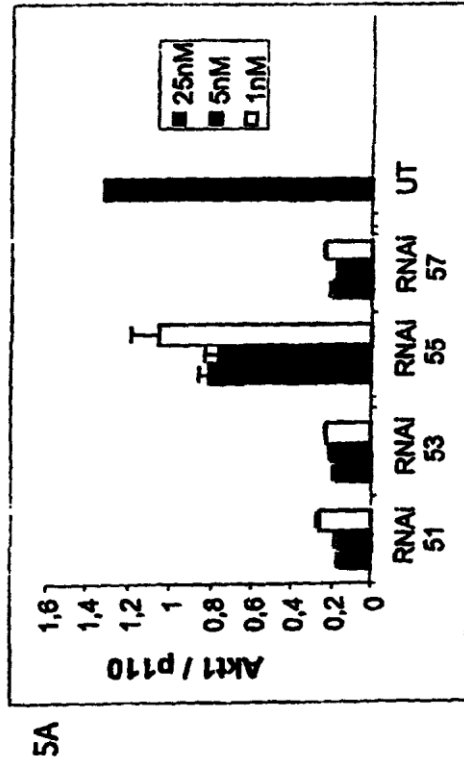


Fig. 5



5B

51A	5' -	-ucuuugauguacuucccucg-uu	19 nt 3' uu
51B	3' -	uu-agaacuacaugaggaggagc-	
53A	5' -	-ucuuugauguacuucccucg-tt	19nt 3' RNA específico sec.
53B	3' -	cc-agaacuacaugaggaggagc-	
55A	5' -	-cuugauguacuucccuc-gt	17nt 3' RNA específico sec.
55B	3' -	ca-gaacuacaugaggaggag-	
57A	5' -	-ucuuugauguacuucccucg- TT	19nt 3' RNA específico sec.
57B	3' -	CC -agaacuacaugaggaggagc-	

Fig. 6

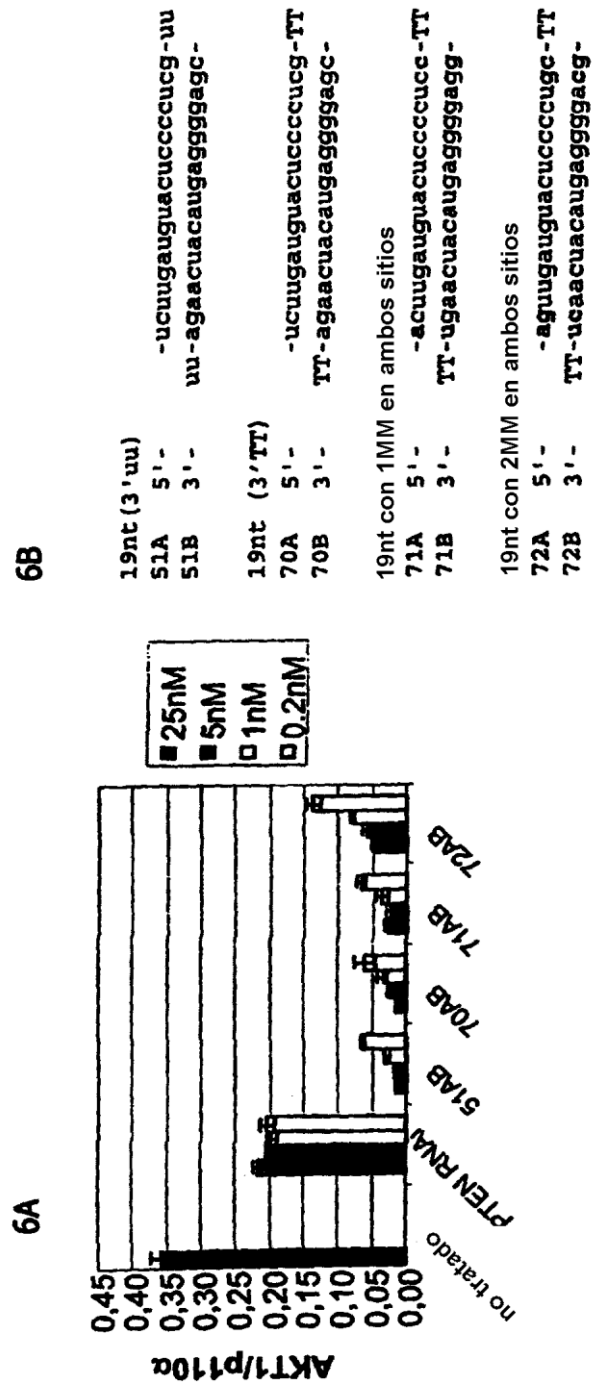


Fig. 7

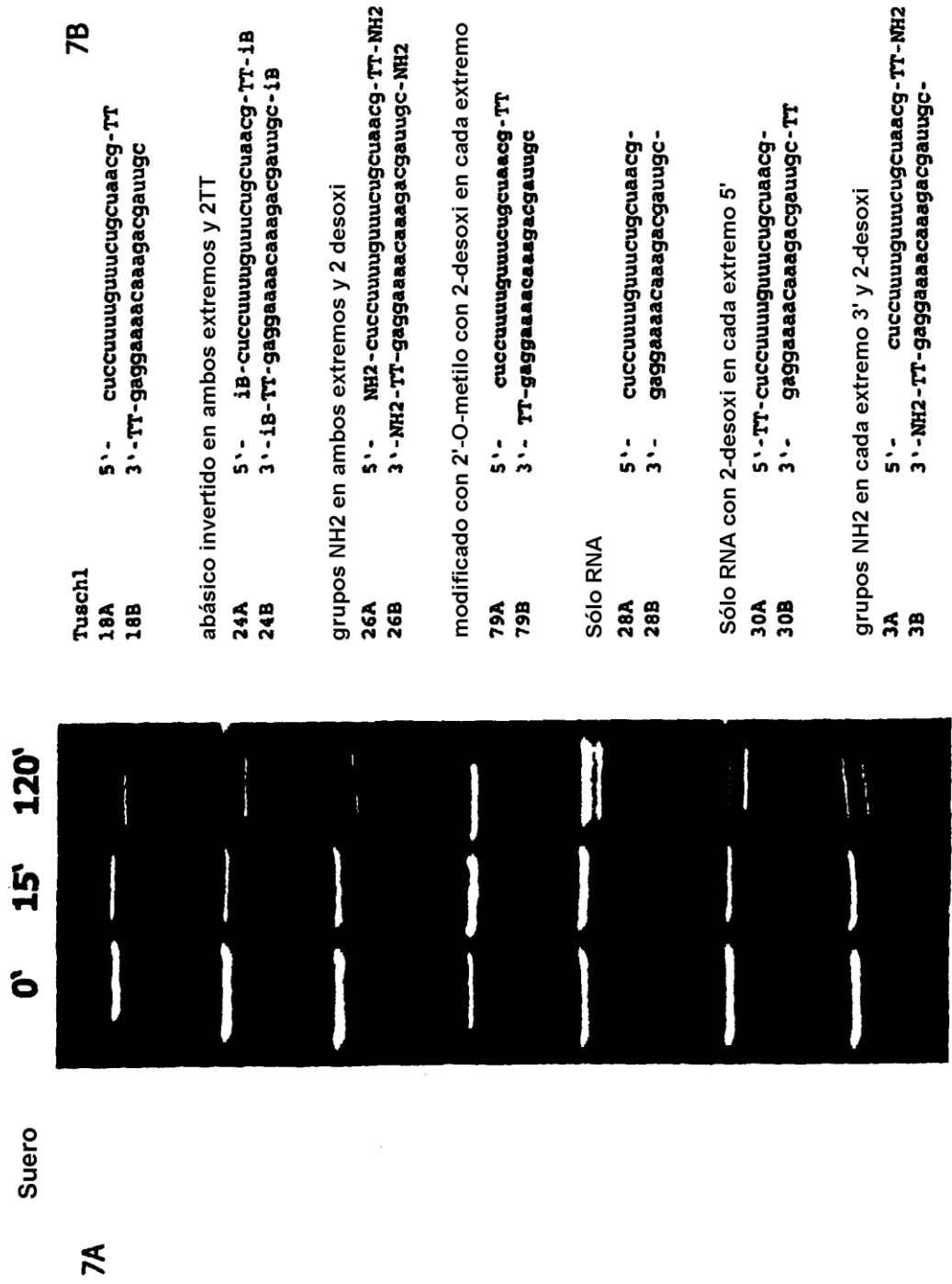


Fig. 10

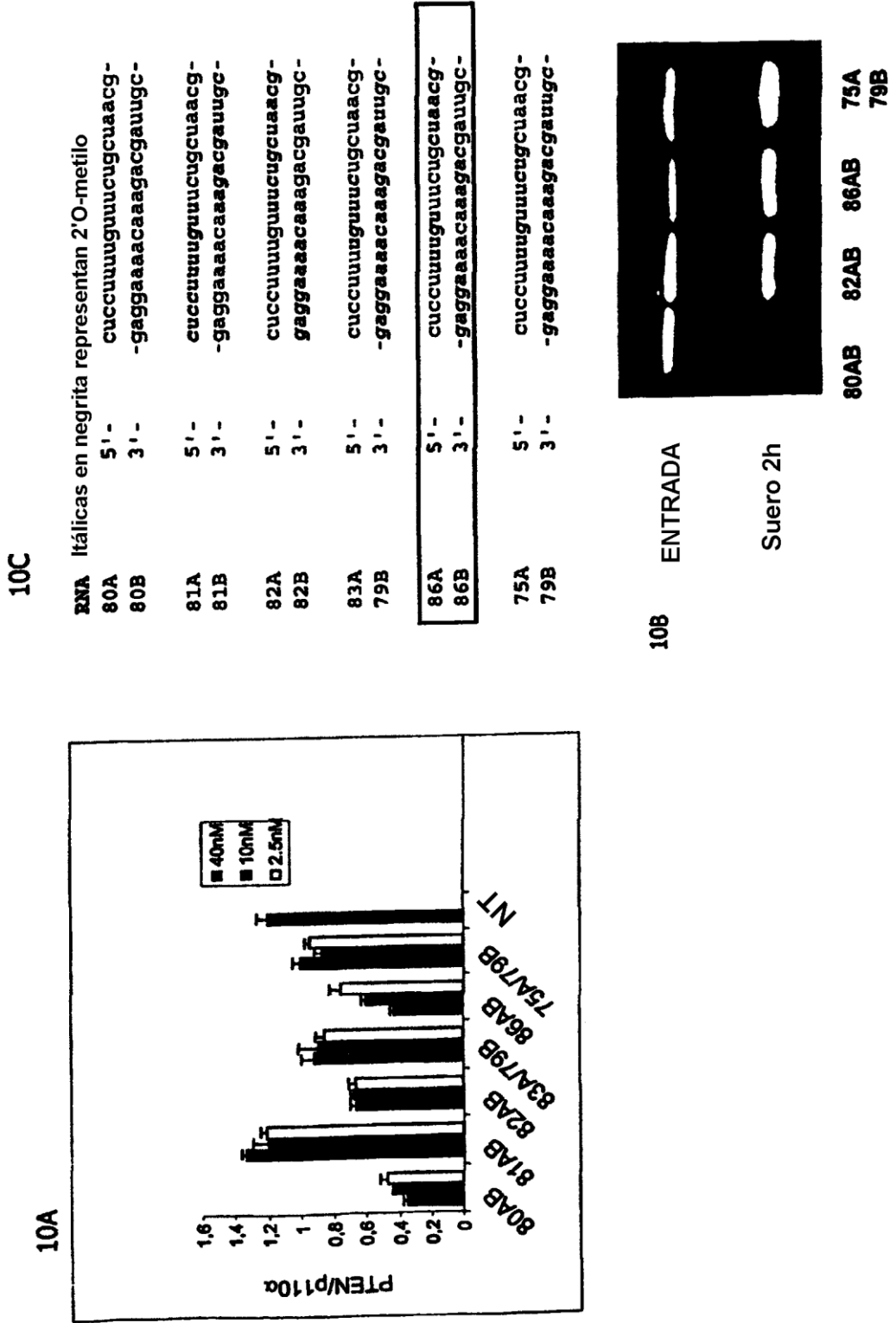


Fig. 11

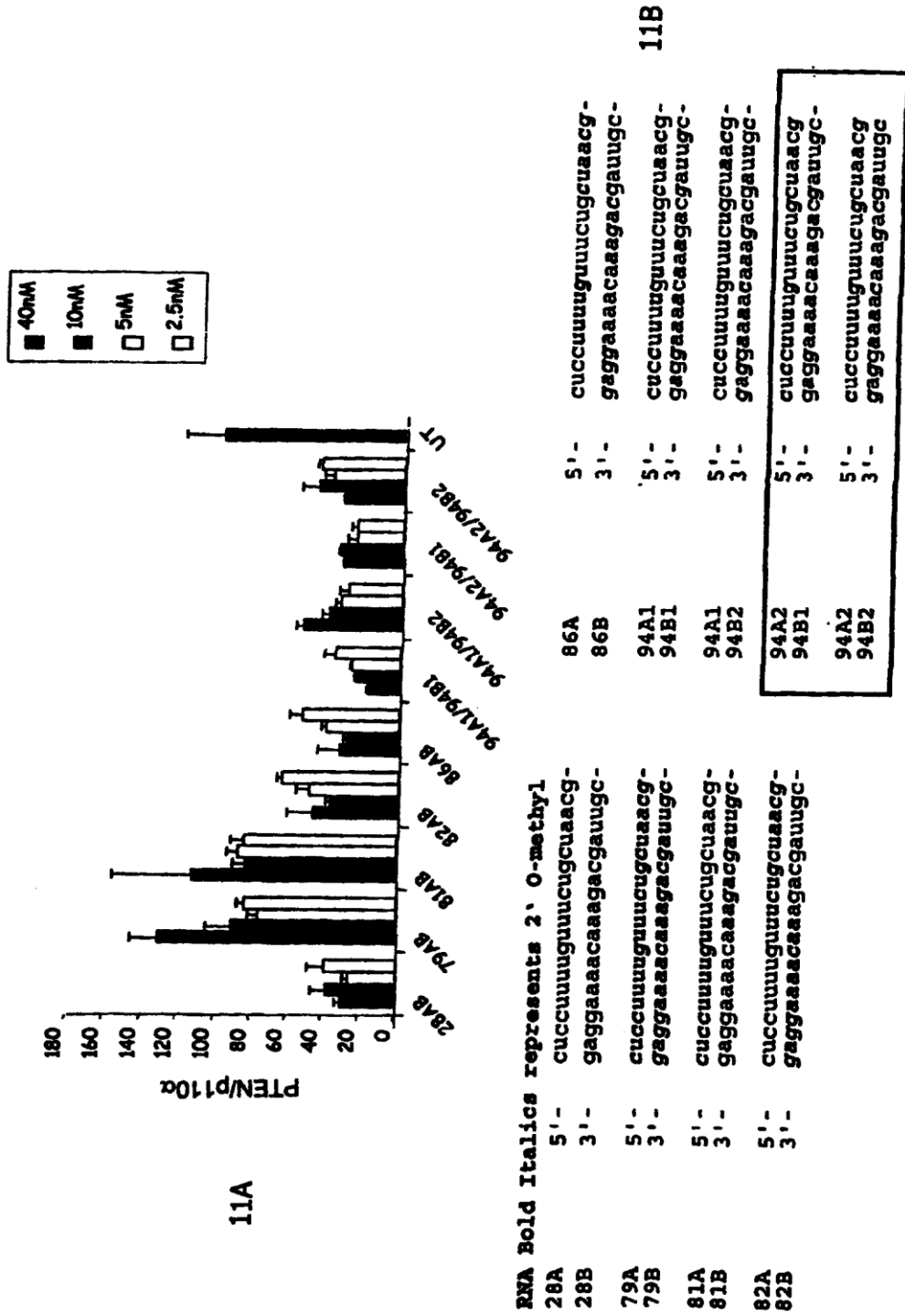
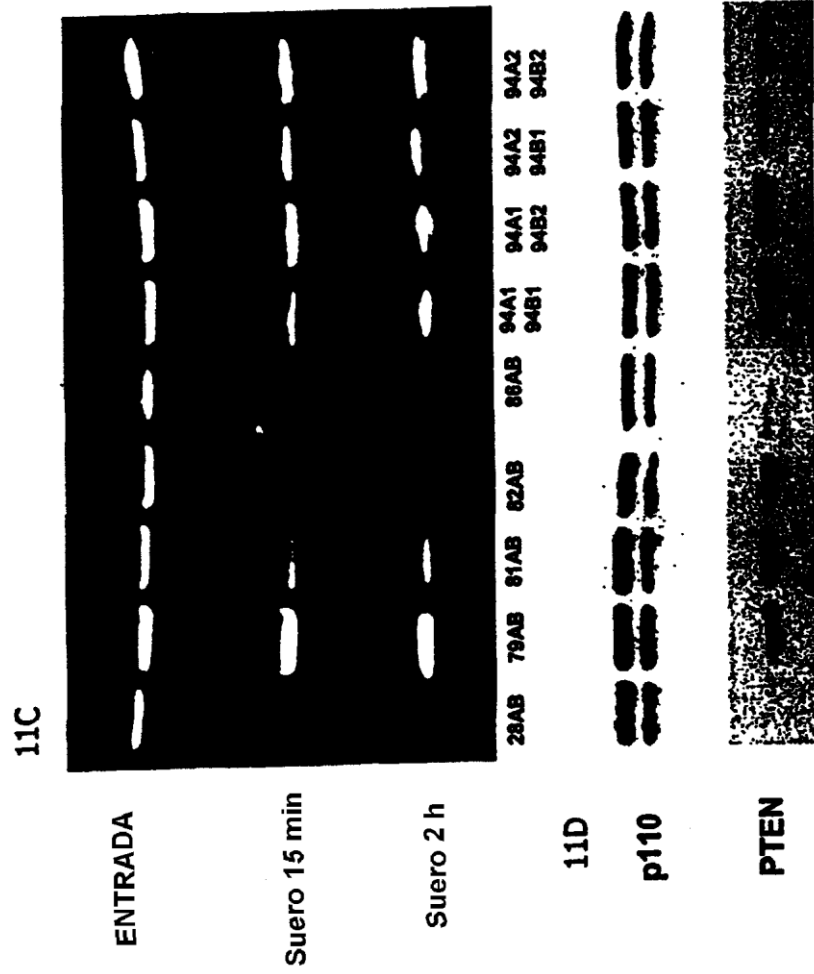


Fig. 11



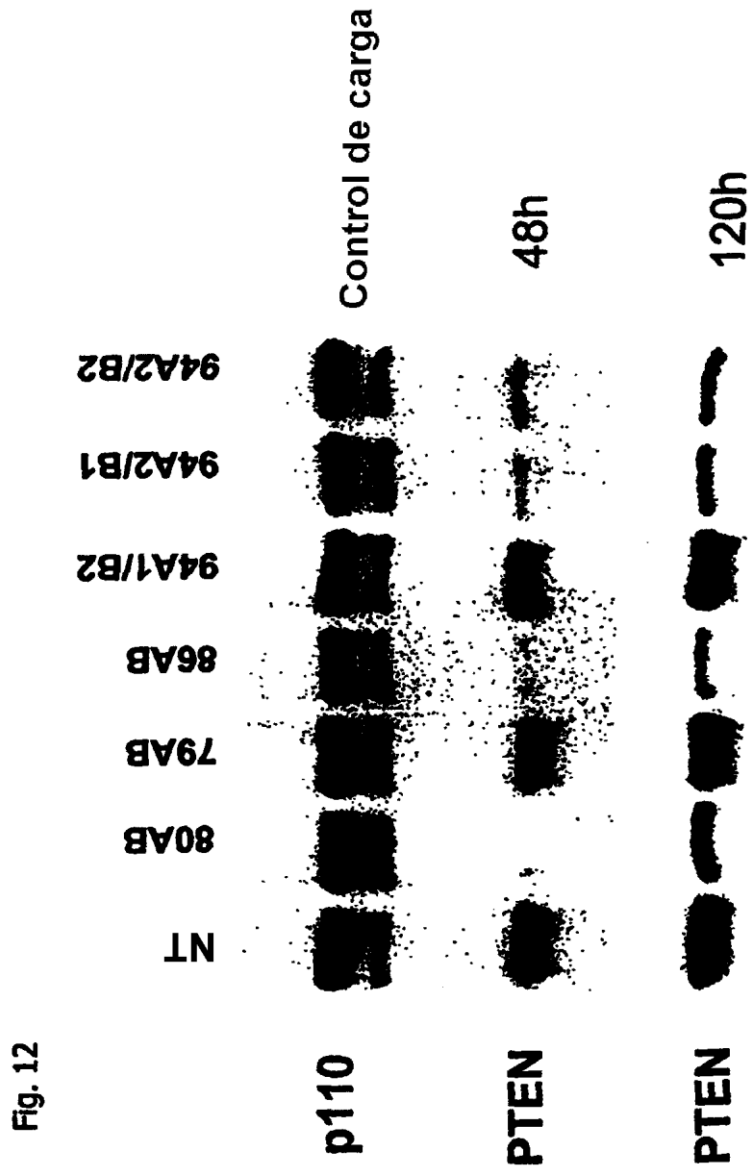


Fig. 12

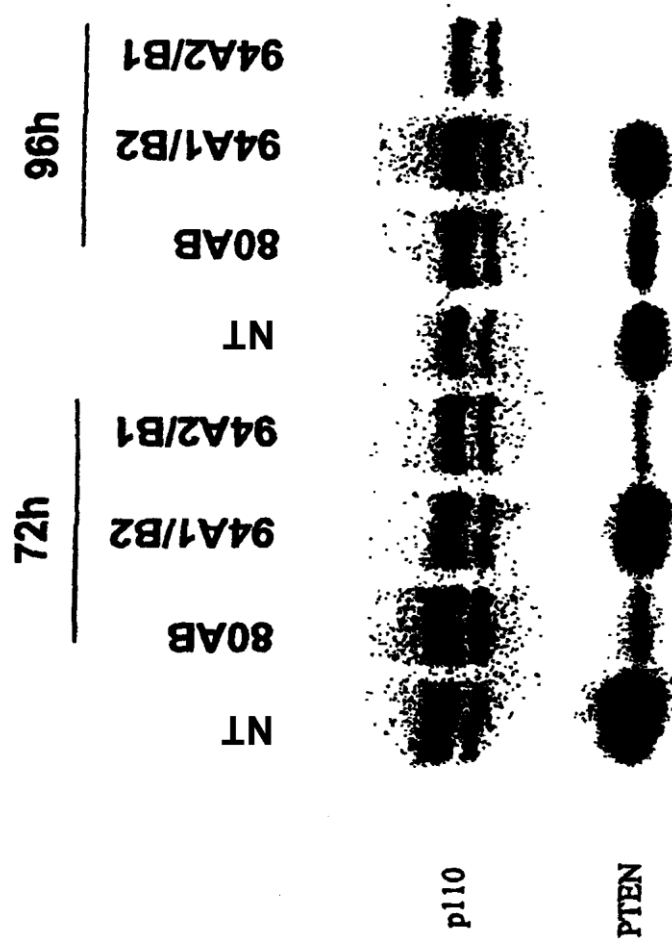


Fig. 13

Fig.14

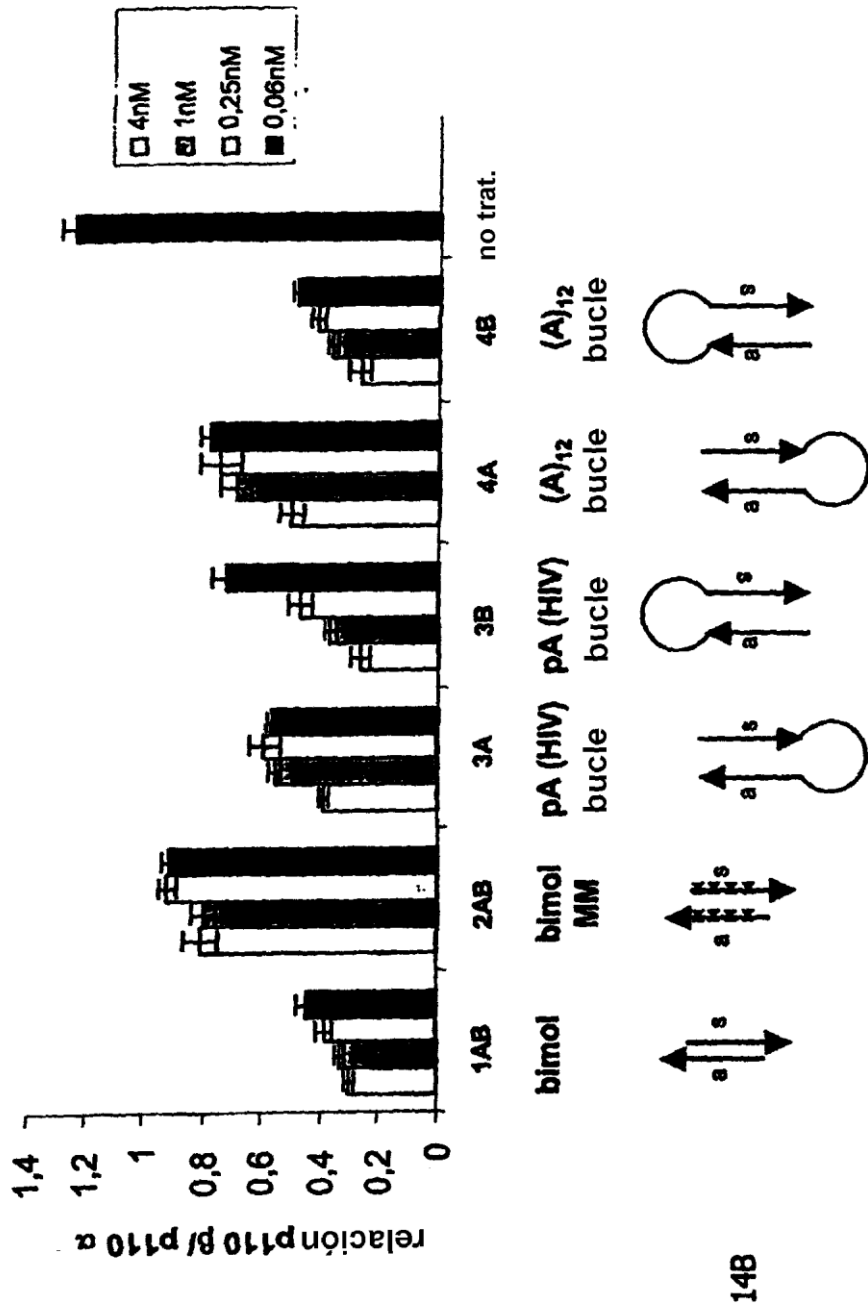
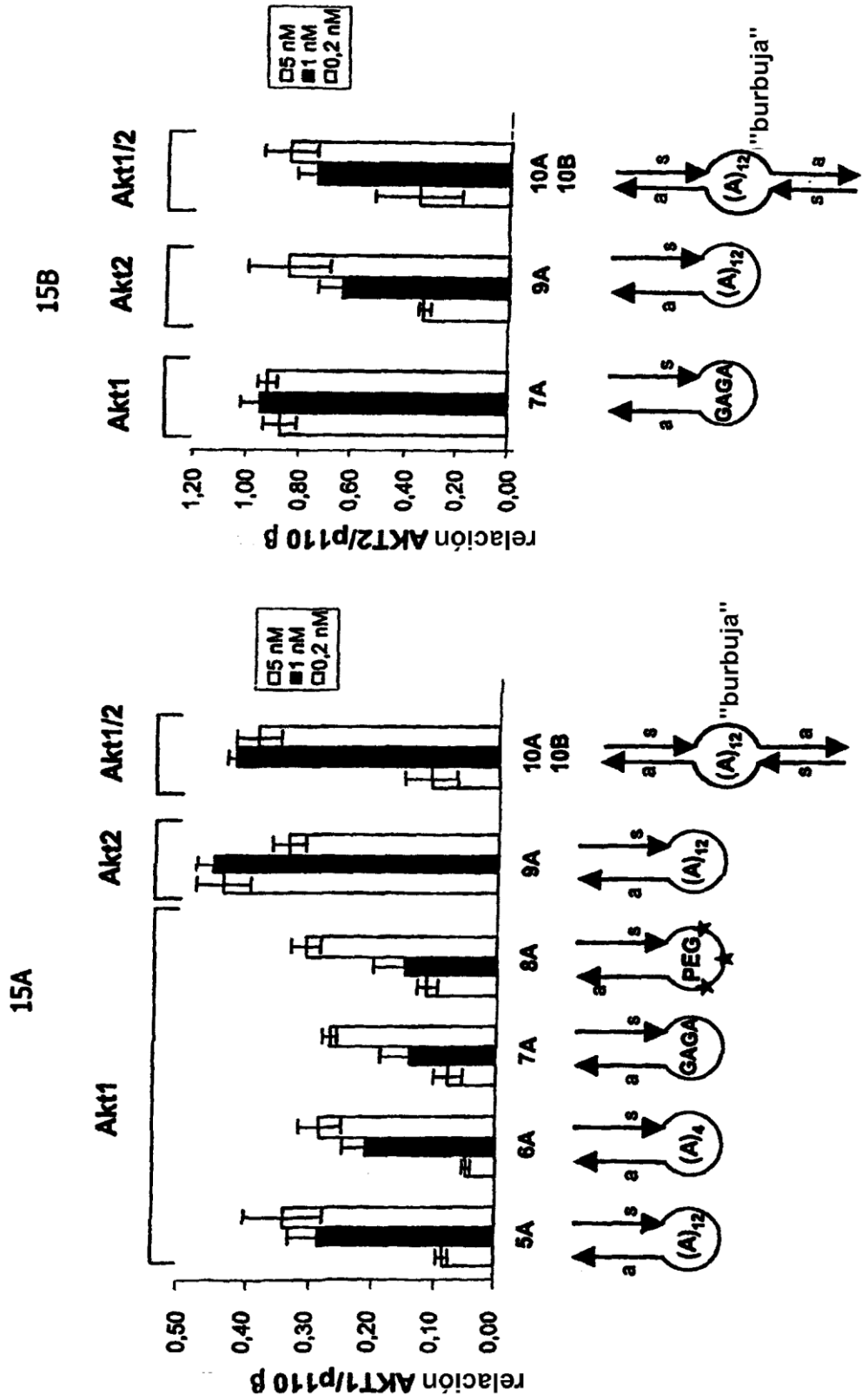
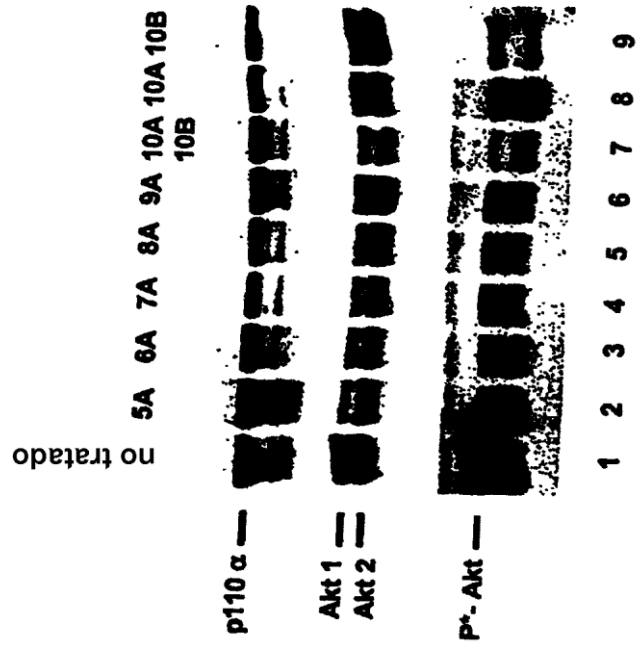


Fig. 15





15C

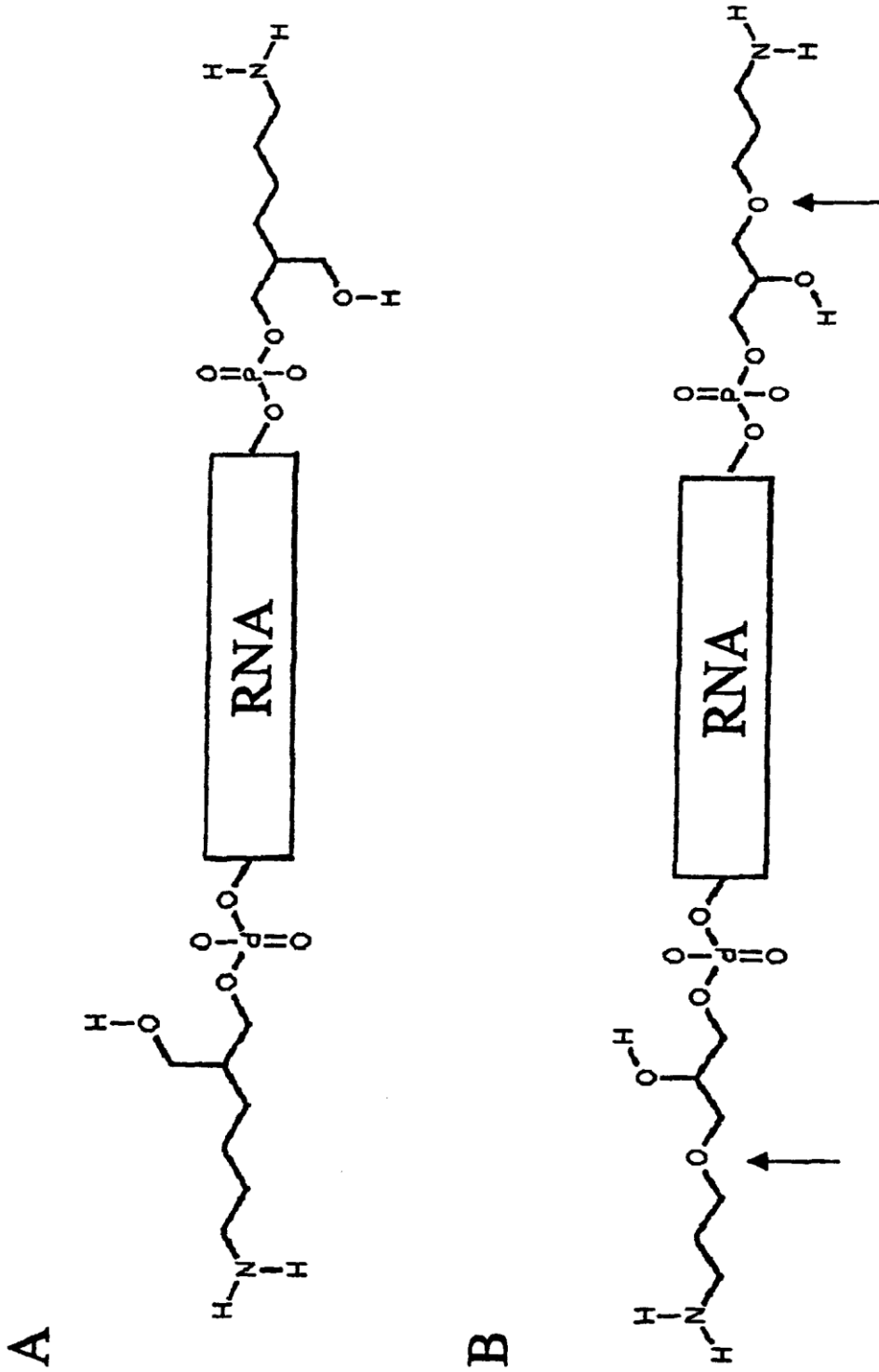


Fig. 16