(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 426 918**

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

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2005 E 05734330 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 1733035**

(54) Título: **Polinucleótidos modificados para reducir los efectos no específicos en la interferencia con ARN**

(30) Prioridad:

01.04.2004 WO PCT/US2004/010343
22.11.2004 US 630228 P
22.12.2004 US 19831

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.10.2013

(73) Titular/es:

DHARMACON, INC. (50.0%)
2650 Crescent Drive, Suite 100
Lafayette, CO 80026, US y
MERCK SHARP & DOHME CORP. (50.0%)

(72) Inventor/es:

LEAKE, DEVIN;
REYNOLDS, ANGELA;
KHVOROVA, ANASTASIA;
MARSHALL, WILLIAM y
LINSLEY, PETER S

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

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).

ES 2 426 918 T3

DESCRIPCIÓN

Polinucleótidos modificados para reducir los efectos no específicos en la interferencia con ARN

Campo de la invención

La presente invención hace referencia al campo de los polinucleótidos modificados.

Antecedentes

Actualmente se cree que la inactivación de genes mediante el silenciamiento de genes inducido por ARN implica un mínimo de tres niveles diferentes de control: (i) inactivación de la transcripción (ADN guiado por ARNip y metilación de histonas); (ii) degradación de ARNm inducida por ARN de interferencia pequeño (ARNip); y (iii) atenuación transcripcional inducida por ARNip. El ARN de interferencia (ARNi) generado por ARNip puede tener una larga duración y ser eficaz a lo largo de múltiples divisiones celulares. Por lo tanto, el ARNi representa una herramienta potencialmente valiosa que puede ser útil en el análisis de la función de los genes, la validación de la diana del fármaco, el análisis de rutas, y la terapia de enfermedades.

Recientes estudios en el mecanismo de la ruta de degradación del transcrito mediada por ARNi han revelado numerosos componentes claves en esta ruta. Una ARNasa de tipo II denominada Dicer procesa el ARNdh largo en ARNip (dúplex de 19-23 pb) que con posterioridad se empareja con el Complejo de Silenciamiento de Interferencia con ARN (RISC) para mediar la degradación de transcritos diana de una manera específica de la secuencia. Este fenómeno se ha observado en un grupo diverso de organismos. Desafortunadamente, los intentos iniciales para utilizar ARNdh largo para inducir ARNi en células de mamífero alcanzó un éxito apenas limitado debido a la inducción de la respuesta del interferón, lo que da como resultado una inhibición general, en oposición a la dirigida, de la síntesis de proteína.

Más recientemente, se ha demostrado que cuando los ARNip sintéticos cortos son introducidos en células de mamífero en cultivo, se puede lograr una degradación específica de la secuencia del ARNm diana sin inducir una respuesta de interferón. Estos dúplex cortos, pueden actuar catalíticamente a concentraciones sub-molares para escindir más de 95% del ARNm diana en una célula. Se proporciona una descripción de los mecanismos para la actividad del ARNip, así como de algunas de sus aplicaciones en Provost et al., Ribonuclease Activity and RNA Binding of Recombinant Human Dicer, E.M.B.O.J., 2002 Nov., 1, 21(21): 5864 -5874;Tabara et al., The dsRNA Binding Protein RDE-4 Interacts with RDE-1, DCR-1 and a DexH-box Helicase to Direct RNAi in C. elegans, Cell 2002, 28 Junio, 109(7):861-71; Ketting et al., Dicer Functions in RNA Interference and in Synthesis of Small RNA Involved in Developmental Timing in C. elegans, Genes and Development, 2001, 15(20):2654-9; y Martinez et al., Single-Stranded Antisense siRNAs Guide Target RNA Cleavage in RNA, Cell 2002, 6 Sept., 110(5):563.

A pesar de la promesa del ARNi, se deben tratar cuatro cuestiones principales incluyendo funcionalidad, especificidad, métodos de liberación, y estabilidad, cuando se trabaja con ARNip. La especificidad hace referencia a la capacidad de un ARNip concreto para silenciar una diana deseada sin alterar la expresión de otros genes, y estudios recientes han demostrado que la inhibición de un gen distinto del deseado ("off-targeting", esto es, la inhibición de dianas distintas de la diana pretendida) es mucho más extensa en el ARNi de lo que originalmente se pronosticó (véase Jackson, A.L. et al. (2003) "Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi" Nature Biotechnology 21:635-7).

Puesto que los efectos no específicos puede inducir fenotipos no deseables, se consideran indispensables nuevos métodos y composiciones que minimicen, alteren, o eliminen los efectos no específicos para que el ARNip se convierta en una herramienta de investigación y terapéutica eficaz. La presente invención aborda la cuestión de la especificidad proporcionando modificaciones para el ARNip que pueden incrementar o alterar la especificidad del ARNip.

Compendio de la invención

La presente invención está dirigida a composiciones y métodos para realizar la interferencia por ARN. En general las modificaciones químicas por ARNip descritas en la presente memoria afectan a una propiedad crítica de las moléculas: la especificidad. Las modificaciones que afectan a la especificidad son particularmente ventajosas en aplicaciones de investigación y terapéuticas donde la especificidad es crítica. Se describe una combinación distinta de modificaciones (y derivados de ese patrón de modificación) que mejora sustancialmente las aplicaciones del ARNi y que es aplicable en el diseño de reactivos de silenciamiento óptimos.

Por consiguiente, la invención proporciona: Un ARNip de doble hebra que comprende:

i. una hebra efectora que comprende
a. un primer nucleótido efector terminal 5', en donde dicho primer nucleótido efector terminal 5' comprende una primera modificación 2'-O-alquilo, y
b. un segundo nucleótido efector terminal 5', en donde dicho segundo nucleótido efector terminal 5' comprende una segunda modificación 2'-O-alquilo; y
ii. una hebra antisentido que comprende
a. un primer nucleótido antisentido 5' terminal, en donde dicho primer nucleótido antisentido terminal 5' tiene uno o más grupos fosfato unidos al carbono 5' de su radical azúcar, y
b. un segundo nucleótido antisentido terminal 5', en donde dicho segundo nucleótido antisentido 5' terminal comprende una tercera modificación 2'-O-alquilo,

en donde dicha hebra efectora y dicha hebra antisentido son capaces de formar un dúplex de 18-19 pares de bases de nucleótidos que tiene una complementariedad de 100% a lo largo del intervalo del dúplex, y dentro de dicho primer nucleótido efector terminal 5' es el nucleótido más 5' de la hebra efectora, dicho segundo nucleótido efector terminal 5' es inmediatamente adyacente y está aguas abajo del primer nucleótido efector terminal 5', dicho primer nucleótido antisentido terminal 5' es el nucleótido más 5' de la hebra antisentido y dicho segundo nucleótido antisentido 5' terminal es inmediatamente adyacente y está aguas abajo del primer nucleótido antisentido terminal 5', en donde todos los nucleótidos de la hebra efectora y de la hebra antisentido distintos de dicho primer nucleótido efector terminal 5', dicho segundo nucleótido efector terminal 5', y dicho segundo nucleótido antisentido 5' terminal comprenden un 2'-OH.

La invención también proporciona un ARNip de doble hebra de la invención para su uso en el tratamiento del organismo humano o animal mediante terapia o para su uso en un método de diagnóstico que se pone en práctica en un organismo humano o animal.

Breve descripción de las figuras

Las ventajas de las realizaciones preferidas de ciertos aspectos de la invención se muestran en las figuras adjuntas, en donde:
La Figura 1 representa la relación entre el posicionamiento de una realización de las modificaciones de la invención en dúplex que son más largos de 25 pb. El diseño óptimo de las moléculas garantiza que después de la digestión con Dicer, el dúplex funcional final contiene el patrón de modificación de la invención representado. Obsérvese, en el sustrato de Dicer inicial, que la hebra efectora y/o antisentido pueden tener salientes 3'. Alternativamente, ambos extremos pueden tener extremos romos.
La Figura 2 representa la relación entre el posicionamiento de las modificaciones de la invención en horquillas. El diseño óptimo de las moléculas garantiza que después de la digestión con Dicer, el dúplex funcional final contiene el patrón de modificación de la invención representado. Obsérvese, en el sustrato de Dicer inicial, que el extremo libre (abierto) de la molécula puede ser romo o puede contener un saliente 3'. Además, la molécula unimolecular se puede organizar en orientación 5' antisentido-bucle-efecto o 5' efector-bucle-antisentido.
La Figura 3 ilustra un esbozo del ciclo de síntesis de ARN 2'-ACE.
La Figura 4 ilustra la estructura de un ARN protegido con 2'-ACE preferido inmediatamente antes de la desprotección 2'.
Las Figuras 5A y 5B representan la relación entre la modificación y la función para ARNip SEAP-2217 2'-O-metilado. Las figuras demuestran el efecto sobre el silenciamiento génico de modificaciones de una sola base (barras de color negro) y emparejadas (gris) 2'-O-metil de la hebra efectora (Figura 5A) and hebra antisentido (Figura 5B) of SEAP-2217. El eje de las X representa la relación positiva de la modificación junto con cada hebra de ARNip (5'→3'). El eje de las Y representa el porcentaje de expresión con respecto a los controles.
Las Figuras 6A-6F muestran los efectos de la 2'-O-metilación con y sin fosforilación 5' en las hebras antisentido de seis ARNip específicos de luciferasa diferentes (luc 8, 18, 56, 58, 63, and 81). "S" = hebra efectora. "AS" = hebra antisentido. "*" indica la 2'-O-metilación en las posiciones 1 y 2 de la hebra designada. "p" indica fosforilación 5' de la hebra designada. El eje de las Y representa el % de expresión en comparación con células de control (no transfectadas). "Control" = células supuestamente transfectadas.
La Figura 7 representa un perfil de expresión de micromatriz (un mapa de calor) generado en células tratadas con ARNip que elige como diana IGF1R-73 en formas no modificadas (parte superior) y modificadas (parte inferior). El patrón de modificación incluye la modificación 2'-O-metilo de las posiciones 1 y 2 en las hebras tanto efectora como antisentido, más forforilación del carbono 5 del anillo de ribosa del nucleótido antisentido terminal 5'. (IGF1R-73: 5'-UGCUGACCUCUGUUACCUC-3', efectora)(SEQ. ID NO.1)
Las Figuras 8A y 8B representan mapas de calor de células tratadas con ARNip que eligen como diana: (A) MAPK14, y (B) MPHOSPH1. Los dúplex MAPK14-193 y MPHOSH1-202 o bien no están modificados (parte superior), hebra efectora modificada con una modificación 2'-O-metilo de las posiciones 1 y 2 (segunda desde

arriba), hebra antisentido modificada con una modificación 2'-O-metilo de las posiciones 1 y 2 (tercera desde arriba), o bien ambas hebras modificadas con modificaciones 2'-O-metilo de las posiciones 1 y 2 (parte inferior de cada mapa de calor). Todos los dúplex sometidos a ensayo contenían un grupo fosfato sobre el carbono 5 del anillo de ribosa del nucleótido antisentido terminal 5'. Las flechas indican la posición y los niveles relativos de silenciamiento de la diana. (MPHOS1-202: 5'-GACAUGCGAAUGACACUAG-3' (SEQ. ID NO. 2); Mapk14-193: 5'-CCUACAGAGAACUGCGGUU-3' (SEQ. ID NO. 3), hebra efectora.

La Figura 9 representa un resumen del número de dianas inespecíficas para ocho ARNip diferentes que eligen como diana 4 dianas separadas MAPK14, MPHOSPH1, PTEN, e IGF1R. El patrón de modificación química de los ARNip asociado con cada dúplex se muestra en la parte superior de cada columna. Además de (1) sin modificaciones 2'-O-metilo, (2) modificaciones 2'-O-metilo en las posiciones 1 y 2 de la hebra antisentido, (3) modificaciones 2'-O-metilo en las posiciones 1 y 2 de la hebra efectora, o (4) modificaciones 2'-O-metilo en las posiciones 1 y 2 de ambas hebras, todos los dúplex sometidos a ensayo contienen un grupo fosfato en el carbono 5 del anillo de ribosa del nucleótido antisentido terminal 5'. Las secuencias de la hebra efectora de las moléculas de esta figura incluyen: IGF1R-73: 5' UGCUGACCUCUGUUACCUC-3' (SEQ. ID NO. 4), Mapk14-193: 5' CCUACAGAGAA CUGCGGUU-3' (SEQ. ID NO. 5), Mapk14-153: 5' GUCAUCAGCUUUGUGCCAC-3' (SEQ. ID NO. 6), MPHOS1-202:5' GACAUGCGAAUGACACUAG-3' (SEQ. ID NO. 7), MPHOS1-203: 5' AGAGGAACU CUCUGCAAGC-3' (SEQ. ID NO. 8), PTEN 213: 5' UGGAGGGGAAUGCUCAGAA-3' (SEQ. ID NO. 9) and PTEN 214: 5' UAAAGAUGGCACUUUCCCG-3' (SEQ. ID NO. 10), IGF1R-73: UGCUGACCUCUGUUACCUC-3' (SEQ. ID NO. 11), IGFIR-71: 5' GCUCACGGUCAUUACCGAG-3' (SEQ. ID NO. 12)

La Figura 10a representa un mapa de calor que muestra los resultados de un paseo de modificación química a lo largo del ARNip para MAPK14-153. Los dúplex portan modificaciones individuales o modificaciones emparejadas 2'-O-metilo de diversas posiciones de la hebra antisentido del ARNip combinadas con modificaciones 2'-O-metilo en las posiciones 1 y 2 de la hebra efectora y un grupo fosfato en el carbono 5' del anillo de ribosa del primer nucleótido antisentido (terminal). Mapk14-153: 5' GUCAUCAGCUUUGUGCCAC-3' (SEQ. ID NO. 13), hebra efectora. Las letras D-R describen las siguientes moléculas:

D: no modificada
E modificación con 2'O-metilo de las posiciones 1 y 2 de la hebra AS;
F: modificación con 2'O-metilo de las posiciones 1 y 2 de la hebra AS sin modificación de la hebra efectora;
G: modificación con 2'O-metilo de las posiciones 2 y 3 de la hebra AS;
H: modificación con 2'O-metilo de las posiciones 3 y 4 de la hebra AS;
I: modificación con 2'O-metilo de las posiciones 4 y 5 de la hebra AS;
J: modificación con 2'O-metilo de las posiciones 5 y 6 de la hebra AS;
K: modificación con 2'O-metilo de las posiciones 6 y 7 de la hebra AS;
L: modificación con 2'O-metilo de las posiciones 7 y 8 de la hebra AS;
M: modificación con 2'O-metilo de las posiciones 8 y 9 de la hebra AS;
N: modificación con 2'O-metilo de las posiciones 9 y 10 de la hebra AS;
O: modificación con 2'O-metilo de las posiciones 10 y 11 de la hebra AS;
P: modificación con 2'O-metilo de la posición 1 de la hebra AS;
Q: modificación con 2'O-metilo de la posición 2 de la hebra AS; y
R: modificación con 2'O-metilo de las posiciones 1, 2, 11, y 12 de la hebra AS

La Figura 10b representa un mapa de calor que demuestra cómo la posición 2 es un nucleótido crítico en la determinación de la modulación no específica del gen. A) Se examinó el redireccionamiento de ARNip a tres genes diferentes (MAPK14, KNTC2, y STK6) para determinar los efectos no específicos mediante análisis de micromatriz cuando el dúplex no estaba modificado (parte superior de cada conjunto de mapas de calor), estaba modificado con grupos 2'-O-metilo en las posiciones 1 y 2 de la hebra efectora (segunda empezando por arriba en cada conjunto de mapas de calor), estaba modificado con grupos 2'-O-metilo en las posiciones 1 y 2 de la hebra efectora más modificaciones 2'-O-metilo en la posición 1 de la hebra antisentido (tercero desde la parte de arriba de cada conjunto de mapas de calor), estaba modificado con grupos 2'-O-metilo en las posiciones 1 y 2 de la hebra efectora más modificaciones 2'-O-metilo en la posición 2 de la hebra antisentido (cuarta desde la parte de arriba de cada conjunto de mapas de calor), y estaba modificado con grupos 2'-O-metilo en las posiciones 1 y 2 de la hebra efectora mas modificaciones 2'-O-metilo en las posiciones 1 y 2 de la hebra antisentido (quinta desde la parte de arriba de cada conjunto de mapas de calor). Todos los dúplex de este estudio contenían un grupo fosfato en el carbono 5' del anillo de ribosa del primer nucleótido antisentido (terminal). Las secuencias de la hebra efectora utilizadas en esta figura incluyen: KNTC2: 5' GGCUUCCUUACAAGGAGAU-3' (SEQ. ID NO. 14), Mapk14-193: 5' CCUACAGAGAACUGCGGUU-3' (SEQ. ID NO. 15), STK6: CGGGUCUUGUGUCCUUCAA-3' (SEQ. ID NO. 16).

La Figura 11 compara los efectos de la modificación química con emparejamientos erróneos de pares de bases selectivos sobre los efectos no específicos (MAPK14-153) inducida por ARNip (Mapk14-153: 5'GUCAUCAGCUUUGUGCCAC-3' (SEQ. ID NO. 17), efector). Los ocho mapas de calor de la parte superior representan dúplex que están: no modificados (parte superior), o contienen modificaciones 2'-O-metilo en las posiciones 1 y 2, 2 y 3, 3 y 4, 4 y 5, 5 y 6, 6 y 7, o 7 y 8 de la hebra antisentido. Todos los dúplex contienen

un grupo fosfato en el carbono 5' del anillo de ribosa del primer nucleótido antisentido (terminal). La mitad inferior del mapa de calor representa ARNip que tienen emparejamientos erróneos de pares de bases (entre la hebra antisentido del ARNip y la molécula diana) incorporados a los dúplex de ARNip. Todos los dúplex contienen un grupo fosfato en el carbono 5' del anillo de ribosa del primer nucleótido antisentido (terminal).

Las Figuras 12a-d demuestran una toxicidad de ARNip específica de la secuencia, independiente de la diana. 12a: Se transfectaron células HeLa con uno de 90 ARNip diferentes que se dirigían a DBI (NM _020548, posición 202-291). Los datos se presentan de acuerdo con la posición de ARNip en el paseo. La línea discontinua (horizontal) representa el umbral de viabilidad del 75%. Las zonas encuadradas indican ARNip tóxico con similitud de secuencia. Los datos de toxicidad (barras grises) se superponen sobre los datos de expresión de ARNm DBI (barras negras) para el mismo conjunto de ARNip. 12b: Se transfectaron células HeLa con uno de 48 ARNip funcionales (silenciamiento >70%) que se dirigen a 12 genes diferentes. Los datos se clasifican basándose en el nivel de toxicidad inducida por ARNip. ARNip no tóxico (barras grises), ARNip tóxico (barras negras). 12c: Células HeLa transfectadas con un subconjunto de ARNip tóxicos y no tóxicos de (b) que se dirigen a MAPK1 (MEK1) o a MAPK2 (MEK2). Los datos de toxicidad (barras grises) se presentan junto a los datos de expresión de ARNm (barras negras). Los datos demuestran que no existe correlación entre el nivel de silenciamiento y la toxicidad. 12d: Estudios de dilución que muestran los efectos de ARNip tóxico (MAP2K2-3, SRD5A1-1, SRD5A1-3 y SRD5A2-3) en células HeLa a concentraciones variables. Los valores de toxicidad representan la media de tres experimentos independientes (cada uno realizado por triplicado). Las barras de error representan la desviación típica de la media. Para los protocolos experimentales: 72h horas después de la transfección, se añadieron 25 microlitros de colorante Azul Alamar a los pocillos que contenían las células en 100 microlitros de medio. Después las células se incubaron (0,5 horas) a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO_2. Con posterioridad se midió la fluorescencia en un contador multi-marca Perkin Elmer WallacVector2 1420 con excitación a 540 nm y emisión a 590 nm. Los resultados presentados en la Figura 12 son una media de nueve datos puntuales procedentes de tres experimentos independientes llevados a cabo en días diferentes. Para los fines de este estudio, los ARNips se definieron como tóxicos cuando los resultados de nueve experimentos diferentes (tomando en consideración las desviaciones típicas) mostraron que la viabilidad celular era inferior a 75%. Para los niveles de expresión de genes comparativos, se cuantificó el ARNm utilizando Kits Quantigene® (Genospectra, Fremont, CA) para el análisis del ADN ramificado (ADNr) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel de ARNm de GAPDH (un gen doméstico) se utilizó como referencia.

Figuras 13a-c. dependencia de la secuencia de la toxicidad del ARNip. Se transfectaron células HeLa con ARNip funcionales que contenían 13a: AAA/UUU, 13b: GCCA/UGGC, o 13c: motivos no tóxicos. El ARNip que contiene el motivo muestra una mayor incidencia de toxicidad. Los valores para la toxicidad representan la media de tres experimentos independientes (cada uno llevado a cabo por triplicado). Las barras de error representan la desviación típica de la media.

Las Figuras 14a-1 ilustran la toxicidad mediada por ARNip mediada por la ruta del ARNi. 14a: Diagrama de los procedimientos experimentales utilizados en los experimentos de reducción de la expresión de eIF2C2/Ago2. "T1" y "T2" representan "transfección 1" y transfección 2", respectivamente. El ARNip de control y de ensayo se transfectaron a 10 nM en cada transfección, 14b-14i: Experimentos de control que demuestran que la reducción de la actividad del producto del gen eIF2C2 inhabilita la ruta de ARNi (b, d, f, y h - representan los niveles de expresión de EGFP; c, e, g, y i - muestran la tinción por Hoechst 33342 comparativa). El estudio demuestra que si se inhabilita la ruta de ARNi con el ARNip de eIF2C2, la posterior adición de ARNip de redireccionamiento no logra silenciar su diana. 14j: Gráfico que muestra los efectos de la reducción de la expresión de eIF2C2 sobre la toxicidad de ARNip; 14k: Gráfico que muestra el efecto del truncamiento de ARNip tóxico por 2 nucleótidos (19 unidades → 17 unidades) sobre la toxicidad de ARNip. 141: Gráfico que muestra los efectos que tienen las modificaciones químicas de ARNip tóxico sobre la toxicidad de ARNip. 14m. Toxicidad de 37 secuencias que se dirigen a luciferasa en formas modificadas y no modificadas; 14n. Gráfico que muestra el nivel de silenciamiento de las secuencias que se dirigen a luciferasa en formas modificadas y no modificadas. Los valores para la toxicidad representan la media de tres experimentos independientes (cada uno llevado a cabo por triplicado). Las barras de error representan la desviación típica de la media. Se utilizó la microscopía ordinaria y fluorescente para obtener datos sobre la morfología celular y de los núcleos. Las células vivas se tiñeron con colorante nuclear fluorescente permeable a las células Hoechst 33342 (2 microg/ml, 15 minutos a 37°C, Molecular Probes). Las fotografías se tomaron utilizando una cámara InSight CCD del microscopio fluorescente Leica DML y el programa SPOT 3.5.

La Figura 15 ilustra una 5'-O-benzhidroxi-*bis*(trimetilsililoxi)silil-2'-O-*bis*(2-acetoxietill)ortoformil-3'-O-(N,N-diisopropil)metil-fosforamidita. B es una base nucleosídica tal como, por ejemplo, adenosina, guanosina, citidina, o uracilo; Z es un grupo protector para la amina exocíclica (isobutirilo para A y G, acetilo para C.

La Figura 16 ilustra una 5'-O-benzhidroxi-*bis*(trimetilsililoxi)-silil-2'-O-metil-3'-O-(N,N-diisopropil)metil fosforamidita. B es una base nucleosídica tal como, por ejemplo, adenosina, guanosina, citidina, o uracilo; Z es un grupo protector para la amina exocíclica (isobutirilo para A y G, acetilo para C).

La Figura 17 ilustra una N,N-diisopropilamino-bis(2-cianoetil)-fosforamidita.

La Figura 18 muestra mapas de calor generados a partir de células HeLa tratadas con dúplex y agrupaciones de ciclofilina B (18a-18c) o MAP2K1 (18d-18f) en formas no modificadas y modificadas. "N" = normal, no modificada. "OTP" = modificada. Los resultados demuestran que la adición de modificaciones químicas de la

invención a dúplex individuales reduce generalmente el número de genes inespecíficos en 50% o más (véanse 18a, 18b, 18d, 18e). La combinación de modificaciones de la invención con agrupaciones reduce el número de genes que son regulados a la baja > 2 veces por encima del 90% (véanse 18c, 18f).

Descripción detallada

La presente invención está dirigida a composiciones y métodos para llevar a cabo la interferencia con ARN, incluyendo el silenciamiento génico inducido por ARNip. Por medio del uso de la presente invención, polinucleótidos modificados, y derivados de los mismos, se pueden mejorar la eficacia de las aplicaciones de la interferencia con ARN.

A menos que se establezca explícitamente de otro modo, o implícitamente a partir del contenido, los siguientes términos y expresiones incluyen los significados proporcionados más abajo:

Alquilo

El término "alquilo" hace referencia a un radical hidrocarbilo que puede ser saturado o insaturado. Puede comprender radicales que son lineales, ramificados y/o cíclicos.

Los grupos alquilo ilustrativos incluyen, pero no están limitados a, radicales tales como, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo y grupos alquilo de mayor número de carbonos, así como 2-metilpropilo, 2-metil-4-etilbutilo, 2,4-dietilpropilo, 3-propilbutilo, 2,8-dibutildecilo, 6,6-dimetiloctilo, 6-propil-6-butiloctilo, 2-metilbutilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2-etilhexilo, isopropilo, isobutilo, isopentilo, etc. El término alquilo también incluye grupos alquenilo, tales como vinilo, alilo, aralquilo y alquinilo. A menos que se especifique de otro modo, los grupos alquilo no están sustituidos.

El grupo alquilo preferido para una modificación 2' es un grupo metilo con una conexión O al carbono 2' de un radical ribosilo, esto es, un 2'-O-alquilo que comprende un grupo 2'-O-metilo. Un grupo 2'-O-metilo preferido es uno no sustituido: $-O-CH_3$

Nucleótido modificado con 2'-O-alquilo

La expresión ""nucleótido modificado con 2'-O-alquilo" hace referencia a una unidad nucleotídica que tiene un radical azúcar, por ejemplo un radical desoxirribosilo que está modificado en la posición 2' de manera que un átomo de oxígeno está anclado tanto al átomo de carbono localizado en la posición 2' del azúcar como a un grupo alquilo. En diversas realizaciones, el radical alquilo consiste esencialmente en carbonos e hidrógenos. Una realización particularmente preferida. Una realización particularmente preferida es una en la que el radical alquilo es un radical metilo.

Hebra antisentido

La expresión "hebra antisentido" según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un polinucleótido o una región de un polinucleótido que es sustancialmente (esto es, 80% o más) o 100% complementario a un ácido nucleico diana de interés. Una hebra antisentido puede estar comprendida por una región de polinucleótido que es ARN, ADN o quimérica ARN/ADN. Por ejemplo, una hebra antisentido puede ser complementaria, en su totalidad o en parte, a una molécula de ARN mensajero, una secuencia de ARN que no es ARNm (p. ej., ARNt, ARNr y ARNhn) o una secuencia de ADN que es o bien codificante o bien no codificante. La expresión "hebra antisentido" incluye la región antisentido de polinucleótidos que se forman a partir de dos hebras separadas, así como ARNip unimoleculares que son capaces de formar estructuras en horquilla. Se pretende que las expresiones "hebra antisentido" y "región antisentido" sean equivalentes y se utilicen indistintamente. La hebra antisentido puede estar modificada con un grupo diverso de moléculas pequeñas y/o productos conjugados.

Modificación en el carbono 2'

La expresión "modificación en el carbono 2'" hace referencia a una unidad de nucleótido que tiene un radical azúcar, por ejemplo un radical que está modificado en la posición 2' de la subunidad de azúcar. Un "nucleótido modificado con 2'-O-alquilo" está modificado en esta posición de manera que un átomo de oxígeno está anclado tanto al átomo de carbono localizado en la posición 2' del azúcar como a un grupo alquilo, p. ej., 2'-O-metilo, 2'-O-etilo, 2'-O-propilo, 2'-O-isopropilo, 2'-O-butilo, 2-O-isobutilo, 2'-O-etil-O-metilo ($-OCH_2CH_2OCH_3$), y 2'-O-etil-OH ($-OCH_2CH_2OH$). Una "modificación efectora en el carbono 2'" hace referencia a una modificación en la posición del carbeno 2' de un nucleótido sobre la hebra efectora o dentro de la región efectora del polinucleótido. Una "modificación antisentido en el carbono 2'" hace referencia a una modificación en la posición del carbono 2' de un nucleótido sobre la hebra antisentido o dentro de una región antisentido del polinucleótido.

Complementario

El término "complementario" hace referencia a la capacidad de los polinucleótidos para formar pares de bases entre sí. Los pares de bases se forman típicamente por medio de enlaces de hidrógeno entre unidades de nucleótidos en hebras o regiones de polinucleótidos antiparalelas. Las hebras o regiones de polinucleótidos complementarias pueden emparejar las bases en la manera de Watson-Crick (p. ej., A con T, A con U, C con G), o en cualquier otra manera que permita la formación de dúplex estables. La complementariedad se mide típicamente con respecto a una región dúplex y de ese modo excluye, por ejemplo, los salientes. Una región dúplex comprende una región de complementariedad entre dos hebras o entre dos regiones de una hebra sencilla, por ejemplo, un ARNip unimolecular. Típicamente, la región de complementariedad es el resultado del emparejamiento de bases de Watson-Crick.

La complementariedad perfecta o complementariedad del 100% hace referencia a la situación en la cual cada unidad de nucleótido de una hebra o región de polinucleótido puede formar enlaces de hidrógeno con cada unidad de nucleótido de un una segunda hebra o región de polinucleótido. La complementariedad inferior a la perfecta hace referencia a la situación en la que algunas unidades de nucleótido, pero no todas, de dos hebras o dos regiones pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí. Por ejemplo, para 20 unidades, si solamente dos pares de bases de cada hebra pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí, las hebras o regiones de polinucleótido muestran una complementariedad de 10%. en el mismo ejemplo, si 18 pares de bases de cada hebra o cada región pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí, las hebras de polinucleótido muestran una complementariedad de 90%. La complementariedad sustancial hace referencia a hebras o regiones de polinucleótido que muestran una complementariedad de 80% o mayor.

Desoxinucleótido

El término "desoxinucleótido" hace referencia a un nucleótido o polinucleótido que carece de grupo OH en la posición 2' o 3' de un radical azúcar, y/o a un didesoxi terminal 2',3' en lugar de tener un hidrógeno en el carbono 2' y/o 3'.

Desoxirribonucleótido

Los términos "desoxirribonucleótido" y "ADN" hacen referencia a un nucleótido o polinucleótido que comprende al menos un radical ribosilo que tiene un H en la posición 2' de un radical ribosilo. Preferiblemente un desoxirribonucleótido es un nucleótido que tiene un H en su posición 2'.

Aguas abajo

Se considera que una primera región o nucleótido de una hebra de nucleótidos está aguas abajo de una segunda región, si la porción más 5' es la porción más próxima de esa región al extremo 3' de la segunda región (o nucleótido).

Primer nucleótido antisentido terminal 5'

La expresión "primer nucleótido antisentido terminal 5'" hace referencia al nucleótido o región de la hebra antisentido que está localizado en la posición más 5' de esa hebra con respecto a las bases o región de la hebra antisentido que tienen las correspondientes bases complementarias sobre la hebra o región efectora. De este modo, en un ARNip que está formado por dos hebras separadas (esto es, no es un ARNip unimolecular o en horquilla), hace referencia a la base más 5' distinta de las bases que forman parte de cualquier saliente 5' sobre la hebra antisentido, que puede estar presente o no. Cuando el primer nucleótido antisentido terminal 5' es parte de una molécula en horquilla, el término "terminal" hace referencia a la posición más 5' con respecto a la posición dentro de la región terminal y por lo tanto es el nucleótido más 5' de la región antisentido.

Primer nucleótido efector terminal 5'

La expresión "primer nucleótido efector terminal 5'" se define en referencia al nucleótido antisentido. En las moléculas que están formadas por dos hebras separadas (esto es, no es un ARNip unimolecular o en horquilla), hace referencia al nucleótido de la hebra efectora que está localizado en la posición más 5' de la hebra con respecto a las bases de la hebra efectora que tienen las correspondientes bases complementarias sobre la hebra antisentido. De este modo, en un ARNip que está formado por dos hebras separadas (esto es, no es un ARNip unimolecular o en horquilla), es la base más 5' distinta de las bases que son parte de cualquier saliente 5' sobre la hebra o región efectora, que puede estar presente o no. Cuando el primer nucleótido efector terminal 5' es parte de un ARNip unimolecular que es capaz de formar una molécula en horquilla, el término "terminal" hace referencia a la posición relativa dentro de la hebra o región efectora medida por la distancia desde la base complementaria al primer

nucleótido antisentido terminal 5'.

Funcional

Un ARNip puede estar dividido en cinco (5) grupos (no funcional, semi-funcional, funcional, altamente funcional, e hiperfuncional) basándose en el nivel o grado de silenciamiento que inducen en las líneas celulares cultivadas. Según se utiliza en la presente memoria, estas definiciones se basan en un conjunto de condiciones en las que el ARNip es transfectado a dicha línea celular a una concentración de 100 nM y el nivel de silenciamiento se somete a ensayo en un momento aproximadamente 24 horas después de la transfección, y sin exceder las 72 horas después de la transfección. En este contexto, los "ARNip no funcionales" se definen como aquellos ARNip que inducen menos de 50% (<50%) de silenciamiento de la diana. Los "ARNip semi-funcionales" inducen un silenciamiento de la diana de 50-79%. Los "ARNip funcionales" son moléculas que inducen un silenciamiento génico de 80-95%. Los "ARNip altamente funcionales" son moléculas que inducen más de 95% de silenciamiento génico. Los "ARNip hiperfuncionales" son una clase especial de moléculas. Para los fines de este documento, los ARNip hiperfuncionales se definen como aquellas moléculas que: (1) inducen más de 95% de silenciamiento de una diana específica cuando se transfectan a concentraciones subnanomolares (esto es, menos de uno nanomolar); y/o (2) inducen niveles funcionales (o mejores) de silenciamiento durante más de 96 horas. Estas funcionalidades relativas (aunque no se pretende que sean absolutas) se pueden utilizar para comparar los ARNip con una diana concreta para aplicaciones tales como genómica funcional, identificación de dianas y terapéuticas.

Dosis funcional

Una "dosis funcional" hace referencia a una dosis de ARNip que será eficaz al causar una reducción mayor o igual al 95% en el ARNm a niveles de 100 nM a las 24, 48, 72, y 96 horas después de la administración, mientras una "dosis marginalmente funcional" de ARNip será eficaz al causar una reducción mayor o igual al 50% en el ARNm a 100 nM a las 24 horas de la administración y una "dosis no funcional" de ARN ocasionará una reducción de menos de 50% en los niveles de ARNm a 100 nM a las 24 horas de las administración.

Emparejamiento erróneo

El término "emparejamiento erróneo" incluye una situación en la que el emparejamiento de bases de Watson-Crick no tiene lugar entre un nucleótido de una hebra efectora y un nucleótido de una hebra antisentido, donde los nucleótidos están flanqueados por un dúplex que comprende pares de bases en la dirección 5' del emparejamiento erróneo empezando directamente después (en la dirección 5') de la posición con el emparejamiento erróneo y en la dirección 3' del emparejamiento erróneo empezando directamente después (en la dirección 3') de la posición con el emparejamiento erróneo. Un ejemplo de un emparejamiento erróneo sería una A al otro lado de una G, una C al otro lado de una A, una U al otro lado de una C, una A al otro lado de una A, una G al otro lado de una G, una C al otro lado de una C, y así sucesivamente. También se pretende que los emparejamientos erróneos incluyan un residuo no alcalino al otro lado de un nucleótido o nucleótido modificado, un residuo acíclico al otro lado de un nucleótido o nucleótido modificado, un espacio, o un bucle desemparejado. En su sentido más amplio, un emparejamiento erróneo según se utiliza en la presente memoria incluye cualquier alteración en una posición dada que disminuya la estabilidad termodinámica en o en las proximidades de la posición en la que aparece la alteración, de tal manera que la estabilidad termodinámica del dúplex en esa posición concreta sea menor que la estabilidad termodinámica de un par de bases de Watson-Crick en esa posición. Los emparejamientos erróneos preferidos incluyen una G al otro lado de una A, y una A al otro lado de una C. Un emparejamiento erróneo particularmente preferido comprende una A al otro lado de una A, una G al otro lado de una G, una C al otro lado de una C, y una U al otro lado de una U.

Nucleótido

El término "nucleótido" hace referencia a un ribonucleótido o un desoxirribonucleótido o una forma modificada del mismo, así como un análogo del mismo. Los nucleótidos incluyen especies que comprenden purinas, p. ej., adenina, hipoxantina, guanina, y sus derivados y análisis, así como pirimidinas, p. ej., citosina, uracilo, timina, y sus derivados y análogos. Preferiblemente, un "nucleótido" comprende un radical citosina, uracilo, timina, adenina, o guanina. Los nucleótidos preferidos, a menos que se especifique de otro modo (tal como, por ejemplo, cuando se especifica una modificación en 2', una modificación en 5', una modificación en 3', una modificación de una nucleobase, una conexión internucleótido modificada), incluyen citosina, uracilo, timina, adenina, y guanina no modificados.

Los análogos de nucleótidos incluyen nucleótidos que tienen modificaciones en la estructura química de la base, el azúcar y/o el fosfato, incluyendo, pero no limitadas a, modificaciones en la pirimidina en la posición 5, modificaciones en la purina en la posición 8, modificaciones en las aminas exocíclicas de la citosina, y la sustitución de 5-bromo-uracilo; y modificaciones en el azúcar de la posición 2', incluyendo pero no limitadas a, ribonucleótidos con el azúcar modificado en los que el 2'-OH es remplazado por un grupo tal como H, OR, R, halo, SH, SR, NH_2, NHR, NR_2, o CN, en donde R es un radical alquilo como se define en la presente memoria. También se pretende que los análogos de nucleótidos incluyan nucleótidos con bases tales como inosina, queuosina, xantina, azúcares tales como 2'-

metilrribosa, conexiones fosfodiéster no naturales tales como metilfosfonatos, fosforotioatos y péptidos.

Las bases modificadas hacen referencia a bases nucleotídicas tales como, por ejemplo, adenina, guanina, citosina, timina, y uracilo, xantina, inosina, y queuosina que han sido modificadas por la sustitución o adición de uno o más átomos o grupos. Algunos ejemplos de tipos de modificaciones que pueden comprender nucleótidos que están modificados con respecto a los radicales de la base, incluyen pero no están limitados a, bases alquiladas, halogenadas, tioladas, aminadas, amidadas, o acetiladas, en diferentes combinaciones. Las bases modificadas más específicas incluyen, por ejemplo, 5-propiniluridina, 5-propinilcitidina, 6-metiladenina, 6-metilguanina, N,N,-dimetiladenina, 2-propiladenina, 2-propilguanina, 2-aminoadenina, 1-metilinosina, 3-metiluridina, 5-metilcitidina, 5-metiluridina y otros nucleótidos que tienen una modificación en la posición 5, 5-(2-amino)propil uridina, 5-halocitidina, 5-halouridina, 4-acetilcitidina, 1-metiladenosina, 2-metiladenosina, 3-metilcitidina, 6-metiluridina, 2-metilguanosina, 7-metilguanosina, 2,2-dimetilguanosina, 5-metilaminoetiluridina, 5-metiloxiuridina, desazanucleótidos tales como 7-desazaadenosina, 6-azouridina, 6-azocitidina, 6-azotimidina, 5-metil-2-tiouridina, otras tiobases tales como 2-tiouridina y 4-tiouridina y 2-tiocitidina, dihidrouridina, pseudouridina, queuosina, arqueosina, grupos naftilo y naftilo sustituido, cualquier purina y pirimidina O- y N-alquilada tal como N6-metiladenosina, 5-metilcarbonilmetiluridina, ácido uridino- 5-oxiacético, piridina-4-ona, piridina-2-ona, grupos fenilo y fenilo modificado tales como aminofenol o 2,4,6-trimetoxibenceno, citosinas modificadas que actúan como nucleótidos de pinza G, adeninas y guaninas sustituidas en la posición 8, uracilos y timinas sustituidos en la posición 5, azapirimidinas, carboxihidroxialquil-nucleótidos, carboxialquilaminoalquil-nucleótidos, y nucleótidos alquilcarbonilalquilados. Los nucleótidos modificados también incluyen aquellos nucleótidos que están modificados con respecto al radical azúcar, así como los nucleótidos que tienen azúcares o análogos de los mismos que no son ribosilo. Por ejemplo, los radicales azúcar pueden ser, o basarse en, manosas, arabinosas, glucopiranosas, galactopiranosas, 4'-tiorribosa, y otros azúcares, heterociclos, o carbociclos. También se pretende que el término nucleótido incluya lo que se conoce en la técnica como bases universales. A modo de ejemplo, las bases universales incluyen, pero no están limitadas a, 3-nitropirrol, 5-nitroindol, o nebularina.

Adicionalmente, el término nucleótido también incluye aquellas especies que tienen una marca detectable, tal como por ejemplo un radical radiactivo o fluorescente, o una marca de masa anclada al nucleótido.

Unidad de nucleótido

La expresión "unidad de nucleótido" hace referencia a un único residuo de nucleótido y está comprendido por una base nitrogenada modificada o no modificada, un azúcar modificado o no modificado, y un radical modificado o no modificado que permite la conexión de dos nucleótidos entre sí o a un producto conjugado que imposibilita una conexión adicional.

No especificidad

El término "no especificidad" y la expresión "efectos no específicos" hacen referencia a cualquier caso en el que un ARNip o un ARNhp dirigido contra una diana dada ocasiona un efecto no deseado al interaccionar directamente o indirectamente con otra secuencia de ARNm, una secuencia de ADN o una proteína celular u otro radica. Por ejemplo, se puede producir un "efecto de no especificidad" cuando existe una degradación simultánea de otros transcritos debido a la homología parcial o a la complementariedad entre ese otro transcrito y la hebra efectora y/o antisentido del ARNip o el ARNhp.

Saliente

El término "saliente" hace referencia a uno o varios nucleótidos terminales con las bases no emparejadas que resultan de una hebra o región que se extiende más allá del extremo de la hebra complementaria con la cual la primera hebra o región forma un dúplex. Uno o ambos de los dos polinucleótidos o regiones de polinucleótidos que son capaces de formar un dúplex por medio de los enlaces de hidrógeno de los pares de bases pueden tener un extremo 5' y/o 3' que se prolonga más allá del extremo 3' y/o 5' de la complementariedad compartida por los dos polinucleótidos o regiones. La región de hebra sencilla que se extiende más allá del extremo 3' y/o 5' del dúplex es referida como saliente.

Portador farmacéuticamente aceptable

La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" incluye, pero no está limitada a, composiciones que facilitan la introducción de ARNdh, ADNdh, o híbridos de ARN/ADNdh en una célula e incluye, pero no se limita a, disolventes o dispersantes, recubrimientos, agentes anti-infecciosos, agentes isotónicos, y agentes que median el tiempo de absorción o la liberación de los polinucleótidos y ARNip de la invención.

Polinucleótido

El término "polinucleótido" hace referencia a polímeros de nucleótidos, y incluye, pero no se limita a, ADN, ARN, híbridos de ADN/ARN incluyendo cadenas de polinucleótidos de radicales desoxirribosilo y radicales ribosilo regularmente e irregularmente alternantes (esto es, en donde las unidades de nucleótido alternas tienen un -OH, a continuación un -H, a continuación un -OH, a continuación un -H, y así sucesivamente en la posición 2' del radical azúcar), y se incluyen modificaciones de estas clases de polinucleótidos en donde el anclaje de diferentes entidades o radicales a las unidades de nucleótido en cualquier posición. A menos que se especifique de otro modo, o quede claro a partir del contexto, el término "polinucleótido" incluye tanto ARNip unimolecular como ARNip formados por dos hebras separadas.

Polirribonucleótido

El término "polirribonucleótido" hace referencia a un polinucleótido que comprende dos o más ribonucleótidos modificados o no modificados y/o sus análogos.

Agrupación

El término "agrupación" hace referencia al proceso por medio del cual dos o más ARNip (preferiblemente ARNip diseñados racionalmente) que se dirigen a un solo gen se combinan y se introducen en una célula para inducir la reducción de la expresión de un gen.

Ribonucleótido y ácido ribonucleico

El término "ribonucleótido" y la expresión "ácido ribonucleico" (ARN), hacen referencia a un nucleótido o polinucleótido modificado o no modificado que comprende al menos una unidad de ribonucleótido. Una unidad de ribonucleótido comprende un oxígeno anclado a la posición 2' de un radical ribosilo que tiene una base nitrogenada anclada en la conexión N-glicosídica de la posición 1' de un radical ribosilo, y un radical que permite la conexión a otro nucleótido o imposibilita la conexión.

Interferencia con ARN y ARNi

La expresión "interferencia con ARN" y el término "ARNi" son sinónimos y hacen referencia al proceso por medio del cual un polinucleótido o ARNip que comprende al menos una unidad de ribonucleótido ejerce un efecto sobre un proceso biológico. El proceso incluye, pero no se limita a, silenciamiento génico mediante la degradación del ARNm, atenuación de la traducción, interacciones con ARNt, ARNr, ARNhn, ADNc y ADN genómico, así como metilación del ADN con proteínas accesorias.

Segundo nucleótido

El término "segundo nucleótido" o "nucleótido número 2" hace referencia al segundo nucleótido dentro de una región dúplex sobre la hebra efectora o antisentido, contando desde el extremo 5' de cada respectiva hebra. El nucleótido puede estar emparejado o, por ejemplo en el caso de un emparejamiento erróneo, desemparejado.

Segundo nucleótido antisentido terminal 5'

La expresión "segundo nucleótido antisentido 5' terminal" hace referencia al nucleótido que es inmediatamente adyacente al primer nucleótido antisentido terminal 5' y anclado a la posición 3' del primer nucleótido antisentido terminal 5'. De este modo, es el segundo nucleótido más 5' de la hebra o región antisentido dentro del conjunto de nucleótidos para los cuales existen nucleótidos efectores complementarios.

Segundo nucleótido efector terminal 5'

La expresión "segundo nucleótido efector terminal 5'" hace referencia al nucleótido que es inmediatamente adyacente al primer nucleótido efector terminal 5' y anclado a la posición 3' del primer nucleótido efector terminal 5'. De este modo, es el segundo nucleótido más 5' de la hebra o región efectora dentro del conjunto de nucleótidos para los cuales existen los correspondientes nucleótidos antisentido.

Hebra efectora

La expresión "hebra efectora" hace referencia a un polinucleótido o región que tiene la misma secuencia de nucleótidos, en su totalidad o en parte, que un ácido nucleico diana tal como un ARN mensajero o una secuencia de ADN. La expresión "hebra efectora" incluye la región efectora de ambos polinucleótidos que se forman a partir de

dos hebras separadas, así como los ARNip unimoleculares que son capaces de formar estructuras en horquilla. Cuando se proporciona una secuencia, por convenio, a menos que se indique de otro modo, esa es la hebra efectora (o región), y la presencia de la hebra antisentido complementaria (o región) está implícita. Se pretende que las expresiones "hebra efectora" y "región efectora" sean equivalentes y se utilizan indistintamente.

ARNip o ARN de interferencia pequeño

El término "ARNip" y la expresión "ARN de interferencia pequeño" hacen referencia a ácidos nucleicos unimoleculares y a ácidos nucleicos que comprenden dos hebras separadas que son capaces de llevar a cabo la interferencia con ARN y que tienen una región dúplex que tiene entre 18 y 30 pares de bases de longitud. Adicionalmente, el término ARNip y la expresión "ARN de interferencia pequeño" incluyen ácidos nucleicos que también contienen radicales distintos de radicales ribonucleótido, incluyendo, pero no limitados a, nucleótidos modificados, conexiones internucleótido modificadas, no nucleótidos, desoxinucleótidos y análogos de los nucleótidos anteriormente mencionados.

Los ARNip pueden ser dúplex y también pueden comprender polinucleótidos unimoleculares. Tales moléculas unimoleculares comprenden regiones de auto-complementariedad (tallo) por medio de las cuales los nucleótidos de una región del polinucleótido se emparejan con otra región del polinucleótido (formando de ese modo un dúplex), y están separadas por un bucle. Tales moléculas unimoleculares pueden variar en tamaño y diseño y son referidas por medio de una variedad de nombres que incluye, pero no se limitan a, horquillas, ARN en horquilla pequeño (ARNhp), microARN (miARN) y ARN temporales pequeños (ARNtp). La longitud de la región del tallo en estas moléculas puede variar entre 18 y 45 nucleótidos de longitud. De un modo similar, el tamaño del bucle puede variar entre 4 y 23 nucleótidos y puede comprender composiciones de nucleótidos, no nucleótidos, y nucleótido-no-nucleótido.

Cuando los ARNip son horquillas, la hebra efectora y la hebra antisentido son parte de una molécula más larga.

Complementariedad sustancial

La complementariedad sustancial hace referencia a hebras de polinucleótido que muestran una complementariedad de 80% o mayor.

Realizaciones preferidas

De acuerdo con una primera realización, la presente invención está dirigida a.

Un ARNip de doble hebra que comprende:

i. una hebra efectora que comprende
   a. un primer nucleótido efector terminal 5', en donde dicho primer nucleótido efector terminal 5' comprende una primera modificación 2'-O-alquilo, y
   b. un segundo nucleótido efector terminal 5', en donde dicho segundo nucleótido efectos terminal 5' comprende una segunda modificación 2'-O-alquilo; y
ii. una hebra antisentido que comprende
   a. un primer nucleótido antisentido 5' terminal, en donde dicho primer nucleótido antisentido terminal 5' tiene uno o más grupos fosfato anclados al carbono 5' de su radical azúcar, y
   b. un segundo nucleótido antisentido terminal 5', en donde dicho segundo nucleótido antisentido 5' terminal comprende una tercera modificación 2'-O-alquilo,

en donde dicha hebra efectora y dicha hebra antisentido son capaces de formar un dúplex de 18-30 pares de bases de nucleótidos que tiene una complementariedad de 100% a lo largo del intervalo del dúplex, y dentro de dicho dúplex, dicho primer nucleótido efector terminal 5' es el nucleótido más 5' de la hebra efectora, dicho segundo nucleótido efector terminal 5' es inmediatamente adyacente y está aguas abajo del primer nucleótido efector terminal 5', dicho primer nucleótido antisentido terminal 5' es el nucleótido más 5' de la hebra antisentido y dicho segundo nucleótido antisentido 5' terminal es inmediatamente adyacente y está aguas abajo del primer nucleótido antisentido terminal 5', en donde todos los nucleótidos de la hebra efectora y la hebra antisentido distintos de dicho primer nucleótido efector terminal 5', dicho segundo nucleótido efector terminal 5', y dicho segundo nucleótido antisentido 5' terminal comprende un 2'-OH.

La primera modificación 2'-O-alquilo comprende preferiblemente 2'-O-metilo, la segunda modificación 2'-O-alquilo comprende preferiblemente 2'-O-metilo, y la tercera modificación 2'-O-alquilo comprende preferiblemente 2'-O-metilo.

Los autores reconocen que la segunda posición de la hebra antisentido (y efectora) de los ARNip que tienen entre 18 y24 pb de longitud, es (a diferencia de cualquier otra base o par de bases en el ARNip) una posición clave en la

mediación del silenciamiento de dianas distintas de la diana deseada (esto es, dianas inespecíficas) y que las modificaciones/alteraciones de esta posición se pueden utilizar para eliminar los efectos no específicos generada por cualquier ARNip. Como se muestra en el Ejemplo 8 de este documento, la modificación química de la posición 2 elimina eficazmente los efectos no específicos generados por esa hebra medidos mediante análisis de micromatrices. De un modo similar, el Ejemplo 9 demuestra cómo la adición de emparejamientos erróneos de pares de bases en la posición 2 (y otras posiciones) puede alterar espectacularmente el patrón de los efectos no específicos. La capacidad para desplazar o alterar los efectos no específicos es particularmente valiosa en los casos en los que la regulación a la baja de uno o más genes diana inespecíficos induce un fenotipo no deseable. La evidencia de que tales fenotipos inducidos por la no especificidad existen y se pueden eliminar mediante alteraciones en la posición 2 de la hebra AS se proporciona en el Ejemplo 10.

El conocimiento de la importancia de la posición 2 (en la hebra efectora y/o antisentido) permite eliminar eficazmente los efectos no específicos por medio de una variedad de estrategias. Por ejemplo, la adición de una modificación 2' (tal como una modificación 2'-O-alquilo en esta posición p. ej. sobre la hebra antisentido, puede eliminar los efectos no específicos atribuibles a esta hebra. De un modo similar, se puede sustituir una base en la posición 2, p. ej., de la hebra antisentido, de manera que exista ahora un emparejamiento erróneo entre el ARNm diana pretendido y la hebra antisentido del ARNip. Si bien un emparejamiento erróneo de un solo par de bases (o una modificación) en esta posición no alterará espectacularmente la capacidad de este ARNip para silenciar la diana pretendida, alterará la capacidad del ARNip para silenciar las dianas inespecíficas. Se debe observar que los emparejamientos erróneos de pares de bases en las posiciones distintas de la posición 2 p. ej de la hebra antisentido (p. ej. en las posiciones 3, 4, 5, 6, 7, o 8 de la hebra antisentido de un dúplex de ARNip en el que la numeración hace referencia a una localización con respecto al extremo 5 de la hebra antisentido, siendo la posición 2 el nucleótido que está adyacente al nucleótido más 5' de la hebra antisentido) también pueden reducir, eliminar, o alterar los efectos específicos no específicos. Los emparejamientos erróneos adecuados incluyen, pero no están limitados a, emparejamientos A-G, emparejamientos A-A, emparejamientos G-G, emparejamientos C-C, y emparejamientos U-U. Por otra parte, la posición del emparejamiento erróneo está preferiblemente en la posición 3, 4, 5, 6, 7, o 8 de la hebra antisentido o efectora. Muy preferiblemente, la posición del emparejamiento erróneo es en la posición 2 de la hebra antisentido o efectora. Se debe observar que si bien el uso de sustituciones de pares de bases como ésta puede eliminar el conjunto original de dianas erróneas, pueden producirse nuevas dianas erróneas (resultantes de la complementariedad a un nuevo conjunto de genes). Por esta razón, es más preferible que las modificaciones químicas descritas en esta invención sean añadidas al ARNip que elimina o minimiza todos los efectos no específicos. De este modo se puede utilizar modificaciones que incluyen, pero no se limitan a: 1) modificaciones químicas de la base, el azúcar o la conexión internucleótido del nucleótido número dos de la hebra efectora y/o antisentido; (2) alteraciones de nucleótidos o de pares de nucleótidos en la posición 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 de la hebra efectora y/o antisentido de un ARNip, incluyendo la sustitución de una base o un par de bases de manera que se genere un emparejamiento erróneo entre un ARNm inespecífico potencial y la hebra efectora y/o antisentido del ARNip; (3) alteraciones de nucleótidos o pares de nucleótidos en la posición 2 de la hebra efectora y/o antisentido de un ARNip, incluyendo la deleción de un nucleótido o un par de nucleótidos en la posición 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 de manera que se genere una protuberancia en el transcrito inespecífico cuando éste hibrida con la hebra efectora y/o antisentido del ARNip; (4) alteraciones de nucleótidos o de pares de nucleótidos en la posición 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 de la hebra efectora y/o antisentido de un ARNip, incluyendo inserciones de un nucleótido o un par de nucleótidos en la posición 2, de manera que se genere una protuberancia en la hebra efectora o antisentido del ARNip cuando éste hibrida con el mensaje del ARNm inespecífico, o (5) alteraciones de un nucleótido o un par de nucleótidos en la posición 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 de la hebra efectora y/o antisentido de un ARNip, incluyendo la presencia de nucleótidos abásicos, o nucleótidos con modificaciones en la posición C3 del anillo de azúcar, para eliminar, minimizar, o alterar los efectos no específicos en casos críticos. Los emparejamientos erróneos descritos anteriormente se pueden utilizar junto con cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria para reducir los efectos no específicos.

Dicho esto, el ARNip de la primera realización comprende 18-19 pares de bases, excluyendo los salientes. Estas moléculas no son procesadas (o son escasamente procesadas) por la ARNasa de Tipo III, Dicer, y por esta razón, el patrón de modificaciones se conserva dentro de la célula. La hebra efectora y la hebra antisentido son 100% complementarias a lo largo del intervalo de pares de bases. Preferiblemente, el polinucleótido es ARN.

El ARNip de la primera realización también puede contener salientes de 1-6 nucleótidos en cualquiera de los extremos 5' o 3' de cualquier hebra efectora y/o hebra antisentido. Sin embargo, preferiblemente su existe algún saliente, está en el extremo 3' de la hebra efectora y/o la hebra antisentido. Adicionalmente, preferiblemente cualquiera de los salientes tiene seis o menos bases de longitud, más preferiblemente dos o menos bases de longitud. Muy preferiblemente, o bien no hay salientes, o bien hay salientes de dos bases en una o ambas de la hebra efectora y la hebra antisentido en el extremo 3'. Debido a que los nucleótidos salientes son frecuentemente eliminados por uno o más procesos o eventos enzimáticos intracelulares, conduciendo de ese modo a un 5'-nucleótido no fosforilado, es preferible no tener salientes en el extremo 5' de la hebra antisentido. Además, los salientes pueden contener una o más modificaciones estabilizadoras, tales como una modificación de halógeno de la posición 2' o modificaciones internucleótido tales como modificaciones fosforotioato, fosforoditioato, o metilfosfonato.

En una referencia adicional a la primera realización, la fosforilación del primer nucleótido antisentido terminal 5' hace referencia a la presencia de uno o más grupos fosfato anclados al carbono 5' del radical azúcar del nucleótido. Preferiblemente hay solamente un grupo fosfato.

De acuerdo con la presente realización, la modificación del primer y segundo nucleótidos efectores 5' y el segundo nucleótido antisentido 5' es un grupo 2'-O-alquilo. Preferiblemente la modificación se selecciona del grupo que consiste en 2'-O-metilo, 2'-O-etilo, 2'-O-propilo, 2'-O-isopropilo, 2'-O-butilo, 2-O-isobutilo, 2'-O-etil-O-metilo ($-OCH_2CH_2OCH_3$), y 2'-O-etil-OH ($-OCH_2CH_2OH$). Muy preferiblemente, la modificación 2'-O-alquilo es un radical 2'-O-metilo. Adicionalmente, no hay necesidad de que la modificación sea la misma en cada uno del primer nucleótido efector 5', el segundo nucleótido efector 5', o el segundo nucleótido antisentido. No obstante, por razones prácticas con respecto a la síntesis de las moléculas de la presente invención, puede ser deseable utilizar la misma modificación durante todo el proceso.

Alternativamente, la molécula puede tener una hebra efectora en donde la hebra efectora comprende un primer nucleótido efector 5', en donde dicho primer nucleótido efector 5' comprende una primera modificación 2'-O-alquilo, y un segundo nucleótido efector 5', en donde dicho segundo nucleótido efector 5' comprende una segunda modificación 2'-O-alquilo; y todas las C y U (distintas de cualquier de las posiciones mencionadas anteriormente) están modificadas con una modificación 2'-O-alquilo; y una hebra antisentido, en donde dicha hebra antisentido comprende un primer nucleótido antisentido 5', en donde dicho primer nucleótido antisentido 5' está fosforilado, y un segundo nucleótido antisentido 5', en donde dicho segundo nucleótido antisentido 5' comprende una tercera modificación 2'-O-alquilo, y todas las C y U (distintas de si está presente en el segundo nucleótido antisentido 5') están modificadas con un F 2'. Además, estas moléculas pueden comprender un saliente de 2 nucleótidos en el extremo 3' de cualquiera o de ambas hebras y dicho saliente puede comprender adicionalmente una conexión internucleótidos estabilizada entre: (1) los dos nucleótidos del saliente; y (2) el penúltimo nucleótido del saliente y el nucleótido final de la región dúplex, que comprende una conexión fosforotioato, a fosforoditioato, o metilfosfonato.

Alternativamente, la molécula puede contener una hebra efectora en donde la hebra efectora comprende un primer nucleótido efector 5', en donde dicho primer nucleótido efector 5' comprende a desoxinucleótido 5'; y una hebra antisentido, en donde dicho hebra antisentido comprende un primer nucleótido antisentido 5', en donde dicho primer nucleótido antisentido 5' está fosforilado en el carbono 5', y un segundo nucleótido antisentido 5', en donde dicho segundo nucleótido antisentido 5' comprende una modificación 2'-O-alquilo. Para que una hebra participe en el silenciamiento génico por medio de la ruta de la interferencia con ARN, el extremo 5' de la hebra debe estar fosforilado en la posición del carbeno 5'. La presencia de un desoxinucleótido 5' en el extremo 5' elimina el grupo funcional (-OH) de esa hebra, eliminando de ese modo la capacidad de las quinasas residentes añaden un fosfato en esta posición. Sin un grupo fosfato en el extremo 5', la capacidad de que esta hebra esté implicada en el silenciamiento de la diana correcta e inespecífica mediado por RISC se reduce.

Si bien la invención identifica grupos 2'-O-alquilo en las posiciones referidas anteriormente, los autores de la invención reconocen que también se pueden utilizar otros grupos de modificación química en posiciones idénticas o similares para minimizar los efectos no específicos. Por ejemplo, el nucleótido modificado 2' puede ser un nucleótido modificado con halógeno en 2', un nucleótido modificado con amina en 2', y un nucleótido modificado con alquilo en 2' si tales modificaciones se incluyen en condiciones que minimicen los efectos no específicos. Cuando la modificación es un halógeno, el halógeno es preferiblemente flúor. Cuando el nucleótido modificado en 2' es un nucleótido modificado con amina en 2', la amina es preferiblemente $-NH_2$. Cuando el nucleótido modificado en 2' es una modificación con 2'-alquilo, preferiblemente la modificación se selecciona del grupo que consiste en un radical metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, o isobutilo. Muy preferiblemente, se utiliza una modificación con metilo en 2', en donde el carbono del radical metilo está anclado directamente al carbono 2' del radical azúcar.

Como se ha establecido anteriormente, el patrón de modificación de la primera realización es aplicable a moléculas que no son procesadas por Dicer. Aunque no forman parte de la invención reivindicada actualmente, también pueden ser útiles dúplex más largos (p. ej., 25-30 pares de bases). Estas moléculas son sustratos potenciales para Dicer y por esa razón, se deben incorporar desplazamientos en el patrón de modificación y patrones distintos de longitud y posición de los salientes al diseño del dúplex para garantizar que todo el complemento de modificaciones descritas en la primera realización está presente en el dúplex final, después del procesamiento por Dicer. En un ejemplo no limitante, la estructura de los extremos del dúplex se diseña para garantizar que el producto final porta las modificaciones necesarias en las posiciones apropiadas. El lado en el cual entra Dicer en un dúplex puede estar influenciado por la presencia o ausencia de salientes. Además, la posición de la escisión por Dicer puede ser manipulada variando la longitud del saliente 3'. De este modo, por ejemplo, un diseño preferido para las moléculas que tienen 26 pares de bases o más incluye: (1) un saliente de 1, 2, o 3 nucleótidos en el extremo 3' de la hebra efectora, y ningún saliente en el extremo opuesto del dúplex; (2) una modificación 2'-O-alquilo en el segundo nucleótido antisentido (contando desdel el extremo 5' de la hebra); (3) fosforilación del carbono 5' del primer nucleótido antisentido; y (4) modificaciones 2'-O-alquilo emparejadas en los nucleótidos 21 y 12, 22 y 23, o 23 y 24 de la hebra efectora (contando desde el extremo 3' de la hebra efectora, saliente incluido). La adición de la hebra

efectora 3' influye en el lado en el que Dicer entra en el dúplex (esto es, Dicer entrará preferiblemente en el lado de la molécula que contiene el saliente en lugar de en el extremo romo de la molécula). Esto garantiza la conservación/retención de ambas modificaciones antisentido (esto es, la modificación 2'-O-alquilo en el segundo nucleótido antisentido, y el grupo fosfato 5' en el primer nucleótido antisentido) en el ARNip final, después del procesamiento con Dicer. Además, las posiciones de las m modificaciones de la hebra efectora garantizan que después del procesamiento con Dicer, estas modificaciones estarán presentes en los nucleótidos efectores terminales (nucleótidos efectores 1 y 2) del ARNip procesado, final (véase la **Figura 1).**

De acuerdo con una segunda realización, la presente invención hace referencia a un ARNip unimolecular capaz de formar un ARNip en horquilla, comprendiendo dicho ARNip unimolecular:

a. una hebra efectora, que comprende
   i. un primer nucleótido efector terminal 5', en donde dicho primer nucleótido efector terminal 5' comprende una primer modificación 2'-O-alquilo, y
   ii. un segundo nucleótido efector terminal 5', en donde dicho segundo nucleótido efector terminal 5' comprende una segunda modificación 2'-O-alquilo; y
b. una hebra antisentido, que comprende
   i. un primer nucleótido antisentido terminal 5', en donde dicho primer nucleótido antisentido terminal 5' tiene uno o más grupos fosfato anclados al carbono 5' de su radical azúcar, y
   ii. un segundo nucleótido antisentido terminal 5', en donde dicho segundo nucleótido antisentido 5' terminal comprende una tercera modificación 2'-O-alquilo, y

una región bucle, en donde dicha región bucle está localizada entre dicha hebra efectora y dicha hebra antisentido y en donde dicha hebra efectora y dicha hebra antisentido son capaces de formar un dúplex de 18-19 pares de bases de nucleótidos que tiene una complementariedad de 100% a lo largo del intervalo del dúplex, y dentro de dicho dúplex dicho primer nucleótido efector terminal 5' es el nucleótido más 5' de la hebra efectora, dicho segundo nucleótido efector terminal 5' es inmediatamente adyacente y está aguas abajo del primer nucleótido efector terminal 5', dicho primer nucleótido antisentido terminal 5' es el nucleótido más 5' de la hebra antisentido y dicho segundo nucleótido antisentido 5' terminal es inmediatamente adyacente y está aguas abajo del primer nucleótido antisentido terminal 5', en donde todos los nucleótidos de la hebra efectora y la hebra antisentido distintos de dicho primer nucleótido efector terminal 5', dicho segundo nucleótido efector terminal 5', y dicho segundo nucleótido antisentido 5' terminal comprenden un 2'-OH.

De acuerdo con esta realización, la gama de modificaciones es la misma que la de la primera realización. No obstante, debido a que el polinucleótido es unimolecular y es capaz de formar una horquilla, y no dos hebras separadas, existe una molécula contigua que comprende tanto una región efectora como una región antisentido. La región efectora y la región antisentido son complementarias al 100%. Preferiblemente, la longitud completa del ARNip unimolecular contiene menos de 100 bases, más preferiblemente menos de 85 bases. Preferiblemente el nucleótido es ARN.

Las horquillas comprenden dos componentes principales incluyendo un tallo (que es una región de doble hebra que empareja la hebra antisentido y la hebra efectora) y un bucle. Opcionalmente, se puede añadir una secuencia saliente al extremo 5', 3' o ambos de la molécula. Preferiblemente, cuando se encuentra presente un saliente, éste está asociado con el extremo 3' de la molécula. Cuando se diseña una ARNip unimolecular, la horquilla se puede diseñar como una horquilla hacia la izquierda (p. ej., 5'-AS-Bucle-S) o una horquilla hacia la derecha (p. ej., 5'-S-Bucle-AS). Preferiblemente, la horquilla es hacia la izquierda. Esta construcción es deseable porque es más fácil fosforilar el nucleótido antisentido terminal. Como sucedió con el ARNip de doble hebra, la longitud del tallo de la molécula determina si ésta será procesada o no por Dicer. Puesto que las horquillas que contienen estructuras en bucle más largas son sustratos para Dicer, la posición de las modificaciones químicas se debe ajustar para garantizar que el producto del procesamiento post-Dicer final contiene las modificaciones en las posiciones deseadas. Preferiblemente, la molécula procesada post-Dicer contiene todas las modificaciones descritas en la primera realización. En un ejemplo no limitante, los diseños de horquilla preferidos para las moléculas unimoleculares que tienen tallos que son más largos de 24 bases incluyen las siguientes propiedades: (1) un diseño de horquilla hacia la izquierda, (2) un saliente 3' de 1-3 nucleótidos, (3) un grupo fosfato en el carbono 5' del nucleótido más 5', (4) una modificación 2'-O-alquilo (preferiblemente un O-metilo) del segundo nucleótido antisentido, y (5) modificaciones 2'-O-alquilo emparejadas en los nucleótidos 21 y 22, 22 y 23, o 23 y 24 de la hebra efectora (contando desde el extremo 3' de la hebra efectora, saliente incluido). La adición del saliente de la hebra efectora 3' intensifica la capacidad de Dicer para entrar en la horquilla en el extremo AS 5' de la molécula. Además, las posiciones de las modificaciones de la hebra efectora aseguran que después del procesamiento con Dicer, estas modificaciones estarán presentes en los terminales efectores del nucleótido (nucleótidos efectores 1 y 2 que tienen bases complementarias en la hebra antisentido) del ARNip procesado final (véase la Figura 2).

La horquilla puede comprender una estructura en bucle, que comprende preferiblemente comprende de cuatro a diez bases. Las bases del bucle se pueden modificar. Alternativamente, el bucle puede comprender componentes no

nucleotídicos tales como los descritos en la Solicitud de patente de los estados Unidos Núm. 10/635108, publicada el 25 de Marzo de 2004, como US 2004/0058886 A1. Las secuencias preferibles de la estructura en bucle incluyen, por ejemplo, 5'-UUCG-3' (SEQ. ID NO. 18), 5'-UUUGUGUAG-3' (SEQ. ID NO. 19), 5'-CUUCCUGUCA-3' (SEQ. ID NO. 20), 5'-AUAUGUG-3' (SEQ. ID NO. 21), o cualquier otro bucle identificado anteriormente o pre-miARN.

Como se ha descrito previamente, el ARNip unimolecular de la presente invención puede ser procesado por último por la maquinaria celular de manera que se convierta en dos hebras separadas. Adicionalmente, estos ARNip unimoleculares pueden ser introducidos en la célula sin incluir todas las modificaciones, y modificados en la propia célula por medio del uso de procesos naturales o moléculas procesadoras que hayan sido introducidas (p. ej., fosforilación en la célula). Sin embargo, preferiblemente el ARNip se introduce con todas las modificaciones ya presentes. (De un modo similar, las hebras de la primera realización se introducen preferiblemente en la célula con todas las modificaciones, aunque la hebra antisentido podría, p. ej., ser modificada después de la introducción). Si una horquilla es procesada por Dicer, la horquilla resultante conserva las modificaciones de las diferentes realizaciones descritas en la presente memoria.

No se debe considerar que las modificaciones anteriormente descritas sugieran que ningún otro radical pueda ser modificado además los nucleótidos descritos, que también contribuyen a minimizar los efectos no específicos o a intensificar otras propiedades del ARNip (tales como una mejor estabilidad o funcionalidad). Son posibles otros tipos de modificaciones con tal que no incrementen de manera inaceptable los efectos no específicos. En ciertas realizaciones, tales modificaciones adicionales pueden ser añadidas a un, dos, tres, o más nucleótidos consecutivos o cada dos nucleótidos de la hebra efectora. Alternativamente, las modificaciones adicionales se pueden confinar a posiciones específicas que han sido identificadas por ser claves para el acceso a la hebra efectora y/o el uso por RISC. Como se ha mencionado previamente, además, se pueden añadir modificaciones adicionales, tales como grupos 2'-O-alquilo (u otras modificaciones en 2') a una o más, preferiblemente todas, las pirimidinas (p. ej., nucleótidos C y/o U) de la hebra efectora y/o se pueden añadir modificaciones 2'-F (o modificaciones con otros halógenos) a una o más, preferiblemente todas las pirimidinas (p. ej., nucleótidos C y/o U) de la hebra antisentido distintas de los nucleótidos que están modificados de otro modo como se ha especificado más arriba. Las modificaciones tales como 2'-F o 2'-O-alquilo de algunos o todos los C y U de la hebra antisentido y/o efectora (respectivamente) y otros nucleótidos especificados anteriormente pueden intensificar enormemente la estabilidad de las moléculas de ARNip/ARNhp que portan las modificaciones descritas en las realizaciones 1 y 2, sin alterar apreciablemente al silenciamiento específico de la diana.

Adicionalmente, si se utiliza una marca junto con la invención, estos agentes puede ser útil como agentes de seguimiento, que podrían ayudar en la detección de la transfección, así como en la detección de en qué parte de la células está presente la molécula. Los ejemplos de las marcas utilizadas comúnmente incluyen, pero no están limitados a, una marca fluorescente, una marca radiactiva o una marca de masa.

Adicionalmente las modificaciones de estabilización que están dirigidas a la cadena principal de fosfato también pueden ser incluidas en los ARNips para algunas aplicaciones de la presente invención. Por ejemplo, al menos un fosforotioato y/o metilfosfonato pueden sustituir al grupo fosfato en algunas o todas las posiciones 3' de cualquiera o todas las pirimidinas de las hebras efectora y/o antisentido de la cadena principal del oligonucleótido, así como en cualquier saliente, estructura en bucle o estructura en tallo que pueda estar presente. Los análogos de fosforotioato (y metilfosfonato) surgen de la modificación de los grupos fosfato en la cadena principal del oligonucleótido. En el fosforotioato, el O^- del fosfato es remplazado por un átomo de azufre. En los metilfosfonatos, el oxígeno es sustituido por un grupo metilo. Adicionalmente, se pueden utilizar modificaciones 3' del fosforotioato en lugar de, y con independencia de las modificaciones 2'-fluoro para incrementar la estabilidad de una molécula de ARNip. Estas modificaciones se pueden utilizar combinadas con las otras modificaciones descritas en la presente memoria, o con independencia de esas modificaciones en las aplicaciones de los ARNip.

En otras realizaciones, puede haber aún más modificaciones tales como las descritas a continuación: una hebra antisentido que contiene una modificación 2'-O-alquilo en el segundo nucleótido antisentido, más un grupo fosfato en el carbono 5 del primer nucleótido antisentido; más el primer nucleótido efector contando desde el extremo 5' de esa hebra es un desoxinucleótido 5'. Esto puede resultar beneficioso al reducir sustancialmente los efectos no específicos inducidos en la hebra tanto efectora como antisentido.

En otra realización, la molécula comprende las siguientes modificaciones:

(1) el segundo nucleótido antisentido terminal contiene una modificación 2'-O-alquilo; y
(2) el primer nucleótido antisentido terminal contiene un grupo fosfato en el carbono 5'; y
(3) el carbono 5' del primer nucleótido terminal de la hebra efectora comprende cualquier grupo conocido en la técnica que sea adecuado para bloquear evitando que el grupo hidroxilo acepte o se convierta en un grupo fosfato. Preferiblemente, el grupo que bloquea el nucleótido terminal 5' comprende un grupo 5'-O-alquilo, un grupo que bloquea una amina 5, o un grupo que bloquea una azida 5'.

En otra realización, cualquiera de las composiciones de la presente invención puede comprender adicionalmente

una protección terminal 3'. La protección terminal 3' puede ser, por ejemplo, una desoxitimidina invertida.

En otras realizaciones de la presente invención, cualquiera de las composiciones puede comprender un producto conjugado. El producto conjugado se puede seleccionar del grupo que consiste en aminoácidos, péptidos, polipéptidos, proteínas, azúcares, carbohidratos, lípidos, polímeros, nucleótidos, polinucleótidos, y combinaciones de los mismos. El producto conjugado puede ser, por ejemplo, colesterol o PEG. El producto conjugado puede comprender adicionalmente una marca, tal como, por ejemplo, una marca fluorescente. La marca fluorescente se puede seleccionar del grupo que consiste en TAMRA, BODIPY, Cy3, Cy5, fluoresceína, y Dabsilo. Alternativamente, la marca fluorescente puede ser cualquier marca fluorescente conocida en la técnica.

Las modificaciones anteriormente descritas de la presente invención se pueden combinar con un ARNip que contiene secuencias que fueron seleccionadas al azar, o de acuerdo con cualquier procedimiento de selección de diseño racional, por ejemplo, el algoritmo de diseño racional descrito en la Solicitud de Patente de los estados Unidos con el Núm. de Serie 10/714.333, presentada el 14 de Noviembre de 2003, titulada "Functional and Hyperfuncional siRNA"; en la Solicitud de Patente Internacional número PCT/US2003/036787, publicada el 3 de Junio de 2004 como WO 2004/045543 A2, titulada "Functional and Hyperfuncional siRNA; y en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos con el Núm. de Serie 10/940892, presentada el 14 de Septiembre de 2004, titulada "Methods and Compositions for Selecting siRNA of Improved Functionality". Adicionalmente, puede ser deseable seleccionar secuencias basadas en su totalidad o en parte en la estabilidad térmica interna, lo que puede facilitar el procesamiento por la maquinaria celular.

Se debe observar que las modificaciones de la primera y segunda realizaciones de la presente invención pueden tener diferentes efectos dependiendo de la funcionalidad de los ARNip que se empleen. De este modo, en los ARNip altamente funcionales, las modificaciones de la presente invención pueden hacer que una molécula pierda una cierta cantidad de funcionalidad, pero sin embargo sería deseable puesto que se reducen los efectos no específicos. En contraste, cuado se utilizan ARNip moderadamente o escasamente funcionales, hay un descenso muy pequeño de la funcionalidad y en algunos casos, la funcionalidad puede aumentar.

Se pueden utilizar varios enfoques para identificar tanto el tipo de molécula como la posición clave necesaria para eliminar los efectos no específicos en la hebra efectora y/o antisentido. En un ejemplo no limitante, se realizó un paseo de modificación de la función. En este procedimiento, se añade un solo tipo de modificación a uno o más nucleótidos a lo largo de la hebra efectora y/o antisentido. Con posterioridad, se someten a ensayo las moléculas modificadas y no modificadas para determinar: (1) la funcionalidad; y (2) los efectos no específicos, por uno de los diversos métodos. De este modo, por ejemplo, se pueden añadir grupos 2'-O-Me en las posiciones 1 y 2, 3 y 4, 5 y 6, 7 y 8, 9 y 10, 11 y 12, 13 y 14, 15 y 16, 17 y 18, o 18 y 19 de la hebra efectora y/o antisentido y someter a ensayo para determinar la funcionalidad (p. ej., midiendo la capacidad de estas moléculas para silenciar dianas específicas) y los efectos no específicos. Si se identifican posiciones clave que eliminan alguno o todos las inespecificidades, pero que dan como resultado una pérdida de funcionalidad del dúplex, se realiza una segunda ronda de paseos de modificación, por medio de la cual se pueden añadir grupos químicos adicionales (p. ej., 5' fosfato en el extremo 5' de la hebra antisentido), emparejamientos erróneos, o protuberancias que se sospecha que aumentan la funcionalidad del dúplex, a moléculas que ya contienen la modificación que elimina la no especificidad.

Con el fin de determinar qué modificaciones son permisibles, se pueden llevar a cabo varios análisis no limitantes para identificar las modificaciones que limitan los efectos no específicos. En un ejemplo no limitante, la hebra efectora o antisentido (que porta la modificación que está siendo sometida a ensayo) se puede marcar con uno de los muchos nucleótidos marcados. Con posterioridad, se puede llevar a cabo un análisis por medio del cual se puede comparar la afinidad de RISC, p. ej., por la hebra efectora modificada con la de la forma no modificada. Alternativamente, los ARNip que contienen diversas modificaciones se pueden transfectar a células por medio de una variedad de metodologías y los cultivos se pueden evaluar con posterioridad mediante análisis de micromatrices para determinar si las modificaciones alteran el número y el patrón de los genes distintos del gen diana.

De acuerdo con una tercera realización, la presente invención está dirigida a un método para minimizar los efectos no específicos, comprendiendo dicho método exponer un ARNip modificado que contiene las modificaciones descritas en la realización 1, a un ácido nucleico diana, o a una célula u organismo que o bien expresa el ácido nucleico diana o bien es capaz de expresar el ácido nucleico diana.

De acuerdo con otra realización, la presente invención está dirigida a un método para minimizar los efectos no específicos, comprendiendo dicho método exponer un ARNip unimolecular que contiene las modificaciones descritas en la segunda realización a un ácido nucleico diana, o a una célula u organismo que o bien expresa el ácido nucleico diana o bien es capaz de expresar el ácido nucleico diana.

En diversas realizaciones, puede estar presente un saliente 3' de 1 a 6 bases en al menos una de la hebra efectora y la hebra antisentido. El saliente puede estar presente con cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria en la presente memoria, a menos que se especifique de otro modo o esté implícito en el contexto.

Los ARNips de la presente invención se pueden utilizar para preparar un kit, que comprende al menos dos ARNip, en donde al menos dos ARNip comprende un primer ARNip y un segundo ARNip, y en donde cada uno del primer ARNip y el segundo ARNip comprende:

i. a hebra efectora, en donde dicha hebra efectora comprende
a. un primer nucleótido efector terminal 5', en donde dicho primer nucleótido efector terminal 5' comprende una primera modificación 2'-O-alquilo; y
b. un segundo nucleótido efector terminal 5', en donde dicho segundo nucleótido efector terminal 5' comprende una segunda modificación 2'-O-alquilo; y
ii. una hebra antisentido, en donde dicha hebra antisentido comprende
a. un primer nucleótido antisentido terminal 5', en donde dicho primer nucleótido antisentido terminal 5' tiene uno o más grupos fosfato anclados al carbono 5' de su radical azúcar; y
b. un segundo nucleótido antisentido terminal 5', en donde dicho segundo nucleótido antisentido 5' terminal comprende una tercera modificación 2'-O-alquilo;

en donde dicha hebra efectora y dicha hebra antisentido son capaces de formar un dúplex de 18-19 pares de bases de nucleótidos, en donde el dúplex tiene una complementariedad de 100% a lo largo del intervalo del dúplex, y dentro de dicho dúplex dicho primer nucleótido efector terminal 5' es el nucleótido más 5' de la hebra efectora, y dicho segundo nucleótido efector terminal 5' es inmediatamente adyacente y está aguas abajo del primer nucleótido efector terminal 5'; dicho primer nucleótido antisentido terminal 5' es el nucleótido más 5' de la hebra antisentido y dicho segundo nucleótido antisentido 5' terminal es inmediatamente adyacente y está aguas abajo del primer nucleótido antisentido terminal 5', en donde todos los nucleótidos de cada hebra distintos de dicho primer nucleótido efector terminal 5', dicho segundo nucleótido efector terminal 5', y dicho segundo nucleótido antisentido 5' terminal comprende un 2'-OH.

Semejante kit puede comprender ARNips en donde el primer ARNip y el segundo ARNip comprenden cada uno una secuencia que es al menos sustancialmente complementaria a una región en el ARNm diana. El kit puede comprender un ARNip en donde la región del ARNm diana a la cual es al menos sustancialmente complementaria la secuencia del primer ARNip se solapa con la región del ARNm diana a la cual es al menos sustancialmente complementaria la secuencia del segundo ARNip. El kit puede comprender ARNip de manera que la región del ARNm diana a la cual es al menos sustancialmente complementaria la secuencia del primer ARNip no se solapa con la región del ARNm diana a la cual es al menos sustancialmente complementaria la secuencia del segundo ARNip.

Los ARNip de la segunda realización se pueden utilizar para preparar un kit, que comprende al menos dos ARNip unimoleculares, en donde al menos dos ARNip comprenden un primer ARNip y un segundo ARNip, y en donde cada uno del primer ARNip y el segundo ARNip comprende:

i. una región efectora, en donde dicha región efectora comprende
a. un primer nucleótido efector terminal 5', en donde dicho primer nucleótido efector terminal 5' comprende una primer modificación 2'-O-alquilo; y
b. un segundo nucleótido efector terminal 5', en donde dicho segundo nucleótido efector terminal 5' comprende una segunda modificación 2'-O-alquilo; y
ii. una región antisentido, en donde dicha región antisentido comprende
a. un primer nucleótido antisentido terminal 5', en donde dicho primer nucleótido antisentido terminal 5' tiene uno o más grupos fosfato anclados al carbono 5' de su radical azúcar; y
b. un segundo nucleótido antisentido terminal 5', en donde dicho segundo nucleótido antisentido 5' terminal comprende una tercera modificación 2'-O-alquilo;

en donde dicha región efectora y dicha región antisentido son capaces de formar un dúplex de 18-19 pares de bases de nucleótidos, en donde el dúplex tiene una complementariedad de 100% a lo largo del intervalo del dúplex, y dentro de dicho dúplex dicho primer nucleótido efector terminal 5' es el nucleótido más 5' de la región efectora, y dicho segundo nucleótido efector terminal 5' es inmediatamente adyacente y está aguas abajo del primer nucleótido efector terminal 5'; dicho primer nucleótido antisentido terminal 5' es el nucleótido más 5' de la región antisentido y dicho segundo nucleótido antisentido 5' terminal es inmediatamente adyacente y está aguas abajo del primer nucleótido antisentido terminal 5', en donde todos los nucleótidos de la región efectora y la región antisentido distintos de dicho primer nucleótido efector terminal 5', dicho segundo nucleótido efector terminal 5', y dicho segundo nucleótido antisentido 5' terminal comprenden un 2'-OH.

El kit puede comprender ARNip de manera que el primer ARNip y el segundo ARNip comprendan cada uno una secuencia de sea al menos sustancialmente complementaria a una región en un ARNm diana. En algunas realizaciones, el kit comprende ARNip de manera que la región del ARN diana a la cual es al menos sustancialmente complementaria la secuencia del primer ARNip se solapara con la región del ARNm diana a la cual es al menos sustancialmente complementaria la secuencia del segundo ARNip. En algunas realizaciones, el kit comprende

ARNip de manera que la región del ARNm diana a la cual la secuencia del primer ARNip es al menos sustancialmente complementaria no se solapa con la región del ARNm diana a la cual es al menos sustancialmente complementaria la secuencia del segundo ARNip.

Los ARNip de la segunda realización se pueden utilizar para llevar a cabo un método para minimizar los efectos no específicos en el ARNi *ex vivo,* comprendiendo dicho método exponer al menos dos ARNip unimoleculares a un ácido nucleico diana o a una célula, en donde los al menos dos ARNip unimoleculares comprenden un primer ARNip unimolecular y un segundo ARNip unimolecular, en donde cada uno del primer ARNip unimolecular y el segundo ARNip unimolecular comprende

i. una región efectora, en donde dicha región efectora comprende
   a. un primer nucleótido efector terminal 5', en donde dicho primer nucleótido efector terminal 5' comprende una primera modificación 2'-O-alquilo; y
   b. un segundo nucleótido efector terminal 5', en donde dicho segundo nucleótido efector terminal 5' comprende una segunda modificación 2'-O-alquilo; y
ii. una región antisentido, en donde dicha región antisentido comprende
   a. un primer nucleótido antisentido terminal 5', en donde dicho primer nucleótido antisentido terminal 5' tiene uno o más grupos fosfato anclados al carbono 5' de su radical azúcar; y
   b. un segundo nucleótido antisentido terminal 5', en donde dicho segundo nucleótido antisentido 5' terminal comprende una tercera modificación 2'-O-alquilo;

en donde dicha región efectora y dicha región antisentido son capaces de formar un a dúplex de 18-19 pares de bases de nucleótidos, en donde el dúplex tiene una complementariedad de 100% a lo largo del intervalo del dúplex, y dentro de dicho dúplex dicho primer nucleótido efector terminal 5' es el nucleótido más 5' de la región efectora, y dicho segundo nucleótido efector terminal 5' es inmediatamente adyacente y está aguas abajo del primer nucleótido efector terminal 5';
dicho primer nucleótido antisentido terminal 5' es el nucleótido más 5' de la región antisentido y dicho segundo nucleótido antisentido 5' terminal es inmediatamente adyacente y está aguas abajo del primer nucleótido antisentido terminal 5', en donde todos los nucleótidos de la región efectora y la región antisentido distintos de dicho primer nucleótido efector terminal 5', dicho segundo nucleótido efector terminal 5', y dicho segundo nucleótido antisentido 5' terminal comprenden un 2'-OH.

El método puede comprender la utilización de ARNip en donde el primer ARNip unimolecular y el segundo ARNip unimolecular comprenden cada uno una secuencia que es al menos sustancialmente complementaria a una región de un ARNm diana. El método puede comprender la utilización de ARNip de manera que la región del ARNm diana a la cual es al menos sustancialmente complementaria la secuencia del primer ARNip unimolecular se solapa con la región del ARNm diana a la cual es al menos sustancialmente complementaria la secuencia del segundo ARNip unimolecular. El método puede comprender la utilización de ARNip de manera que la región del ARNm diana a la cual es al menos sustancialmente complementaria la secuencia del primer ARNip unimolecular no se solapa con la región del ARNm diana a la cual es al menos sustancialmente complementaria la secuencia del segundo ARNip unimolecular.

Los ARNip de la segunda realización se pueden utilizar para llevar a cabo un método para minimizar los efectos no específicos en la interferencia con ARN ex vivo, comprendiendo dicho método exponer al menos dos ARNip a un ácido nucleico diana o a una célula, en donde los al menos dos ARNip comprenden un primer ARNip y un segundo ARNip, en donde cada uno del primer ARNip y el segundo ARNip comprende

i. una hebra efectora, en donde dicha hebra efectora comprende
   a. un primer nucleótido efector terminal 5', en donde dicho primer nucleótido efector terminal 5' comprende una primera modificación 2'-O-alquilo; y
   b. un segundo nucleótido efector terminal 5', en donde dicho segundo nucleótido efector terminal 5' comprende una segunda modificación 2'-O-alquilo; y
ii. una hebra antisentido, en donde dicha hebra antisentido comprende
   a. un primer nucleótido antisentido terminal 5', en donde dicho primer nucleótido antisentido terminal 5' tiene uno o más grupos fosfato anclado al carbono 5' de su radical azúcar; y
   b. un segundo nucleótido antisentido terminal 5', en donde dicho segundo nucleótido antisentido 5' terminal comprende una tercera modificación 2'-O-alquilo;

en donde dicha hebra efectora y dicha hebra antisentido son capaces de formar un dúplex de 18-19 pares de bases de nucleótidos, en donde el dúplex tiene una complementariedad de 100% a lo largo del intervalo del dúplex, y dentro del dúplex dicho primer nucleótido efector terminal 5' es el nucleótido más 5' de la hebra efectora, y dicho segundo nucleótido efector terminal 5' es inmediatamente adyacente y está aguas abajo del primer nucleótido efector terminal 5';
dicho primer nucleótido antisentido terminal 5' es el nucleótido más 5' de la hebra antisentido y dicho segundo

nucleótido antisentido 5' terminal es inmediatamente adyacente y está aguas abajo del primer nucleótido antisentido terminal 5', en donde todos los nucleótidos de cada hebra distintos de dicho primer nucleótido efector terminal 5', dicho segundo nucleótido efector terminal 5', y dicho segundo nucleótido antisentido 5' terminal comprenden un 2'-OH.

El método puede comprender la utilización de ARNip de manera que el primer ARNip y el segundo ARNip comprenden cada uno una secuencia que es al menos sustancialmente complementaria a una región de un ARNm diana. El método puede comprender la utilización de ARNip de manera que la región del ARNm diana a la cual es al menos sustancialmente complementaria la secuencia del primer ARNip se solapa con la región del ARNm diana a la cual es al menos sustancialmente complementaria la secuencia del segundo ARNip. El método puede comprender la utilización de ARNip de manera que la región del ARNm diana a la cual es al menos sustancialmente complementaria la secuencia del primer ARNip no se solapa con la región del ARNm diana a la cual es al menos sustancialmente complementaria la secuencia del segundo ARNip.

Debido a que la capacidad del ARNdh de la presente invención para conservar la funcionalidad y mostrar una especificidad mejorada no depende de la secuencia de las bases, del tipo de célula, o de la especie en la cual se introduce, la presente invención es aplicable a una amplia gama de organismos, incluyendo, pero no limitados a, plantas, animales, protozoos, bacterias, virus y hongos. La presente invención es particularmente ventajosa para su uso en mamíferos tales como ganado vacuno, caballos, cabras, cerdos, ovejas, cánidos, roedores tales como hámsters, ratones, y ratas, y primates tales como, gorilas, chimpancés, y seres humanos.

La presente invención se puede utilizar ventajosamente con diversos tipos de células, incluyendo, pero no limitados a, células primarias, líneas celulares germinales y células somáticas. Las células pueden ser, por ejemplo, células pluripotenciales o células diferenciadas. Por ejemplo, los tipos de células pueden ser células embrionarias, oocitos, espermatozoides, adipocitos, fibroblastos, miocitos, cardiomiocitos, endotelio, neuronas, glia, células de la sangre, megacariocitos, linfocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, leucocitos, granulocitos, queratinocitos, condrocitos, osteoblastos, osteoclastos, hepatocitos y células de las glándulas endocrinas o exocrinas.

La presente invención es aplicable para su utilización en la interferencia con ARN (y/o utilización como control) dirigida contra una amplia gama de genes, incluyendo pero no limitados a, los 45.000 genes del genoma humano, tales como los implicados en enfermedades tales como la diabetes, el Alzheimer y el cáncer, así como genes de los genomas de seres humanos, ratones, hámsters, chimpancés, cabras, ovejas, caballos, camellos, cerdos, perros, gatos, nematodos (p. ej., *C. elegans*), moscas (p. ej., *D. melanogaster*), y otros vertebrados e invertebrados.

Los ARNip de la presente invención se pueden administrar a una célula mediante cualquier método que sea conocido en la actualidad o que se vaya a conocer y aquél que, procedente de la lectura de esta descripción, un experto en la técnica concluiría que es útil con la presente invención. Por ejemplo, Los ARNip pueden ser liberados pasivamente en las células. La absorción pasiva de los ARNip modificados se puede modular, por ejemplo, por medio de la presencia de un producto conjugado tal como un radical de polietilenglicol o un radical colesterol en el extremo 5' de la hebra efectora y/o, en circunstancias apropiadas, un portador farmacéuticamente aceptable.

Otros métodos para la liberación incluyen, pero no están limitados a, técnicas de transfección que emplean DEAE-Dextrano, fosfato de calcio, lípidos catiónicos/liposomas, microinyección, electroporación, inmunoporación, y acoplamiento de los ARNip a productos conjugados específicos o ligandos tales como anticuerpos, péptidos, antígenos, o receptores.

Preferiblemente, los ARNip comprenden dúplex cuando son administrados.

Adicionalmente, el método de evaluación del nivel de silenciamiento génico no está limitado. De este modo, la capacidad de silenciamiento de cualquier ARNip dado se puede estudiar por medio de cualquiera de los numerosos procedimientos sometidos a ensayo en la técnica incluyendo, pero no limitados a análisis Northern, análisis Western, RT PCR, perfilado de la expresión, y otros.

Los polinucleótidos de la presente invención se pueden sintetizar mediante cualquier método que sea conocido actualmente o que se vaya a conocer y que procedente de la lectura de esta descripción, un experto en la técnica concluiría que es útil para sintetizar las moléculas de la presente invención. Los dúplex de ARNip que contienen las modificaciones especificadas se pueden sintetizar químicamente utilizando composiciones de materiales y métodos descritos en Scaringe, S.A. (2000) "Advanced 5'-silyl-2'-orthoester approach to RNA oligonucleotide synthesis", Methods Enzymol. 317, 3-18; Scalinge, S.A. (2001) "RNA oligonucleotide synthesis via 5'-silyl-2'-orthoester chemistry," Methods 23, 206-217; Scaringe, S. y Caruthers, M.H. (1999) Patente de los Estados Unidos Núm. 5.889.136; Scaringe, S. y Caruthers, M.H. (1999) Patente de los Estados Unidos Núm. 6.008.400; Scaringe, S. (2000) Patente de los Estados Unidos Núm. 6.111.086; Scaringe, S. (2003) Patente de los Estados Unidos Núm. 6.590.093. El método de síntesis utiliza 5'-O-silil-2'-O-ortoester-3'-O-fosforamiditas con la base nucleosídica

protegida para ensamblar la secuencia de ARNip no modificada deseada sobre un soporte sólido en la dirección 3' a 5'. En resumen, la síntesis de las fosforamiditas requeridas comienza a partir de los ribonucleósidos con la base protegida convencionales (uridina, N^4-acetilcitidina, N^2-isobutirilguanosina y N^6-isobutiriladenosina). La introducción de los grupos protectores 5'-O-sililo y 2'-O-ortoester, así como el radical 3'-O-fosforamidita reactivo se completa a continuación en cinco etapas, que incluyen:

1. Bloqueo transitorio simultáneo de los grupos 5'- y 3'-hidroxilo del azúcar del nucleósido con reactivo de Markiewicz (1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano [TIPS-Cl_2]) en disolución de piridina {Markiewicz, W.T. (1979) "Tetraisopropyldisiloxane-1,3-diyl, a Group for Simultaneous Protection of 3'- and 5'-Hydroxy Functions of Nucleosides", J. Chem. Research(S), 24-25}, seguido de purificación cromatográfica;
2. Conversión regioespecífica del 2'-hidroxilo del azúcar de TIPS-nucleósido en el *bis*(acetoxietil)ortoester [derivado de ACE] utilizando tris(acetoxietil)ortoformiato en diclorometano con p-toluenesulfonato de piridinio como catalizador, seguido de purificación cromatográfica;
3. Liberación de los grupos 5'- y 3'-hidroxilo del azúcar nucleosídico por medio de la liberación específica del grupo protector de TIPS utilizando fluoruro de hidrógeno y N,N,N"N'-tetrametiletilendiamina en acetonitrilo, seguido de purificación cromatográfica;
4. Protección del 5'-hidroxilo en forma de un éter 5'-O-silílico utilizando cloruro de benzhidroxi-bis(trimetilsililoxi)sililo [BzH-Cl] en diclorometano, seguido de purificación; y
5. Conversión en el derivado de 3'-O-fosforamidita utilizando *bis*(N,N-diisopropilamino)metoxifosfina y 5-etiltio-1H-tetrazol in diclorometano/acetonitrilo, seguido de purificación cromatográfica.

Los derivados de fosforamidita son típicamente jarabes espesos, de incoloros a color amarillo pálido. Para la compatibilidad con el instrumental de síntesis de ARN automático, cada uno de los productos se disuelve en un volumen predeterminado de acetonitrilo anhidro, y esta disolución se divide en alícuotas en el número apropiado de viales de suero para proporcionar una cantidad de 1,0 mmoles de fosforamidita en cada vial. A continuación los viales se colocan en una secadora a vacío adecuada y el disolvente se elimina a alta vacío durante la noche. La atmósfera se sustituye después por argón seco, los viales se tapan con diafragmas de caucho, y las fosforamiditas empaquetadas se almacenan a -20°C hasta que es necesario. Cada fosforamidita se disuelve en acetonitrilo anhidro suficiente para dar la concentración deseada antes de la instalación en el aparato de síntesis.

La síntesis del oligorribonucleótido deseado se lleva a cabo utilizando un instrumental de síntesis automático. Ésta comienza con el nucleósido 3'-terminal unido covalentemente a través de su hidroxilo 3' a un soporte de poliestireno en cuentas sólidas por medio de una conexión escindible. La cantidad apropiada de soporte para la escala de síntesis deseada se mide en un cartucho de reacción, que después se fija al aparato de síntesis. El nucleósido unido se protege con un radical 5'-O-dimetoxitritilo, que se elimina con ácido anhidro (ácido dicloroacético en diclorometano al 3% [v/v]) con el fin de liberar el 5'-hidroxilo para el ensamblaje de la cadena.

Con posterioridad los nucleósidos de la secuencia que se van a ensamblar se añaden sucesivamente a la cadena en crecimiento sobre el soporte sólido utilizando un ciclo de cuatro etapas, que consiste en las siguientes reacciones generales:

1. Acoplamiento: la fosforamidita apropiada se activa con 5-etiltio-1H-tetrazol y se deja que reaccione con el 5'-hidroxilo libre del nucleósido u oligonucleótido unidos al soporte. La optimización de las concentraciones y excesos molares de estos dos reactivos, así como el tiempo de reacción, da como resultado rendimientos del acoplamiento generalmente por encima de 98% por ciclo.
2. Oxidación: la conexión internucleótidos formada en la etapa de acoplamiento deja el átomo de fósforo en su estado de oxidación P(III) [fosfito]. El estado de oxidación biológicamente relevante es P(V) [fosfato]. El fósforo por lo tanto se oxida de P(III) a P(V) utilizando una disolución de ensayo de butilhidroperoxido in tolueno.
3. Protección terminal: la pequeña cantidad de grupos 5'-hidroxilo que no han reaccionado se debe bloquear frente a la participación en ciclos de acoplamiento posteriores con el fin de evitar la formación de secuencias que contengan deleciones. Esto se logra tratando el soporte con un gran exceso de anhídrido acético y 1-metilimidazol en acetonitrilo, lo que bloquea eficazmente el grupo 5'-hidroxilo residual en forma de ésteres acetato.
4. Des-sililación: el 5'-hidroxil protegido con sililo debe ser desprotegido antes de la siguiente reacción de acoplamiento. Esto se logra por medio del tratamiento con trietilamina - trifluoruro de hidrógeno en N,N-dimetilformamida, lo que libera rápida y eficazmente el 5'-hidroxilo sin la eliminación concomitante de otros grupos protectores (2'-O-ACE, grupos protectores de bases N-acilados, o metilo del fosfato).

Se debe observar que entre las cuatro etapas de reacción anteriores hay varios lavados con acetonitrilo, que se emplean para eliminar el exceso de reactivos y disolventes antes de la siguiente etapa de reacción. El ciclo anterior se repite el número de veces necesario hasta que la porción no modificada del oligorribonucleótido se ha ensamblado. El método de síntesis anterior solamente es ilustrativo y no se debe considerar que limite los medios

por los cuales se pueden elaborar las moléculas. Se puede emplear cualquier método que sea conocido en la actualidad o que se vaya a conocer para sintetizar ARNip y que, procedente de la lectura de esta descripción, un experto en la técnica concluiría que es útil en relación con la presente invención

Los dúplex de ARNip de ciertas realizaciones incluyen dos nucleósidos modificados (p. ej., derivados 2'-O-metilo) en el extremo 5' de cada hebra. Los derivados de 5'-O-silil-2'-O-metilo-3'-O-fosforamidita requeridos para la introducción de estos nucleósidos modificados se preparan utilizando procedimientos similares a los descritos previamente (etapas 4 y 5 anteriores), partiendo de nucleósidos con 2'-O-metilo con la base protegida (2'-O-metil-uridina, 2'-O-metil-N^4-acetilcitidina, 2'-O-metil-N^2-isobutirilguanosina y 2'-O-metilo-N^6-isobutiriladenosina). La ausencia de 2'-hidroxilo en estos nucleósidos modificados elimina la necesidad de protección ACE de estos compuestos. Como tal, la introducción del 5'-O-sililo y el radical 3'-O-fosforamidita reactivo se completa en dos etapas, que incluyen:

1. Protección del 5'-hidroxilo en forma de un éter de 5'-O-sililo utilizando cloruro de benzhidroxi-*bis*(trimetilsililoxi)sililo (BzH-Cl) en N,N-dimetilformamida, seguido de purificación cromatográfica; y
2. Conversión en el derivado de 3'-O-fosforamidita utilizando *bis*(N,N-diisopropilamino)metoxifosfina y 5-etiltio-1H-tetrazol en diclorometano/acetonitrilo, seguido de purificación cromatográfica.

El empaquetamiento de las fosforamiditas después de la purificación se lleva a cabo utilizando los procedimientos descritos anteriormente para las nucleósido-fosforamiditas convencionales. De un modo similar, la incorporación de los dos 5'-O-silil-2'-O-metil-nucleósidos a través de sus derivados fosforamidita se completa aplicando dos veces el mismo ciclo de cuatro etapas descrito anteriormente para las nucleosido-fosforamiditas convencionales.

Los dúplex de ARNip de ciertas realizaciones de esta invención incluyen un radical fosfato en el extremo 5' de la hebra antisentido. Este fosfato se introduce químicamente como acoplamiento final a la secuencia antisentido. El derivado de fosforamidita requerido (*bis*(cianoetil)-N,N-diisopropilamino-fosforamidita) se sintetiza como sigue de manera resumida: se trata tricloruro de fósforo con un equivalente de N,N-diisopropilamina en tetrahidrofurano anhidro en presencia de trietilamina en exceso. A continuación, se añaden dos equivalentes de 3-hidroxipropionitrilo y se deja que reaccionen completamente. Finalmente, el producto se purifica mediante cromatografía. El empaquetamiento de la fosforamidita posterior a la purificación se lleva a cabo utilizando los procedimientos descritos anteriormente para las nucleosido-fosforamiditas convencionales. De un modo similar, la incorporación de la fosforamidita en el extremo 5' de la hebra antisentido se completa aplicando el mismo ciclo de cuatro etapas descrito previamente para las nucleosido-fosforamiditas convencionales.

El oligorribonucleótido protegido modificado permanece conectado al soporte sólido al final del ensamblaje de la cadena. Se utiliza un procedimiento de escisión/desprotección rápido de dos etapas para eliminar los grupos protectores metilo del fosfato, escindir el oligorribonucleótido del soporte sólido, y eliminar los grupos protectores de bases N-acilados. Se debe observar que este procedimiento también elimina los grupos protectores cianoetilo del 5'-fosfato de la hebra antisentido. Adicionalmente, el procedimiento elimina las funcionalidades acetilo del ortoéster ACE, convirtiendo el grupo protector 2'-O-ACE en el *bis*(2-hidroxietil)ortoester. Este nuevo ortoester es significativamente más lábil a los ácidos débiles así como más hidrófilo que el grupo ACE parental. El procedimiento de dos etapas se resume a continuación:

1. El oligorribonucleótido unido al soporte se trata con una disolución de 2-carbamoil-2-cianoetilen-1,1-ditiolato disódico trihidratado en N,N-dimetilformamida. Este reactivo elimina rápida y eficazmente los grupos protectores metilo de las conexiones fosfato internucleótidos sin escindir el oligorribonucleótido del soporte sólido. El soporte se lava después con agua para eliminar el exceso de ditiolato.
2. El oligorribonucleótido se escinde el soporte sólido con metilamina acuosa al 40% (p/v) a la temperatura ambiente. La solución de metilamina que contiene el oligorribonucleótido bruto se calienta a 55°C para eliminar los grupos protectores de las bases de los nucleósidos. El oligorribonucleótido protegido con ortoéster bruto se obtiene después de la eliminación del disolvente a vacío.

La eliminación de los 2'-ortoesteres es la etapa final en el procedimiento de síntesis. Esto se completa tratando el oligorribonucleótido bruto con una solución acuosa de ácido acético y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina, pH 3,8, a 55°C durante 35 minutos. El oligorribonucleótido completamente desprotegido se someter a continuación a eliminación de las sales mediante precipitación en etanol y se aísla mediante centrifugación.

Además, la incorporación de marcas fluorescentes en el extremo 5' de un polinucleótido es una manipulación común y bien entendida por los expertos en la técnica. En general, existen dos métodos que se emplean para completar esta incorporación, y los materiales necesarios se encuentran disponibles de varias fuentes comerciales (p. ej., Glen Research Inc., Sterling, Virginia, USA; Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA; TriLink BioTechnologies Inc., San Diego, California, USA; y otros). El primer método utiliza una molécula fluorescente que ha sido derivatizada con un radical fosforamidita a los derivados de fosforamidita de los nucleósidos descritos previamente. En tal caso, el colorante fluorescente se adjunta al polinucleótido unido al soporte en el ciclo final del ensamblaje de la cadena. El polinucleótido modificado con fluoróforo se escinde a continuación del soporte sólido y se desprotege utilizando los

procedimientos convencionales descritos anteriormente. Este método se ha denominado "marcaje directo". Alternativamente, el segundo método utiliza una molécula conectora derivatizada con un radical fosforamidita que contiene un grupo funcional reactivo protegido (p. ej., amino, sulfhidrilo, carbonilo, carboxilo, y otros). Esta molécula conectora se anexa al polinucleótido unido al soporte en el ciclo final del ensamblaje de la cadena. El polinucleótido modificado con el conector se escinde a continuación del soporte sólido y se desprotege utilizando los procedimientos convencionales descritos anteriormente. El grupo funcional en el conector se desprotege o bien durante el procedimiento de desprotección convencional, o bien mediante el uso posterior de un tratamiento específico del grupo. El polinucleótido modificado con el conector bruto se hace reaccionar después con un derivado fluoróforo apropiado que dará como resultado la formación de un enlace covalente entre un sitio en el fluoróforo y el grupo funcional del conector. Este método se ha denominado "marcaje indirecto".

Una vez sintetizados, los polinucleótidos de la presente invención se pueden utilizar inmediatamente o se pueden almacenar para su uso futuro. Preferiblemente, los polinucleótidos de la invención se almacenan en forma de dúplex en un tampón adecuado. Se conocen muchos tampones en la técnica adecuados para el almacenaje de los ARNip. Por ejemplo, el tampón puede estar formado por KCl 100 mM, HEPES 30 mM pH 7,5, y $MgCl_2$ 1 mM.

Preferiblemente, los ARNip de la presente invención conservan de 30% a 100% de su actividad cuando se almacenan en semejante tampón a 4°C durante un año. Más preferiblemente, conservan de 80% a 100% de su actividad biológica cuando se almacenan en semejante tampón a 4°C durante un año. Alternativamente, las composiciones se pueden almacenar a -20°C en semejante tampón durante al menos un año o más. Preferiblemente, el almacenamiento durante un año o más a -20°C produce menos de un 50% de descenso en la actividad biológica. Más preferiblemente, el almacenamiento durante un año o más a -20°C produce menos de un 20% de descenso en la actividad biológica después de un año o más. Muy preferiblemente, el almacenamiento durante un año o más a -20°C produce menos de un 10% de descenso en la actividad biológica.

Con el fin de garantizar la estabilidad de las reservas de ARNip antes de su uso, estos se pueden conservar en forma sea a -20°C hasta que ya están listos para su uso. Antes de la utilización, se deben resuspender; sin embargo, una vez resuspendidos, por ejemplo, en el tampón anteriormente mencionado, deben mantenerse a -20°C hasta su uso. El tampón anteriormente mencionado, antes de su uso, se puede almacenar a aproximadamente 4°C o a la temperatura ambiente. Las temperaturas eficaces a las cuales se lleva a cabo la transfección son bien conocidas por los expertos en la técnica, e incluyen por ejemplo, la temperatura ambiente.

Con el fin de formar el ARNip dúplex desde las hebras complementarias componentes, se mezclan cantidades iguales de la hebra efectora y la hebra antisentido. Puesto que los oligonucleótidos conservan la protección 2'-ortoester en este punto, éstos se tratan con ácido suave a 55°C, cuyo tratamiento elimina estos grupos protectores. Las hebras desprotegidas se hibridan para formar el dúplex permitiendo que la solución de desprotección se enfríe lentamente hasta la temperatura ambiente. Finalmente, el dúplex se somete a eliminación de la sal precipitándolo con etanol, y el dúplex purificado se disuelve en agua libre de ARNasa y se cuantifica mediante espectroscopía ultravioleta. La calidad del proceso de formación de dúplex se evalúa mediante electroforesis en gel nativa.

Las aplicaciones para esta tecnología nueva y novedosa son amplias. Por ejemplo, es posible que un individuo pueda identificar uno o más ARNip dirigidos, p. ej., contra una diana terapéuticamente importante. Dicha molécula podría proporcionar un silenciamiento excelente de la diana de interés, pero silenciar simultáneamente genes adicionales (dianas inespecíficas) que tienen una complementariedad parcial con la hebra efectora y/o antisentido del ARNip. El silenciamiento de estas dianas secundarias (dianas inespecíficas) puede inducir efectos no deseables (p. ej., muerte celular, proliferación celular, diferenciación) y por esta razón, resulta ventajoso eliminar los efectos no específicos asociados con el ARNip de interés.

Adicionalmente, el ARNip de la presente invención se puede utilizar en conjunto diverso de aplicaciones, que incluye, pero no se limitan a, investigación básica, descubrimiento de fármacos y desarrollo, diagnóstico, y terapia. En los entornos de investigación, la aplicación puede implicar la introducción de moléculas modificadas en las células utilizando o bien el protocolo de transfección inversa o bien el de transcripción directa. Por ejemplo, la presente invención se puede utilizar para validar si un producto génico es una diana para el descubrimiento o desarrollo de un fármaco. En esta aplicación, el ARNm que corresponde a una secuencia de ácido nucleico diana de interés es identificado para su degradación elegida como diana. Los ARNip de la invención que son específicos para el direccionamiento al gen concreto se introducen en una célula u organismo, preferiblemente en forma de dúplex. La célula u organismo se mantienen en condiciones que permiten la degradación del ARNm elegido como diana, dando como resultado un descenso de la actividad o la expresión del gen. A continuación se mide el grado de cualquier expresión o actividad disminuida del gen, junto con el efecto de dicha expresión o actividad disminuidas, y se realiza una determinación de si la expresión o la actividad disminuyen, en ese caso la secuencia de ácido nucleico de interés es un agente para el descubrimiento o desarrollo de fármacos. De esta manera, los efectos fenotípicamente deseables se pueden asociar con la interferencia con ARN de ácidos nucleicos diana concretos de interés, y en los casos apropiados se pueden acometer estudios de toxicidad y farmacocinética y desarrollar preparaciones terapéuticas.

La invención se puede implementar para una amplia gama de aplicaciones asociadas con la transfección de las moléculas modificadas. En un ejemplo no limitante, se utilizan las modificaciones de la invención para eliminar los efectos no específicos resultantes de la transfección de ARNip en un formato de transfección inversa. Por ejemplo, los ARNip modificados se secan sobre una superficie sólida (p. ej., el fondo de un pocillo de una placa de 96, 384, o 1536 pocillos), se solubilizan mediante la adición de un portador (p. ej., un reactivo de transfección lipídico), seguido de la adición de tipos de los células de elección para la transfección.

En otra solicitud de la invención, los ARNip que están modificados con las modificaciones de la invención, o no modificados, se transfectan por separado a las células y se ejecutan elemento por elemento para identificar o distinguir entre los resultados fenotípicos inducidos por la reducción de la expresión del gen que están generados por el silenciamiento específico de la diana y el silenciamiento de dianas inespecíficas.

En otra aplicación del uso de los ARNip modificados de la invención, las células se transfectan con reservas de ARNip modificados o ARNip individuales modificados que constituyen las reservas. De este modo, un usuario es capaz de identificar el ARNip o combinación de ARNip más funcionales contra una diana individual.

En otra aplicación más, los ARNip que portan las modificaciones de la invención están dirigidos contra una familia concreta de genes (p. ej., quinasas), genes asociados con una o varias rutas concretas (p. ej., regulación del ciclo celular), o genomas completos (p. ej., el genoma humano, de rata, ratón *C. elegans,* o *Drosophila*). La reducción de la expresión de cada gen de la colección con ARNip que portan las modificaciones de la invención permitiría a los investigadores evaluar rápidamente la contribución de cada miembro de una familia de genes, o cada miembro de una ruta, o cada gen de un genoma, a una función o evento biológicos concretos sin el riesgo de que el fenotipo sea el resultado de un efecto inespecífico. Como un ejemplo de esta clase de aplicación, los individuos que están interesados en identificar uno o más genes del anfitrión (ser humano) que contribuyen a la capacidad, *p. ej.,* de que el virus VIH infecte células humanas, puede cultivar en placa ARNip dirigidos contra el genoma humano completo en un formato RTF. Después de la formación de los lipoplexes, se añaden células susceptibles de infección por VIH (p. ej., células JC53) a cada pocillo para la transfección. Después de cultivar las células durante un período de 24-48 horas, las células de cada pocillo se podrían someter a un título letal del virus VIH. Después de un período de incubación apropiado necesario para la infección, las placas se podrían examinar para identificar qué pocillos contienen células vivas. Los pocillos que contienen células vivas (o un número sustancialmente más grande de células vivas que los controles) identifican un gen del anfitrión que es necesario para la infección viral, la replicación, y/o la liberación. De este modo, se pueden identificar genes del anfitrión que juegan un papel en la infección por el patógeno con el riesgo de que el fenotipo observado sea el resultado de efectos no específicos.

En otra aplicación más, las células transfectadas con ARNip con portan las modificaciones de la invención se utilizan para evaluar la contribución de un gen concreto (de la diana) a la exclusión de un fármaco de las células. En un ejemplo no limitante, las células son sometidas a transfección inversa sobre placas RTF que contienen uno o varios ARNip dirigidos contra todos los miembros conocidos del genoma humano, ARNip dirigidos contra una familia concreta de genes (p. ej., quinasas), ARNip dirigidos contra genes de una ruta concreta (p. ej., las rutas ADME-tox). Con posterioridad, las células se tratan con un compuesto concreto (p. ej., un compuesto terapéutico potencial) y se puede medir la capacidad de las células para, p. ej., conservar, excretar, metabolizar, o adsorber ese compuesto y comparar con células no tratadas. De este modo, un investigador puede identificar uno o más genes del anfitrión que juegan un papel en la farmacocinética del compuesto con un riesgo limitado de que el fenotipo observado sea el resultado de la regulación a la baja de un gen inespecífico.

En otra aplicación más, se utilizan células transfectadas con ARNip que portan las modificaciones de la invención para validar la diana de uno o más agentes biológicamente relevantes (p. ej., un fármaco). Por ejemplo, si se cree que un fármaco concreto se dirige a una proteína concreta e induce un fenotipo concreto, la acción del fármaco se puede validar localizando su proteína diana con un ARNip específico del gen que porta las modificaciones de la invención. Si el ARNip induce el mismo fenotipo que el fármaco, la diana es validada. Si el ARNip modificado no logra inducir el mismo fenotipo, estos experimentos cuestionarían la validez de la proteína como diana del fármaco.

En otra aplicación más, se pueden utilizar dos o más ARNip que portan las modificaciones de la invención y que se dirigen a dos o más dianas distintas para identificar y estudiar pares letales sintéticos.

En otra aplicación más, se pueden utilizar los ARNip que portan las modificaciones de la invención para dirigir transcritos que contienen polimorfismos de un único nucleótido (SNP) para facilitar y evaluar la contribución de un SNP concreto a un fenotipo, una función biológica, un estado de enfermedad, o un evento.

En otra aplicación más, se pueden utilizar ARNip que portan las modificaciones de la invención para dirigirse a uno o más genes diana cuya reducción de la expresión se sabe que induce un estado de enfermedad concreto. De este modo, es posible facilitar el estudio de esa enfermedad concreta sin el riesgo de reducir la expresión de genes adicionales.

En todas las aplicaciones descritas anteriormente, se pueden emplear las aplicaciones de tal manera que reduzcan la expresión de uno o múltiples genes en un único pocillo.

La presente invención también se puede utilizar en aplicaciones de interferencia con ARN que inducen estados de enfermedad o trastornos transitorios o permanentes en un organismo, por ejemplo, atenuando la actividad de un ácido nucleico diana de interés que se cree que es una causa o factor en la enfermedad o trastorno de interés. El incremento de la actividad de un ácido nucleico diana de interés puede hacer que la enfermedad o trastorno empeore, o tienda a aliviarse o a curar la enfermedad o trastorno de interés, según sea el caso. Del mismo modo, la disminución de la actividad del ácido nucleico diana de interés puede hacer que la enfermedad o trastorno, empeore, o tienda a aliviarse o a curarse, según sea el caso. Los ácidos nucleicos diana de interés pueden comprender ácidos nucleicos genómicos o ácidos nucleicos extracromosómicos, tales como ácidos nucleicos virales.

Aún más, la presente invención se puede utilizar en aplicaciones de interferencia con ARN, tales como aplicaciones de diagnóstico, profilácticas, y terapéuticas de las composiciones en la fabricación de un medicamento en animales, preferiblemente mamíferos, más preferiblemente seres humanos en el tratamiento de enfermedades, o la expresión en exceso o por defecto de una diana. Preferiblemente, la enfermedad o trastorno es uno que surge del mal funcionamiento de una o más proteínas, cuya enfermedad o trastorno está relacionada con la expresión del producto génico de una o más proteínas. Por ejemplo, es ampliamente reconocido que ciertos cánceres de mama humanos están relacionados con el mal funcionamiento de una proteína expresada a partir de un gen conocido comúnmente como gen *"bcl-2"*. Se puede fabricar un medicamento de acuerdo con las composiciones y enseñanzas de la presente invención, empleando uno o más ARNip dirigidos contra el gen *bcl-2*, y opcionalmente combinarlo con un portador, diluyente y/o coadyuvante farmacéuticamente aceptable, cuyo medicamento se puede utilizar para el tratamiento del cáncer de mama. Los solicitantes han establecido la utilidad de los métodos y composiciones en modelos celulares. Los métodos de liberación de polinucleótidos, tales como ARNip, a células en el interior de animales, incluyendo seres humanos, son bien conocidos en la técnica. Se espera que cualquier vehículo de liberación conocido actualmente en la técnica, o que se vaya a conocer, y tenga utilidad para introducir polinucleótidos, tales como ARNip, en animales, incluyendo seres humanos, sea útil en la fabricación de un medicamento de acuerdo con la presente invención, siempre que el vehículo de liberación no sea incompatible con ninguna de las modificaciones que puedan estar presentes dentro de la composición elaborada de acuerdo con la presente invención. Un vehículo de liberación que no sea compatible con una composición elaborada de acuerdo con la presente invención es aquel que reduce la eficacia de la composición en más de 95% medida frente a la eficacia en cultivo celular.

Existen modelos animales para muchos, muchos trastornos, incluyendo, por ejemplo, cánceres, enfermedades del sistema vascular, errores innatos del metabolismo, y similares. Esta dentro del conocimiento práctico de la técnica la administración de ácidos nucleicos a animales en regímenes de dosificación hasta llegar a un régimen de dosificación óptimo para una enfermedad o trastorno concreto en un animal tal como un mamífero, por ejemplo, un ratón, rata o primate no humano. Una vez que se ha establecido la eficacia en el mamífero por medio de la experimentación rutinaria por un experto en la técnica, se pueden lograr regímenes de dosificación para el comienzo de las pruebas en seres humanos basándose en los datos alcanzados en tales estudios.

Las dosificaciones de medicamentos fabricados de acuerdo con la presente invención pueden variar de microgramos por kilogramo a cientos de miligramos por kilogramo de un sujeto. Como es sabido en la técnica, la dosificación variará de acuerdo con la masa del mamífero que recibe la dosis, la naturaleza del mamífero que recibe la dosis, la gravedad de la enfermedad o trastorno, y la estabilidad del medicamento en el suero del sujeto, entre otros factores bien conocidos por los expertos en la técnica.

Para estas aplicaciones, un organismo que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno que sea susceptible de modulación mediante la manipulación de un ácido nucleico diana concreto de interés se trata por medio de la administración de ARNip. Los resultados del tratamiento con ARNip pueden ser mitigadores, paliativos, profilácticos, y/o diagnósticos de una enfermedad o trastorno concretos. Preferiblemente, el ARNip se administra de una manera farmacéuticamente aceptable con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Las aplicaciones terapéuticas de la presente invención se pueden realizar con una variedad de composiciones terapéuticas y métodos de administración. Los portadores y diluyentes farmacéuticamente aceptables son conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos de administración a células y organismos también son conocidos por los expertos en la técnica. Se sabe que los regímenes de dosificación, por ejemplo, dependen de la gravedad y el grado de sensibilidad de la enfermedad o trastorno que se vaya a tratar, con un curso de tratamiento que abarca de días a meses, o hasta que se logra el efecto deseado sobre el trastorno o estado de enfermedad. Se puede requerir una administración crónica de ARNip para unos efectos deseados duraderos con algunas enfermedades o trastornos. Los regímenes de dosificación adecuados se pueden determinar, por ejemplo, administrando cantidades variables de uno o más ARNip en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable, por medio de una ruta de liberación farmacéuticamente aceptable, y la cantidad de fármaco acumulada en el organismo del organismo receptor se

puede determinar en diferentes momentos después de la administración. De un modo similar, se puede medir el efecto deseado (por ejemplo, el grado de supresión de la expresión de un producto génico o una actividad génica) en diferentes momentos después de la administración del ARNip, y este dato se puede correlacionar con otros datos farmacocinéticos, tales como acumulación en el organismo o un órgano. Un experto normal en la técnica puede determinar las dosificaciones óptimas, los regímenes de dosificación, y similares. Un experto normal en la técnica puede emplear los datos de CE_{50} de modelos animales *in vivo* e *in vitro* como pautas para estudios con seres humanos.

Aún más, la presente invención se puede utilizar en aplicaciones de interferencia con ARN, tales como aplicaciones de diagnóstico, profilácticas, y terapéuticas. Para estas aplicaciones, se trata un organismo que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno que es susceptible de modulación mediante manipulación de un ácido nucleico diana concreto de interés por medio de la administración de ARNip. Los resultados del tratamiento con ARNip pueden ser mitigadores, paliativos, profilácticos, y/o diagnósticos de una enfermedad o trastorno concretos. Preferiblemente, el ARNip se administra de una manera farmacéuticamente aceptable con un portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptables.

Adicionalmente, el ARNip se puede administrar en una crema o pomada tópicamente, una preparación oral tal como una cápsula o comprimido o una suspensión o disolución, y similares. La ruta de administración puede ser intravenosa, intramuscular, dérmica, subdérmica, cutánea, subcutánea, intranasal, oral, rectal, por medio de gotas oculares, mediante implantación tisular de un dispositivo que libera el ARNip en una localización ventajosa, por ejemplo cerca de un órgano o tejido o tipo de célula que alberga un ácido nucleico diana de interés.

Ejemplos

Ejemplo 1

Síntesis de ARNip

Se sintetizaron oligonucleótidos de ARN utilizando la química 2'-ACE (véase la Figura 3). La síntesis se lleva a cabo preferiblemente en forma de un procedimiento automatizado en una máquina apropiada. Varias de tales máquinas sintetizadoras son conocidas por los expertos en la técnica. Cada nucleótido se añade secuencialmente (dirección 3' a 5') a un sólido oligonucleótido unido al soporte. Aunque se prefieren los soportes de poliestireno, se puede utilizar cualquier soporte adecuado. El primer nucleósido en el extremo 3' de la hebra se ancla covalentemente a un soporte sólido. Se añaden el precursor de nucleótido, un ribonucleótido activado tal como una fosforamidita o H-fosfonato, y un activador tal como tetrazol, por ejemplo, S-etil-tetrazol (aunque se puede utilizar cualquier otro activador adecuado) (etapa i en Figura 3**),** acoplando la segunda base al extremo 5' del primer nucleósido. El soporte se lava y se protege terminalmente cualquier grupo 5'-hidroxilo que no haya reaccionado con un reactivo de acetilación tal como, pero no limitado a, anhídrido acético o anhídrido fenoxiacético para producir radicales 5'-acetilo no reactivos (etapa ii). El enlace P(III) se oxida a continuación al enlace P(V) más estable y deseado en última instancia (etapa iii), utilizando un agente oxidante adecuado tal como, por ejemplo, hidroperóxido de t-butilo o yodo y agua. Al final del ciclo de adición de nucleótidos, el grupo 5'-sililo se escinde con ión fluoruro (etapa iv), por ejemplo, usando fluoruro de trietilamonio o fluoruro de *t*-butilamonio. El ciclo se repite para cada nucleótido subsiguiente. Cabe destacar que, aunque Figura 3 ilustra una fosforamidita que tiene un grupo protector de metilo, se puede utilizar cualquier otro grupo adecuado para proteger o reemplazar el oxígeno del radical fosforamidita. Por ejemplo, se pueden emplear en esta posición grupos alquilo, grupos cianoetilo, o tioderivados. Adicionalmente, el nucleósido activado entrante en la etapa (i) puede ser un tipo diferente de nucleósido activado, por ejemplo, un H-fosfonato, metilfosforamidita o un tiofosforamidita. Cabe señalar que el nucleósido inicial, o 3', unido al soporte puede tener un grupo protector 5' diferente tal como un grupo dimetoxitritilo, en lugar de un grupo sililo. La escisión del grupo dimetoxitritilo requiere hidrólisis ácida, tal como se emplea en la química de síntesis de ADN convencional. Por lo tanto, se emplea un ácido tal como ácido dicloroacético (DCA) o ácido tricloroacético (TCA) para esta etapa solo. Además de la etapa de escisión con DCA, el ciclo se repite tantas veces como sea necesario para sintetizar el polinucleótido deseado.

Después de la síntesis, los grupos protectores de los fosfatos, que se representan como grupos metilo en la Figura 3, pero que no tienen que estar limitados a grupos metilo, se escinden en 30 minutos utilizando trihidrato de 2-carbamoil-2-cianoetileno-1,1-ditiolato disódico (ditiolato) 1 M en DMF (dimetilformamida). La solución de desprotección se lava del oligonucleótido unido al soporte sólido usando agua. El soporte se trata a continuación con metilamina al 40% durante 20 minutos a 55°C. Esto libera los oligonucleótidos de ARN en solución, desprotege las aminas exocíclicas y elimina la protección de acetilo en los grupos 2'-ACE. Los oligonucleótidos se pueden analizar mediante HPLC de intercambio aniónico en esta etapa.

Los grupos 2'-ortoéster son los últimos grupos protectores que deben eliminarse, si se desea la separación. La estructura del ARN protegido en 2'-ACE inmediatamente antes de la desprotección 2' es la representada en la **Figura 4**.

Para los procedimientos automatizados, los soportes sólidos que tienen el nucleósido inicial se instalan en el aparato sintetizador. El aparato contendrá todos los reactivos auxiliares accesorios y los monómeros necesarios para la síntesis. Los reactivos se mantienen en atmósfera de argón, ya que algunos monómeros, si no se mantiene bajo un gas inerte, se pueden hidrolizar. El aparato se ceba para llenar todas las calles con el reactivo. Se diseña un ciclo de síntesis que define la liberación de los reactivos en el orden adecuado de acuerdo con el ciclo de síntesis, liberando los reactivos en un orden especificado. Una vez que se define un ciclo, se define la cantidad de cada reactivo que se va a añadir, se define el tiempo entre las etapas, y se definen las etapas de lavado, la síntesis está lista para proseguir una vez que se añade el soporte sólido que tiene el nucleósido inicial.

Para los análogos de ARN descritos en la presente memoria, la modificación se logra a través de tres métodos generales diferentes. La primera, que se implementa para carbohidratos y modificaciones de bases, así como para la introducción de ciertos conectores y productos conjugados, emplea fosforamiditas modificadas en las que la modificación es pre-existente. Un ejemplo de tal modificación sería la especie de carbohidrato modificado en 2' (2'-F, 2'-NH_2, 2'-O-alquilo, etc.) en donde el ortoéster 2' se sustituye por la modificación deseada; también se podrían introducir modificaciones 3' o 5' terminales tales como derivados de fluoresceína, Dabsilo, colesterol, derivados de cianina o polietilenglicol. También se introducirían ciertas modificaciones en el enlace internucleotídico a través de la entrada del intermedio nucleósido reactivo. Los ejemplos de la modificación enlace internucleotídico resultante incluyen, pero no se limitan a metilfosfonatos, fosforamidatos, fosforotioatos o fosforoditioatos.

Se pueden emplear muchos modificadores usando los mismos o similares ciclos. Los ejemplos de esta clase incluirían, por ejemplo, 2-aminopurina, 5-metilcitidina, 5-aminoaliluridina, diaminopurina, 2-O-alquilo, espaciadores de varios átomos, monómeros espaciadores individuales, 2'-aminonucleósidos, 2'-fluoronucleósidos, 5-yodouridina, 4-tiouridina, acridinas, 5-bromouridina, 5-fluorocitidina, 5-fluorouridina, 5-yodouridina, 5-yodocitidina, 5-biotin-timidina, 5-fluorescein-timidina, inosina, pseudouridina, monómero abásico, nebularano, desazanucleósido, pirenonucleósido, azanucleósido, etc. A menudo, el resto de las etapas en la síntesis seguiría siendo el mismo, con la excepción de las modificaciones que introducen sustituyentes que son lábiles a las condiciones de desprotección estándar. Aquí se emplearían condiciones modificadas que no afecten al sustituyente. En segundo lugar, ciertas modificaciones del enlace internucleotídico requieren una alteración de la etapa de oxidación para permitir su introducción. Los ejemplos de esta clase incluyen fosforotioatos y fosforoditioatos en los que se requiere la oxidación con azufre elemental u otro agente de transferencia de azufre adecuado. En tercer lugar, ciertos productos conjugados y modificaciones se introducen por el proceso de "post-síntesis", en el que la molécula deseada se añade al biopolímero después de que se completa la síntesis en fase sólida. Un ejemplo de esto sería la adición de polietilenglicol a un oligonucleótido de pre-sintetizado que contiene una amina primaria unida a un conector hidrocarbonado. El anclaje en este caso se puede lograr mediante el uso de un éster de N-hidroxi-succinimidilo de polietilenglicol en una reacción en fase de solución.

Si bien esto esboza el método más preferido para la síntesis de ARN sintético y sus análogos, se podría emplear cualquier método de síntesis de ácido nucleico que fuera capaz de ensamblar estas moléculas en su ensamblaje. Los ejemplos de los métodos alternativos incluyen los enfoques de síntesis 5'-DMT-2'-TBDMS y 5'-DMT-2'-TOM. Se pueden introducir algunas modificaciones 2'-O-metilo, 2'-F y del esqueleto en las reacciones de transcripción utilizando polimerasas T7 y SP6 modificadas y de tipo salvaje, por ejemplo.

Síntesis de ARN modificado

Los siguientes directrices se proporcionan para la síntesis de ARN modificados, y se pueden adaptar fácilmente para su uso en cualquiera de los sintetizadores automatizados conocidos en la técnica.

Modificaciones del extremo 3'

Existen varios métodos para incorporar modificaciones 3'. La modificación 3' se puede anclar o "cargar" en un soporte sólido de elección utilizando métodos conocidos en la técnica. Alternativamente, la modificación 3' puede estar disponible en forma de una fosforamidita. La fosforamidita se acopla a un soporte universal, usando métodos de síntesis convencionales, donde el soporte universal proporciona un hidroxilo en el que se crea una modificación en el extremo 3' mediante la introducción de la fosforamidita activada de la modificación terminal deseada. De acuerdo con otro método, la modificación 3' se podría introducir post-sintéticamente después de que el polinucleótido se retire del soporte sólido. El polinucleótido libre inicialmente tiene un hidroxilo, amino, tiol, o halógeno 3' terminal que reacciona con una forma apropiadamente activada de la modificación de elección. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a reacciones con éster de N-hidroxisuccinimidilo, tioéter, disulfuro, maleimido, o haloalquilo. Esta modificación se convierte ahora en el extremo 3' del polinucleótido. Los ejemplos de las modificaciones que se pueden conjugar post-sintéticamente pueden ser, pero no se limitan a fluoroesceínas, acridinas, TAMRA, dabsilo, colesterol, polietilenglicoles, espaciadores de varios átomo, cianinas, lípidos, carbohidratos, ácidos grasos, esteroides, péptidos o polipéptidos.

Modificaciones del extremo 5'

Existen diversas maneras de introducir una modificación 5' en un polinucleótido. Por ejemplo, se puede adquirir un nucleósido que tiene la modificación 5' y activarlo posteriormente a una fosforamidita, o la fosforamidita que tiene la modificación 5' puede ser asequible comercialmente. A continuación, se emplea el nucleósido activado que tiene la modificación 5' en el ciclo tal como se puede utilizar cualquier otro nucleósido activado. Sin embargo, no todas las modificaciones 5' están disponibles como fosforamiditas. En tal caso, la modificación 5' puede ser introducida de una manera análoga a la descrita para las modificaciones 3' anteriores.

Tioatos

Los polinucleótidos que tienen uno o más restos tioato, tales como conexiones fosforotioato, se elaboraron de acuerdo con el ciclo de síntesis descrito anteriormente e ilustrado en la Figura 3. Sin embargo, en lugar de la etapa de oxidación con hidroperóxido de t-butilo, se utilizó azufre elemental u otro agente de sulfuración.

Modificaciones 5'-tio

Se pueden adquirir monómeros que tienen tioles 5' en forma de fosforamiditas de proveedores comerciales tales como Glen Research. Estos monómeros modificados 5' tiol portan generalmente grupos protectores tritilo. Después de la síntesis, el grupo tritilo puede ser eliminado por cualquier método conocido en la técnica.

Otras modificaciones

Para ciertas modificaciones, las etapas del ciclo de síntesis pueden variar un poco. Por ejemplo, cuando el extremo 3' tiene una dT inversa (en donde la primera base se ancla al soporte sólido a través del 5'-hidroxilo y el primer acoplamiento es una conexión 3'-3') la destritilación y el acoplamiento se producen más lentamente, por lo que se debe utilizar reactivo destritilante extra, tal como ácido dicloroacético (DCA), y el tiempo de acoplamiento debe aumentarse a 300 segundos. Algunas modificaciones 5' pueden requerir tiempo de acoplamiento prolongado. Los ejemplos incluyen colesterol, tales como fluoróforos biotina Cy3 o Cy5, dabsilo, conectores amino, conectores tio, espaciadores, polietilenglicol, reactivo de fosforilación, BODIPY, o conectores fotoescindibles.

Cabe señalar que si un polinucleótido va a tener solo una única modificación, esa la modificación puede llevarse a cabo más eficazmente manualmente retirando el soporte que tiene el polinucleótido parcialmente construido sobre él, acoplando manualmente el monómero que tiene la modificación, y sustituyendo a continuación el soporte en el sintetizador automático y reanudando la síntesis automatizada.

Ejemplo 2

Desprotección y escisión de oligonucleótidos sintetizados del soporte

La escisión se puede realizar manualmente o en un procedimiento automático en una máquina. La escisión del radical protector de la conexión internucleotídica, por ejemplo, un grupo metilo, se puede lograr mediante el uso de cualquier agente de escisión adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, ditiolato o tiofenol. Se añade ditiolato 1 M en DMF al soporte sólido a temperatura ambiente durante 10 a 20 minutos. El soporte se lava a fondo con, por ejemplo, DMF, después con agua, a continuación acetonitrilo. Alternativamente, un lavado con agua seguido de un lavado con acetonitrilo a fondo será suficiente para eliminar cualquier ditioato residual.

La escisión del polinucleótido del soporte y la eliminación de la protección de la base exocíclica se puede realizar con N-metilamina (NMA) acuosa al 40%, seguido de calentamiento a 55 grados centígrados durante veinte minutos. Una vez que el polinucleótido está en solución, el NMA se retira cuidadosamente del soporte sólido. La solución que contiene el polinucleótido se seca a continuación, para quitar la NMA a vacío. El procesamiento adicional, incluyendo la formación de dúplex, la eliminación de las sales, la purificación en gel, el control de calidad, y similares puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica.

Para algunas modificaciones, la etapa con NMA puede variar. Por ejemplo, para la modificación de un amino 3', el tratamiento con NMA debe ser durante cuarenta minutos a 55 grados centígrados. La puromicina, las modificaciones de los conectores 5' amino terminales, y las modificaciones de nucleósidos 2' amino se calientan durante 1 hora después de la adición de NMA al 40%. Los oligonucleótidos modificados con Cy5 se tratan con hidróxido de amonio durante 24 horas mientras se protegen de la luz.

Preparación de reactivos de escisión

Se utilizan agua de calidad para HPLC y acetonitrilo de calidad para síntesis. El ditiolato se prepara previamente en forma de cristales. Añadir 4,5 gramos de cristales de ditiolato a 90 ml de DMF. Se puede adquirir NMA Al 40%, listo para su uso, de un proveedor tal como Sigma Aldrich Corporation.

Recocido de polinucleótidos de hebra sencilla

Los polinucleótidos de hebra sencilla se pueden recocer por medio de cualquier método conocido en la técnica, empleando cualquier tampón adecuado. Por ejemplo, se pueden mezclar cantidades iguales de cada hebra en un tampón adecuado, tal como, por ejemplo, HEPES 50 mM pH 7,5, cloruro de potasio 100 mM, cloruro de magnesio 1 mM. La mezcla se calienta durante un minuto a 90 grados centígrados, y se deja enfriar a temperatura ambiente. En otro ejemplo, cada polinucleótido se prepara por separado de tal manera que cada uno esté a una concentración 50 micromolar. Se añaden a continuación 30 µL de cada solución de polinucleótido a un tubo con 15 microlitros de tampón de recocido 5X, en donde la concentración final del tampón de recocido es cloruro de potasio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM, pH 7,4 y cloruro de magnesio 2 mM. El volumen final es de 75 microlitros. La solución se incuba a continuación durante un minuto a 90 grados centígrados, se centrifuga en una centrífuga durante 15 segundos, y se deja incubando a 37 grados centígrados durante una hora, a continuación se deja llegar a temperatura ambiente. A continuación esta solución se puede almacenar congelada a menos 20 grados centígrados y congelar-descongelar hasta cinco veces. La concentración final del dúplex es 20 micromolar. Un ejemplo de un tampón adecuado para el almacenamiento de los polinucleótidos es KCl 20 mM, HEPES 6 mM, pH 7,5, $MgCl_2$ 0,2 mM. Todos los tampones utilizados deben estar libres de ARNasa.

Eliminación del radical ortoéster

Si se desea, el radical o los radicales ortoéster se pueden eliminar del polinucleótido mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Uno de tales métodos emplea un sistema tampón de pH 3,8 volátil de ácido acético-tetrametilendiamina (TEMED) que se puede retirar mediante liofilización después de la extracción del radical o radicales ortoéster. La desprotección a un pH mayor que 3.0 ayuda a minimizar el potencial para la escisión catalizada por ácido de la hebra principal de fosfodiéster. Por ejemplo, la desprotección se puede lograr usando ácido acético 100 mM ajustado a pH 3,8 con TEMED suspendiendo el polinucleótido protegido con ortoéster e incubándolo durante 30 minutos a 60 grados centígrados. La solución se liofiliza a continuación o se somete a un SpeedVac hasta sequedad antes de su uso. Si fuera necesario, se puede realizar la eliminación de las sales después de la desprotección mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, precipitación con etanol o eliminación de las sales en un cartucho de fase inversa.

Ejemplo 3

ARNip sintetizados para su uso en la interferencia de ARN

Se sintetizaron ARNip de diecinueve unidades que tenían un saliente de di-dT usando química de ACE patentada por Dharmacon, Inc.'s, y se diseñaron y utilizaron de acuerdo con la invención descrita en la presente memoria. "SEAP" se refiere a la fosfatasa alcalina secretada humana; "ciclo humano" se refiere a la ciclofilina B humana; un asterisco entre las unidades de nucleótidos se refiere a una conexión internucleotídica modificada que es una conexión fosforotioato; la estructura 2'-FC o 2'-FU se refiere a una unidad de nucleótido que tiene un átomo de flúor anclado al carbono 2' de un radical ribosilo; la estructura 2'-N-C o 2'-N-U se refiere a una unidad de nucleótido que tiene un grupo $-NH_2$ unido al carbono 2' de un radical ribosilo; la estructura de 2'-OMe-C o 2'-OMe-U se refiere a una unidad de nucleótido que tiene una modificación 2'-O-metilo en el carbono 2' de un radical ribosilo de CS o Us, respectivamente; dG, dU, dA, dC, y dT se refieren a una unidad de nucleótidos que es desoxi con respecto a la posición 2', y en su lugar tiene un hidrógeno anclado al carbono 2' del radical ribosilo. A menos que se indique lo contrario, todas las unidades de nucleótidos en la siguiente lista son ribosil con un-OH en el carbono 2'.

Slintesis de dúplex de ARNip de fórmula general I

Fórmula General I:

S 5'> HO-$mX_1MX_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}$-OH<3'
AS 3'> HO-$Y_{21}Y_{20}Y_{19}Y_{18}Y_{17}Y_{16}Y_{15}Y_{14}Y_{13}Y_{12}Y_{11}Y_{10}Y_9Y_8Y_7Y_6Y_5Y_4Y_3Y_2Y_1$-$PO_4$<5'

donde X_q e Y_q son ribonucleósidos incluyendo rA, rC, rG, o rU;
mX_q son nucleósidos con 2'-O-metilo incluyendo 2'-O-metil-rA, 2'-O-metil-rC, 2'-O-metil-rG, y 2'-O-metil-rU;
S es la hebra efectora del dúplex de ARNip;
y AS es la hebra antisentido del dúplex de ARNip.

Cada hebra (S y AS) del dúplex es sintetizada químicamente por separado utilizando los procedimientos descritos en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.008.400; la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.111.086; la Patente

de los Estados Unidos Núm. 6.590.093; Scaringe (2000) Methods in Enzymology 317:3-18; Scaringe (2001) Methods 23(3): 206-217. En pocas palabras, los procedimientos que utilizan un soporte de poliestireno sólido al que se ha fijado covalentemente el nucleósido más 3' (X_{21} o Y_{21}). A continuación se añaden secuencialmente los nucleósidos de una manera específica de la secuencia (3' a 5') a las especies unidas al soporte utilizando ciclos repetitivos. Por lo tanto, el primer ciclo añade X_{20} a X_{21} o Y_{20} a Y_{21} y el segundo ciclo añade X_{19} a $X_{20}X_{21}$ o Y_{19} a $Y_{20}Y_{21}$, y así sucesivamente. Cada ciclo consiste en cuatro etapas: desprotección del grupo 5'-hidroxilo de la especie unida al soporte; acoplamiento de un derivado reactivo del nucleósido entrante al grupo 5'-hidroxilo de la especie unida al soporte; protección terminal de los grupos 5'-hidroxilo que no han reaccionado; y oxidación de la conexión internucleotídica. Para X_q (q = 3 a 20) o Yq (q = 1 a 20) = un ribonucleósido, el derivado reactivo es una 5'-silil-2'-ortoéster-3'-fosforamidita, en particular, una 5'-O-benzhidroxi-*bis*(trimetilsililoxi)silil-2'-O-*bis*(2-acetoxietil)ortoformil-3'-O-(N,N-diisopropil)metilfosforamidita (Figura 15).

Los dúplex de Fórmula General I tienen 2'-O-metilnucleósidos en las posiciones 1 y 2 (mX_q, q = 1 y 2) de la hebra efectora. Estos nucleósidos modificados se incorporan a S utilizando las 5'-silil-2'-O-metil-3'-fosforamiditas de secuencia apropiada, en particular, 5'-O-benzhidroxi-*bis*(trimetilsililoxi)-silil-2'-O-metil-3'-O-(N,N-diisopropil) metilfosforamiditas (Figura 16), y el mismo ciclo de reacción utilizado para la incorporación de ribonucleósidos descrito anteriormente.

Los dúplex de Fórmula General I tienen un radical fosfato en el extremo 5' de la hebra antisentido. Este grupo fosfato se introduce químicamente utilizando N,N-diisopropilamino-bis(2-cianoetil)fosforamidita **(**Figura 17) y el mismo ciclo de reacción utilizado para la incorporación de ribonucleósidos descrito anteriormente.

Después del ensamblaje de la hebra, el oligonucleótido totalmente protegido se trata con trihidrato de 2-carbamoil-2-cianoetileno-1,1-ditiolato disódico para eliminar los grupos metilo de las conexiones fosfato internucleotídicas. El oligonucleótido se escinde a continuación del soporte y los grupos protectores de bases y los grupos 2-cianoetilo en el 5'-fosfato se eliminan mediante tratamiento con solución acuosa de N-metilamina, primero a temperatura ambiente y después a 55°C, seguido de secado a vacío. En este punto, el oligonucleótido bruto se analiza para determinar la calidad mediante HPLC de intercambio iónico y/o espectrometría de masas MALDI-TOF, y se purifica en gel, si es necesario. El oligonucleótido se disuelve a continuación en agua o tampón libres de ARNasa y se cuantifica mediante espectroscopia ultravioleta.

Con el fin de formar el ARNip dúplex de las hebras complementarias de los componentes, se mezclan cantidades iguales de la hebra efectora y la hebra antisentido. Puesto que los oligonucleótidos conservan la protección 2'-ortoéster en este punto, estos se tratan con ácido suave a 55°C, cuyo tratamiento elimina estos grupos protectores. Las hebras desprotegidas son recocidas para formar el dúplex al permitir que la solución de desprotección se enfríe lentamente a temperatura ambiente. Por último, se eliminan las sales del dúplex precipitándolo con etanol, y el dúplex purificado se disuelve en agua libre de ARNasa y se cuantifica mediante espectroscopia ultravioleta. La calidad del proceso de formación de dúplex se evaluó mediante electroforesis en gel nativo.

Síntesis del dúplex de ARNip de Fórmula General II

Fórmula General II

S 5'> HO-$mX_1mX_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}$-OH <3'

AS 3'> HO-$Y_{21}Y_{20}Y_{19}Y_{18}Y_{17}Y_{16}Y_{15}Y_{14}Y_{13}Y_{12}Y_{11}Y_{10}Y_9Y_8Y_7X_6Y_5Y_4Y_3mY_2mY_1$-$PO_4$ <5'

donde

X_q e Y_q son ribonucleósidos incluyendo rA, rC, rG, o rU;
mX_q y mYq son 2'-O-metilnucleósidos incluyendo 2'-O-metil-rA, 2'-O-metil-rC, 2'-O-metil-rG, y 2'-O-metil-rU;
S es la hebra efectora del dúplex de ARNip;
y
AS es la hebra antisentido del dúplex de ARNip.

Cada hebra (S y AS) del dúplex es sintetizada químicamente por separado utilizando los procedimientos descritos en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.008.400; la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.111.086; la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.590.093; Scaringe (2000) Methods in Enzymology 317:3-18; Scaringe (2001) Methods 23 (3) :206-217. En pocas palabras, los procedimientos utilizan un soporte de poliestireno sólido al que se fija covalentemente el nucleósidos más 3' (X_{21} o Y_{21}). A continuación se añaden secuencialmente nucleósidos de una manera específica de la secuencia (3' a 5') a las especies unidas al soporte utilizando ciclos repetitivos. Por lo tanto, el primer ciclo añade X_{20} a X_{21} o Y_{20} a Y_{21}; el segundo ciclo añade X_{19} a $X_{20}X_{21}$ o Y_{19} a $Y_{20}Y_{21}$; y así sucesivamente. Cada ciclo consiste en cuatro etapas: desprotección del grupo 5'-hidroxilo de la especie unida al soporte; acoplamiento de un derivado reactivo del nucleósido entrante al grupo 5'-hidroxilo de la especie unida al soporte;

protección terminal de los grupos 5'-hidroxilo que no han reaccionado; y oxidación de la conexión internucleotídica. Para X_q (q = 3 a 20) o Yq (q = 3 a 20) = un ribonucleósido, el derivado reactivo es una 5'-silil-2'-ortoéster-3'-fosforamidita, en particular, una 5'-O-benzhidroxi-*bis*(trimetilsililoxi)silil-2'-O-*bis*(2-acetoxietil)ortoformil-3'-O-(N,N-diisopropil)metilfosforamidita (Figura 15).

Los dúplex de Fórmula General II tienen 2'-O-metilnucleósidos en las posiciones 1 y 2 (mX_q, q = 1 y 2) de la hebra efectora y en las posiciones 1 y 2 (mX_q, q = 1 y 2) de la hebra antisentido. Estos nucleósidos modificados se incorporan a S y AS utilizando las 5'-silil-2'-O-metil-3'-fosforamiditas de secuencia apropiada, en particular, 5'-O-benzhidroxi-*bis*(trimetilsililoxi)-silil-2'-O-metil-3'-O-(N,N-diisopropil)metilfosforamiditas (Figura 16), y el mismo ciclo de reacción utilizado para la incorporación de ribonucleósidos descrito anteriormente.

Los dúplex de Fórmula General II tienen un radical fosfato en el extremo 5' de la hebra antisentido. Este grupo fosfato se introduce químicamente utilizando N,N-diisopropilamino-bis(2-cianoetil)fosforamidita (Figura 17) y el mismo ciclo de reacción utilizado para la incorporación de ribonucleósidos descrito anteriormente.

Después del ensamblaje de la hebra, el oligonucleótido totalmente protegido se trata con trihidrato de 2-carbamoil-2-cianoetileno-1,1-ditiolato disódico para eliminar los grupos metilo de las conexiones fosfato internucleotídicas. El oligonucleótido se escinde a continuación del soporte y los grupos protectores de bases y los grupos 2-cianoetilo en el 5'-fosfato se eliminan mediante tratamiento con solución acuosa de N-metilamina, primero a temperatura ambiente y después a 55°C, seguido de secado a vacío. En este punto, el oligonucleótido bruto se analiza para determinar la calidad mediante HPLC de intercambio iónico y/o espectrometría de masas MALDI-TOF, y se purifica en gel, si es necesario. El oligonucleótido se disuelve a continuación en agua o tampón libres de ARNasa y se cuantifica mediante espectroscopia ultravioleta.

Con el fin de formar el ARNip dúplex de las hebras complementarias de los componentes, se mezclan cantidades iguales de la hebra efectora y la hebra antisentido. Puesto que los oligonucleótidos conservan la protección 2'-ortoéster en este punto, estos se tratan con ácido suave a 55°C, cuyo tratamiento elimina estos grupos protectores. Las hebras desprotegidas son recocidas para formar el dúplex al permitir que la solución de desprotección se enfríe lentamente a temperatura ambiente. Por último, se eliminan las sales del dúplex precipitándolo con etanol, y el dúplex purificado se disuelve en agua libre de ARNasa y se cuantifica mediante espectroscopia ultravioleta. La calidad del proceso de formación de dúplex se evaluó mediante electroforesis en gel nativo.

Síntesis del dúplex de ARNip de Fórmula General III

Fórmula General III

S 5'> HO-$mX_1mX_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}$-OH <3'

AS 3'> HO-$Y_{21}Y_{20}Y_{19}Y_{18}Y_{17}Y_{16}Y_{15}Y_{14}Y_{13}Y_{12}Y_{11}Y_{10}Y_9Y_8Y_7X_6Y_5Y_4Y_3mY_2Y_1$-$PO_4$<5'

donde

X_q e Y_q son ribonucleósidos incluyendo rA, rC, rG, o rU;
mX_q y mYq son 2'-O-metilnucleósidos incluyendo 2'-O-metil-rA, 2'-O-metil-rC, 2'-O-metil-rG, y 2'-O-metil-rU;
S es la hebra efectora del dúplex de ARNip;
y
AS es la hebra antisentido del dúplex de ARNip.

Cada hebra (S y AS) del dúplex es sintetizada químicamente por separado utilizando los procedimientos descritos en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.008.400; la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.111.086; la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.590.093; Scaringe (2000) Methods in Enzymology 317:3-18; Scaringe (2001) Methods 23 (3):206-217. En pocas palabras, los procedimientos utilizan un soporte de poliestireno sólido al que se fija covalentemente el nucleósidos más 3' (X_{21} o Y_{21}). A continuación se añaden secuencialmente nucleósidos de una manera específica de la secuencia (3' a 5') a las especies unidas al soporte utilizando ciclos repetitivos. Por lo tanto, el primer ciclo añade X_{20} a X_{21} o Y_{20} a Y_{21}; el segundo ciclo añade X_{19} a $X_{20}X_{21}$ o Y_{19} a $Y_{20}Y_{21}$; y así sucesivamente. Cada ciclo consiste en cuatro etapas: desprotección del grupo 5'-hidroxilo de la especie unida al soporte; acoplamiento de un derivado reactivo del nucleósido entrante al grupo 5'-hidroxilo de la especie unida al soporte; protección terminal de los grupos 5'-hidroxilo que no han reaccionado; y oxidación de la conexión internucleotídica. Para X_q (q = 3 a 20) o Yq (q = 1 o 3 a 20) = un ribonucleósido, el derivado reactivo es una 5'-silil-2'-ortoéster-3'-fosforamidita, en particular, una 5'-O-benzhidroxi-*bis*(trimetilsililoxi)silil-2'-O-*bis*(2-acetoxietil)ortoformil-3'-O-(N,N-diisopropil)metilfosforamidita (Figura 15).

Los dúplex de Fórmula General III tienen 2'-O-metilnucleósidos en las posiciones 1 y 2 (mX_q, q = 1 y 2) de la hebra efectora y en las posiciones 1 y 2 (mX_q, q = 1 y 2) de la hebra antisentido. Estos nucleósidos modificados se incorporan a S y AS utilizando las 5'-silil-2'-O-metil-3'-fosforamiditas de secuencia apropiada, en particular, 5'-O-

benzhidroxi-*bis*(trimetilsililoxi)-silil-2'-O-metil-3'-O-(N,N-diisopropil)metilfosforamiditas (Figura 16), y el mismo ciclo de reacción utilizado para la incorporación de ribonucleósidos descrito anteriormente.

Los dúplex de Fórmula General III tienen un radical fosfato en el extremo 5' de la hebra antisentido. Este grupo fosfato se introduce químicamente utilizando N,N-diisopropilamino-bis(2-cianoetil)fosforamidita (Figura 17) y el mismo ciclo de reacción utilizado para la incorporación de ribonucleósidos descrito anteriormente.

Después del ensamblaje de la hebra, el oligonucleótido totalmente protegido se trata con trihidrato de 2-carbamoil-2-cianoetileno-1,1-ditiolato disódico para eliminar los grupos metilo de las conexiones fosfato internucleotídicas. El oligonucleótido se escinde a continuación del soporte y los grupos protectores de bases y los grupos 2-cianoetilo en el 5'-fosfato se eliminan mediante tratamiento con solución acuosa de N-metilamina, primero a temperatura ambiente y después a 55°C, seguido de secado a vacío. En este punto, el oligonucleótido bruto se analiza para determinar la calidad mediante HPLC de intercambio iónico y/o espectrometría de masas MALDI-TOF, y se purifica en gel, si es necesario. El oligonucleótido se disuelve a continuación en agua o tampón libres de ARNasa y se cuantifica mediante espectroscopia ultravioleta.

Con el fin de formar el ARNip dúplex de las hebras complementarias de los componentes, se mezclan cantidades iguales de la hebra efectora y la hebra antisentido. Puesto que los oligonucleótidos conservan la protección 2'-ortoéster en este punto, estos se tratan con ácido suave a 55°C, cuyo tratamiento elimina estos grupos protectores. Las hebras desprotegidas son recocidas para formar el dúplex al permitir que la solución de desprotección se enfríe lentamente a temperatura ambiente. Por último, se eliminan las sales del dúplex precipitándolo con etanol, y el dúplex purificado se disuelve en agua libre de ARNasa y se cuantifica mediante espectroscopia ultravioleta. La calidad del proceso de formación de dúplex se evaluó mediante electroforesis en gel nativo.

Transfección

Los dúplex de ARNip se recocieron utilizando tampón convencional (HEPES 50 milimolar de pH 7,5, KCl 100 mili molar, $MgCl_2$ 1 mM). Las transfecciones se realizan de acuerdo con el protocolo convencional descrito más abajo.

Protocolo de transfección convencional para placas de 96 pocillos y 6 pocillos: ARNip

1. Los protocolos para 293 y Calu6, HeLa, MDA 75 son idénticos.
2. Las células se cultivan en placa para que sean confluentes en 95% el día de la transfección.
3. Se añade SuperRNAsin (Ambion) a la mezcla de transfección para la protección contra las ARNasas.
4. Todas las disoluciones y las manipulaciones se tienen que llevar a cabo en condiciones libres de ARNasa.

Placa 1 0,5 -1 ml en 25 ml of medio en un matraz pequeño o 1 ml en 50 ml en un matraz grande.

Placa de 96 pocillos

1. Añadir 3 ml de tripsina-EDTA al 0,05% en un matraz medio (6 en un matraz grande) incubar 5 min a 37 grados C.
2. Añadir 7 ml (14 ml en el grande) de medio regular y pipetear 10 veces arriba y abajo para resuspender las células.
3. Tomar 25 microlitros de la suspensión celular de la etapa 2 y 75 microlitros de colorante azul de tripán (1:4) y colocar 10 microlitros en un contador celular.
4. Contar el número de células en un hemocitómetro convencional.
5. El número medio de células x 4 x 10000 es el número de células por ml.
6. Diluir con medio regular para tener 350.000/ml.
7. Cultivar en placa 100 microlitros (35.000 células para HEK293) en una placa de 96 pocillos.

Transfección para placas de 2 x 96 pocillos (formato de 60 pocillos)

1. OPTI-MEM 2 ml + 80 microlitros de Lipofectamine 2000 (1:25) + 15 microlitros de SuperRNAsin (AMBION).
2. Transferir alícuotas de ARNip (0,8 microlitros de 100 micromolar para escrutar (el factor de dilución total es 1:750, 0,8 microlitros de 100 disolución micromolar producirán 100 nanomolar final) la fuente honda en un orden deseado (usualmente 3 columnas x 6 para el formato de 60 pocillos o cuatro columnas por 8 para 96 pocillos).
3. Transferir 100 microlitros de OPTI-MEM.
4. Transferir 100 microlitros de OPTI-MEM con Lipofectamine 2000 y SuperRNAsin a cada pocillo.
5. Dejar durante 20-30 min a RT.
6. Añadir 0,55 ml de medio regular a cada pocillo. Cubrir la placa con película plástica y mezclar.
7. Disponer en matrices 100 x 3 x 2 directamente las células (suficiente para dos placas).

Transfección para placas de 2 x 6 pocillos

8. 8 ml de OPTI-MEM + 160 microlitros Lipofectamine 2000 (1:25). 30 microlitros de SuperRNAsin (AMBION).
9. Transferir alícuotas de ARNip (el factor de dilución total es 1:750, 5 microlitros de disolución 100 micromolar producirán 100 nanomolar final) a tubos de poliestireno.
10. Transfer 1.300 microlitros de OPTI-MEM con Lipofectamine 2000 y SuperRNAsin (AMBION).
11. Dejar durante 20-30 min a RT.
12. Añadir 0,55 ml de medio regular a cada pocillo. Cubrir la placa con película plástica y mezclar.
13. Transferir 2 ml a cada pocillo (suficiente para dos pocillos).

Los niveles de ARNm o proteína se miden 24, 48, 72, y 96 horas después de la transfección con kits convencionales o conjuntos de Custom B-DNA y kits Quantigene (Bayer).

Ejemplo 5

Medición de la actividad/detección

El nivel de interferencia de ARN inducida por ARNip, o silenciamiento génico, se estimó analizando la reducción de los niveles de ARNm diana o la reducción de los niveles de proteína correspondientes. Los análisis de los niveles de ARNm se llevaron a cabo utilizando tecnología B-DNA™ (Quantagene Corp.). Los niveles de proteína para fLUC y rLUC se analizaron mediante kits STEADY GLO™ (Promega Corp.). Los niveles de fosfatasa alcalina humana se analizaron mediante Great EscAPe SEAP Fluorescence Detection Kits (Núm. K2043-1), BD Biosciences, Clontech.

Para el análisis de micromatrices: se transfectaron células HeLa en placas de 6 pocillos utilizando Oligofectamine (Invitrogen) y las dosis indicadas de dúplex de ARNip. Cuando no se especificó, la concentración de ARNip fue 100 nM. Se aisló el ARN 24 horas después de la transfección. El ARN de las células transfectadas con ARNip se hibridó contra el ARN de células transfectadas de manera simulada (tratadas con reactivo de transfección en ausencia de dúplex de ARN). El ARN total se purificó mediante el kit Qiagen RNeasy, y se procesó para la hibridación de micromatrices que contenían oligonucleótidos correspondientes a aproximadamente 21.000 genes humanos. Se realizaron hibridaciones proporcionales con una marca fluorescente inversa para eliminar el sesgo del colorante. Las micromatrices se adquirieron de Agilent Technologies o se sintetizaron como describen Hughes, TR, et al. (2001) Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. Nat. Biotech. 19: 342-347. Cada fila representa el patrón de expresión resultante de la transfección de un ARNip individual. Los datos de las micromatrices se presentan en las Figuras 7-11. Los datos mostrados son genes firma que muestran una diferencia en el nivel de expresión (valor de $p < 0,01$ y $\log_{10}$ intensidad > -1,5) con respecto a las células transfectadas simuladamente. No se colocaron cortes sobre el cambio en la multiplicidad de expresión. El color verde indica una disminución de expresión; el color rojo indica un aumento de expresión. Los datos se analizaron mediante el soporte lógico Rosetta Resolver™. El histograma en la parte superior de los diagramas de racimo refleja la similitud de los cambios de expresión génica entre los diferentes genes analizados en el experimento.

Ejemplo 6

Identificación de las modificaciones químicas que modifican la actividad de silenciamiento

Uso de la química 2'-O-ACE como una plataforma para la síntesis de ARN, un paseo de modificación que consiste en uno, dos, o tres nucleótidos modificados consecutivamente en las hebras efectora (S) y antisentido (AS) hebras se realizó en SEAP-2217, un ARNip dirigido contra la fosfatasa alcalina secretada humana (SEAP, SEAP-2217-hebra efectora 5'-GUGAUGUAUGUCAGAGAGUdTdT-3' **(**SEQ ID NO. 22**).** Posteriormente, la eficacia del silenciamiento de estos ARNips modificados se evaluó mediante la cotransfección de cada dúplex con un vector de expresión de SEAP (Clontech) en células HEK293 (ARNip 100 nM, 50 ng/pocillo de vector de expresión SEAP, Lipofectamine 2000) y analizando la disminución de la actividad de la proteína diana veinticuatro horas después de la transfección. La Figura 5 muestra la proporción entre la modificación y la función de ARNip SEAP-2217 2'-O-metilado. Los dúplex no modificados dirigidos a SEAP inducen > 90% de silenciamiento del gen SEAP. Modificaciones de una sola base de ambas hebras S y SA indujeron poco o nada de efecto en la actividad del ARNip, lo que sugiere que ningún grupo 2'-hidroxilo individual en cualquiera de las hebras desempeña un papel indispensable en el ARNi específico de la diana. En contraste, un paseo de modificaciones, elemento por elemento, dobles identificó varias posiciones clave en las que la introducción de bases modificadas interfirió significativamente en la actividad de silenciamiento. Se observó la interferencia más profunda en la función cuando se modificaron dos bases consecutivas (posiciones 1 y 2) o tres bases consecutivas (posiciones 1, 2 y 3) del extremo 5' de la hebra AS, dando indicios de este modo de un efecto cooperativo entre grupos modificados adyacentes. Puesto que modificaciones similares de la hebra S fallaron para alterar la funcionalidad del dúplex, las bases modificadas con 2'-O-metilo emparejadas permiten una distinción de las hebras S y AS y la identificación de las posiciones clave para

reducir la expresión de la diana. Por otra parte, estos experimentos identifican posiciones dentro del dúplex que juegan un papel clave en el silenciamiento la diana (y, posiblemente, de dianas inespecíficas).

Ejemplo 7

Análisis adicional de los efectos de las combinaciones de diferentes modificaciones químicas en el silenciamiento génico inducido por ARNip

Para someter a ensayo los efectos de las modificaciones con 2'-O-metilo en la funcionalidad de dúplex en diversas combinaciones, se sintetizaron una serie de ARNip dirigidos contra el gen de la luciferasa (luc 8, 18, 56, 58, 63, y 81) utilizando química 2'-O-ACE y se modificaron para que contuvieran grupos O-metilo en la posición 2' del anillo de ribosa.

Luc 8 5'-GAAAAAUCAGAGAGAUCCU-3' (SEQ ID NO. 23)
Luc 18 5'-UACCGGAAAACUCGACGCA-3' (SEQ ID NO. 24)
Luc 56 5'-ACGUCGCCAGUCAAGUAAC-3' (SEQ ID NO. 25)
Luc 58 5'-GAUUACGUCGCCAGUCAAG-3' (SEQ ID NO. 26)
Luc 63 5'-AGAGAUCGUGGAUUACGUC-3' (SEQ ID NO. 27)
Luc 81 5'-UGUUGUUUUGGAGCACGGA-3' (SEQ ID NO. 28)

(Las secuencias mencionadas anteriormente son la hebra efectora.)

Específicamente, se cotransfectaron ARNip que contenían modificaciones con 2'-O-metilo en los dos nucleótidos más 5' de (1) la hebra efectora, (2) la hebra antisentido, o (3) ambas hebras, junto con un plásmido de expresión de Luc (pCMVLuc, 50 ng/pocillo) en células HEK293. Posteriormente, se realizó una comparación elemento por elemento de la capacidad de silenciamiento de cada dúplex para determinar los efectos de esta modificación sobre la degradación del transcrito diana.

Los resultados de estos estudios mostraron que la adición de los grupos 2'-O-metilo solo a la hebra AS disminuyó drásticamente la capacidad de los dúplex para silenciar el ARNm diana (véase la Figura 6). En contraste, los dúplex que llevan esta modificación en la hebra efectora realizaron también (Luc 58, 63, 81) o mejor (Luc 56, 8, 18) que el equivalente, el ARNip sin modificar, lo que sugiere que la modificación de la hebra efectora inclinó la selección de la hebra por RISC y (en algunos casos) aumentó la concentración eficaz de la hebra antisentido. El silenciamiento mejorado podría ser el resultado de una disminución en la afinidad de unión de RISC al extremo efector 5' de la molécula (y por lo tanto un aumento en la disponibilidad de RISC libre para la asociación al extremo opuesto), la disminución de la capacidad de las quinasas nativas para fosforilar la hebra efectora (disminuyendo así la competencia entre la hebra efectora y antisentido para el acceso a RISC), o un descenso de la capacidad de RISC para desenredar el dúplex desde el extremo efector 5'. El ARNip que contenía modificaciones con 2'-O-metilo en ambas hebras mostró una disminución de las capacidades de silenciamiento que estaban entre los valores observados para las moléculas que contenían modificaciones en cualquier hebra individual. Una interpretación de estos resultados es que las modificaciones con 2'-O-metilo reducen la afinidad de unión que tiene RISC por la hebra modificada. En los casos en los que se modifican las dos hebras, ninguna hebra recibe una ventaja sobre su complemento, y se establece un nuevo equilibrio que representa un promedio de la funcionalidad de ambas moléculas modificadas.

Para someter a ensayo si la disminución del nivel de silenciamiento observado en las células que contienen ARNip S/AS 2'-O-metilado fue el resultado de una capacidad debilitada de las quinasas celulares para fosforilar los dúplex, los ARNip que llevan las modificaciones con 2'-O-metilo se modificaron para portar un grupo fosfato en el extremo 5' de la hebra AS. Específicamente, los ARNip de Luc que portan grupos 2'-O-metilo en cualquiera de: (1) las posiciones 1 y 2 del extremo 5' de la hebra antisentido; o (2) las posiciones 1 y 2 del extremo 5' de ambas hebras efectora y antisentido, se fosforilaron en 5' en la hebra AS durante la síntesis. Estos dúplex se introdujeron a continuación en células HEK293 utilizando los procedimientos descritos anteriormente y se sometieron a ensayo para determinar la capacidad de silenciar el objetivo deseado. Los resultados mostraron que en 83% de los casos sometidos a ensayo (10/12), la fosforilación en 5' de la hebra antisentido mejoró la eficacia del silenciamiento del dúplex sobre la molécula no fosforilada equivalente (Figura 6). En los dos casos restantes, el silenciamiento se mantuvo sin cambios o mejoró solo marginalmente. Estos resultados demuestran que la combinación de la fosforilación en 5' de la hebra antisentido y la 2'O-metilación de las posiciones 1 y 2 de la hebras efectora y antisentido son compatibles con el mantenimiento de la funcionalidad de dúplex. Por otra parte, puesto que las modificaciones con 2'-O-metilo duales de las posiciones 1 y 2 de una hebra (en ausencia de fosforilación 5' de la posición terminal) compromete severamente la capacidad de silenciamiento de la hebra no fosforilada, este patrón de modificación (modificación con 2'-O-metilo de las posiciones 1 y 2 de la hebra efectora, modificación con 2'-O-metilo de las posiciones 1 y 2 de la hebra antisentido, más la fosforilación en 5' de la hebra antisentido) identifica una estrategia para la eliminación de las dianas inespecíficas de la hebra efectora sin comprometer la reducción de la expresión de la diana inespecífica. Por otra parte, el efecto potencial de la 2'-O-metilación sobre otras etapas llevó a los autores a considerar que la posibilidad de que dichas modificaciones también pudieran alterar la capacidad de

RISC para distinguir entre las dianas previstas que tienen 100% de homología con la hebra antisentido y las dianas inespecíficas que tienen cantidades menores de homología.

Ejemplo 8

Identificación de patrones de modificación química que eliminan, minimizan o alteran los efectos inespecíficos generados por el ARNip

Para determinar si el ARNip que contenía el patrón de modificación (modificación con 2'-O-metilo de las posiciones 1 y 2 de la hebra efectora, modificación con 2'-O-metilo de las posiciones 1 y 2 de la hebra antisentido, más la fosforilación en 5' de la hebra antisentido) tenía los mismos efectos sobre la diana inespecífica o efectos alterados, se transfectaron ARNip dirigidos a IGFR1 (IGFR1-73) a células en estados no modificado y modificado. Como se muestra en la Figura 7, si bien la versión no modificada del ARNip indujo una modulación génica inespecífica significativa, la forma modificada reguló a la baja un subconjunto mucho más limitado. Estos hallazgos fueron observados constantemente a través de una amplia gama de ARNip sometidos a ensayo (Véase la Figura 8 para el mapa de calor de MAPK14-153 y MPHOSH1-202, y la Figura 9 para la suma de los resultados en 8 ARNip diferentes dirigidos a 4 genes). En todos estos casos, el silenciamiento por la molécula totalmente modificado fue más o menos equivalente a la molécula no modificada.

Para determinar si el número o la posición de las modificaciones con 2'-O-metilo eran importantes para el aumento de especificidad observado, los autores de la presente invención realizaron un paseo de modificaciones químicas a través de MAPK14-153. Todos los dúplex en estos estudios con la excepción del dúplex D (dúplex sin modificar) y el dúplex F (modificado con 2'-O-metilo en las posiciones 1 y 2 de la hebra antisentido, sin modificación en la hebra antisentido) contienen modificaciones con 2'-O-metilo emparejadas en las posiciones 1 y 2 de la hebra efectora. Además, todos los dúplex en este estudio (D → R) contienen un grupo fosfato en el extremo 5' de la hebra AS. Además, la hebra complementaria en las configuraciones restantes (E, G → Q) contiene las siguientes modificaciones:

E: modificación con 2'O-metilo de las posiciones 1 y 2 de la hebra AS
G: modificación con 2'O-metilo de las posiciones 2 y 3 de la hebra AS
H: modificación con 2'O-metilo de las posiciones 3 y 4 de la hebra AS
I: modificación con 2'O-metilo de las posiciones 4 y 5 de la hebra AS
J: modificación con 2'O-metilo de las posiciones 5 y 6 de la hebra AS
K: modificación con 2'O-metilo de las posiciones 6 y 7 de la hebra AS
L: modificación con 2'O-metilo de las posiciones 7 y 8 de la hebra AS
M: modificación con 2'O-metilo de las posiciones 8 y 9 de la hebra AS
N: modificación con 2'O-metilo de las posiciones 9 y 10 de la hebra AS
O: modificación con 2'O-metilo de las posiciones 10 y 11 de la hebra AS
P: modificación con 2'O-metilo de la posición1 de la hebra AS
Q: modificación con 2'O-metilo de la posición2 de la hebra AS

Como se muestra en la Figura 10a, únicamente tres patrones de modificación, E, G, y Q mostraron reducciones significativas de los efectos inespecíficos. Puesto que el elemento común entre estas tres moléculas es la modificación en la posición 2 de la hebra antisentido, esta posición se identifica como un elemento clave para la eliminación de las dianas inespecíficas.

Para confirmar este descubrimiento, se diseñaron tres ARNips adicionales dirigidos a MAPK14, KNTC2, y STK6 para que contuvieran: (1) las modificaciones en las posiciones 1 y 2 de la hebra efectora; (2) las modificaciones en las posiciones 1 y 2 de la hebra efectora más las modificaciones en la posición 1 de la hebra antisentido; (3) las modificaciones en las posiciones 1 y 2 de la hebra efectora más las modificaciones en la posición 2 de la hebra antisentido; (4) las modificaciones en las posiciones 1 y 2 de la hebra efectora plus las modificaciones en las posiciones 1 y 2 de la hebra antisentido. Los efectos inespecíficos generados por estas moléculas se compararon con el ARNip no modificado. En todos los casos estudiados, la hebra antisentido también contiene un grupo fosfato en el carbono 5' del nucleótido 5'-terminal. Los ARNip dirigidos a MAPK14, KNTC2, y STK6 (MAPK14, 5' 193 CCUACAGAGAACUGCGGUU-3' (SEQ. ID NO. 29), secuencia efectora; KNTC2, 5' GGCUUCCUUACAAGGAGAU-3' (SEQ. ID NO. 30), secuencia efectora; y STK6, 5' CGGGUCUUGUGUCCUUCAA-3' (SEQ. ID NO. 31), secuencia efectora) muestran todos niveles significativos de efectos inespecíficos cuando no están modificados (Figura 10b). En contraste, la adición del siguiente patrón de modificación: modificación con 2'-O-metilo de los nucleótidos efectores 1 y 2, más modificación con 2'-O-metilo de nucleótidos antisentido 1 y 2 (o de 2), más fosforilación del carbono 5' del primer nucleótido antisentido, fue suficiente para eliminar la mayoría de los efectos inespecíficos. Estos estudios demuestran la importancia fundamental de la posición 2 para limitar los efectos inespecíficos y la capacidad del patrón de modificación química descrito en la realización 1 para reducir y/o eliminar estos efectos.

Ejemplo 9

Evaluación de los emparejamientos erróneos de bases para eliminar los efectos inespecíficos: Una comparación con el ARNip modificado químicamente

Pare explorar adicionalmente la importancia de la posición 2 en los efectos inespecíficos, se incorporaron emparejamientos erróneos de bases en el ARNip dirigido al gen MAPK14. Los dúplex que portan un solo emparejamiento erróneo de pares de bases (entre la hebra antisentido y el sitio diana de la diana) se compararon a continuación con el ARNip que portaba modificaciones químicas emparejadas (modificación con 2'-O-metilo) en posiciones a lo largo de la molécula (esto es, posiciones 1 y 2, 2 y 3, 3 y 4, *etc...* de la hebra antisentido). Los resultados de estos experimentos se proporcionan en la Figura 11 y demuestran varios puntos importantes. En primer lugar, como se ha observado previamente, la modificación química de las posiciones 1 y 2 tiene el mayor efecto en la eliminación de la firma inespecífica, mientras que las modificaciones con 2'-O-metilo emparejadas en otras posiciones proporcionaron cantidades menores de silenciamiento inespecífico. Sorprendentemente, la introducción de emparejamientos erróneos de pares de bases en varias posiciones a lo largo del dúplex proporcionó resultados variables, dependiendo de la posición del emparejamiento. Un emparejamiento en la posición 1 fracasó para eliminar la firma inespecífica de la molécula no modificada y condujo a una regulación a la baja adicional/más aumentada de algunos de los genes. La introducción de emparejamientos erróneos de pares de bases en las posiciones 2-7 eliminó una porción sustancial de la firma generada por los dúplex no modificados, pero condujo frecuentemente a patrones de expresión alterados de otros genes distintos del gen diana. Para MAPK14-153, esto fue particularmente evidente cuando los emparejamientos erróneos se introdujeron en la posición 4 de la hebra antisentido. En conjunto, estos estudios demuestran que si bien tanto los emparejamientos erróneos de pares de bases y el patrón de modificaciones químicas de la reivindicación 1 pueden alterar los efectos inespecíficos del ARNip, los patrones de modificaciones químicas son superiores debido al hecho de que una firma secundaria no remplaza el patrón observado en las moléculas no modificadas.

Ejemplo 10

Demostración de que los efectos inespecíficos del ARNip generan fenotipos observables: ARNip tóxico

La importancia de la presente invención se hizo evidente cuando se reconoció que los efectos inespecíficos pueden inducir fenotipos que no eran asociados a la reducción de la expresión de la diana. Este fenómeno resultó evidente en un estudio de inespecificidad y toxicidad celular inducidas por ARNip. Se evaluó una población de ARNip seleccionados al azar derivados de un paseo con ARNip dirigido a DBI (NM_020548, posición 202-291) para determinar la capacidad de inducir toxicidad. La colección de ARNip dirigidos consistió en 90 dúplex individuales (19 nt) y cubrió la región respectiva en etapas de una sola base. Los dúplex se transfectaron a células HeLa (10.00 células por pocillo, ARNip 10nM) utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y se utilizó un umbral de viabilidad celular de 75% como corte arbitrario para distinguir las secuencias tóxicas de las no tóxicas. La supervivencia de las células después del tratamiento se determinó mediante un análisis de citotoxicidad con Azul Alamar (BioSource Int.) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

Se observó que los ARNip transfectados en estas condiciones inducían niveles variables de citotoxicidad celular. En líneas generales, se encontró que 14 de 90 dúplex de ARNip (15.5%) disminuían la viabilidad celular por debajo de 75% (Figura 12a). Como ejemplo de que se podría encontrar que los ARNip tanto tóxicos como no tóxicos inducían un fuerte silenciamiento de DBI, la citotoxicidad relativa de cada ARNip no se relacionó con la reducción de la expresión específica de la diana.

La confirmación independiente de la toxicidad inducida por ARNip se obtuvo a partir del análisis de una colección separada de 48 ARNip funcionales (silenciamiento >70%) dirigidos a 12 genes diferentes ARAF1, NMA_001654, MAP2K1, NM_002755, MAP2K2 , NMA_030662, PI3K-CA , NMA_006218, Pi3K-CB, NMA_006219 Bcl2, NM_000633, Bcl3, NM_005178, MAPK1, NM_002745, MAPK3, NM_002746, AR, NM_000044, SRD5a1, NM_001047, SRD5a2, NMA_000348, cuatro ARNip por gen, Figura 12b). Únicamente doce de las cuarenta y ocho secuencias (25%) redujeron la viabilidad celular por debajo de 75%. Un grupo ilustrativo de dúplex de esta colección se muestra en la Figura 12c. Si bien los ocho dúplex dirigidos a MAPK1 y MAPK2 muestran un silenciamiento génico mayor de 80%, solo un único ARNip de cada cuarteto reduce la viabilidad celular por debajo de 75% (MAPK1-d4 y MAPK2-d3). De este modo, puesto que los ARNip restantes de cada grupo fueron igualmente funcionales en la capacidad para silenciar la diana, pero no tóxicos, la toxicidad inducida por MAP2K1-d4 y MAP2K2-d3 no está relacionada con la reducción de la expresión de la diana. Además, se encontró que el nivel de toxicidad relativo era dependiente de la concentración del ARNip durante la transfección (Figura 12d). Puesto que tanto la toxicidad como los efectos inespecíficos inducidos por ARNip muestran una dependencia de la concentración de ARNip, se pronosticó que la toxicidad inducida por ARNip era un efecto inespecífico.

La presentación lineal de la distribución del ARNip tóxico junto con el paseo por DBI mostraron que la dispersión de estas secuencias era frecuentemente no aleatoria (esto es, agrupada) y sugería la presencia de uno o más motivos que eran responsables de la toxicidad observada (Figura 12a, áreas delimitadas en recuadros). El posterior análisis de las secuencias tóxicas del conjunto de ARNip funcional aleatorio reveló que las doce secuencias contenían un motivo AAA/UUU o GCCA/UGGC. Para someter a ensayo si existía una correlación entre la presencia de estos motivos y la toxicidad, se seleccionaron tres grupos de ARNip seleccionados al azar, adicionales que contenían motivos AAA/UUU, motivos GCCA/UGGC, o ningún motivo, y se sometieron a ensayo para determinar la capacidad para inducir muerte celular. Como se muestra en las Figuras 13a y 13b, el ARNip que contenía los motivos AAA/CTUU y GCCA/UGGC mostró una probabilidad más alta de inducir toxicidad (56% y 53%, respectivamente) que el ARNip que no contenía motivo (Figura 13c, 6%). Puesto que el valor p de la prueba T para estas dos muestra fue 1,3 x 10^{-7} estos hallazgos apoyan firmemente la noción de que existe una fuerte correlación entre la toxicidad celular inducida por ARNip y la liberación de dúplex que contienen los motivos AAA/UUU o GCCA/UGGC. Las secuencias diana para los ARNip utilizados para generar los datos de la Figura 12 y 13 se proporcionan en la Tabla I. Las modificaciones de los ARNip correspondientes, cuanto se emplean, se indican en los ejemplos y las descripciones de las figuras.

Tabla I					
Secuencias utilizadas para los datos de las Figuras 12-14					
FIG.	**Núm. de Acceso**	**Nombre del Gen**	**Denominación**	**Secuencia Diana del ARNip**	**SEQ. ID NO.**
12A					
	NM_020548	DBI			
			1	ACGGGCAAGGCCAAGUGGG	32
			2	CGGGCAAGGCCAAGUGGGA	33
			3	GGGCAAGGCCAAGUGGGAU	34
			4	GGCAAGGCCAAGUGGGAUG	35
			5	GCAAGGCCAAGUGGGAUGC	36
			6	CAAGGCCAAGUGGGAUGCC	37
			7	AAGGCCAAGUGGGAUGCCU	38
			8	AGGCCAAGUGGGAUGCCUG	39
			9	GGCCAAGUGGGAUGCCUGG	40
			10	GCCAAGUGGGAUGCCUGGA	41
			11	CCAAGUGGGAUGCCUGGAA	42
			12	CAAGUGGGAUGCCUGGAAU	43
			13	AAGUGGGAUGCCUGGAAUG	44
			14	AGUGGGAUGCCUGGAAUGA	45
			15	GUGGGAUGCCUGGAAUGAG	46
			16	UGGGAUGCCUGGAAUGAGC	47
			17	GGGAUGCCUGGAAUGAGCU	48
			18	GGAUGCCUGGAAUGAGCUG	49
			19	GAUGCCUGGAAUGAGCUGA	50
			20	AUGCCUGGAAUGAGCUGAA	51
			21	UGCCUGGAAUGAGCUGAAA	52
			22	GCCUGGAAUGAGCUGAAAG	53
			23	CCUGGAAUGAGCUGAAAGG	54
			24	CUGGAAUGAGCUGAAAGGG	55

Tabla I					
Secuencias utilizadas para los datos de las Figuras 12-14					
FIG.	**Núm. de Acceso**	**Nombre del Gen**	**Denominación**	**Secuencia Diana del ARNip**	**SEQ. ID NO.**
			25	UGGAAUGAGCUGAAAGGGA	56
			26	GGAAUGAGCUGAAAGGGAC	57
			27	GAAUGAGCUGAAAGGGACU	58
			28	AAUGAGCUGAAAGGGACUU	59
			29	AUGAGCUGAAAGGGACUUC	60
			30	UGAGCUGAAAGGGACUUCC	61
			31	GAGCUGAAAGGGACUUCCA	62
			32	AGCUGAAAGGGACUUCCAA	63
			33	GCUGAAAGGGACUUCCAAG	64
			34	CUGAAAGGGACUUCCAAGG	65
			35	UGAAAGGGACUUCCAAGGA	66
			36	GAAAGGGACUUCCAAGGAA	67
			37	AAAGGGACUUCCAAGGAAG	68
			38	AAGGGACUUCCAAGGAAGA	69
			39	AGGGACUUCCAAGGAAGAU	70
			40	GGGACUUCCAAGGAAGAUG	71
			41	GGACUUCCAAGGAAGAUGC	72
			42	GACUUCCAAGGAAGAUGCC	73
			43	ACUUCCAAGGAAGAUGCCA	74
			44	CUUCCAAGGAAGAUGCCAU	75
			45	UUCCAAGGAAGAUGCCAUG	76
			46	UCCAAGGAAGAUGCCAUGA	77
			47	CCAAGGAAGAUGCCAUGAA	78
			48	CAAGGAAGAUGCCAUGAAA	79
			49	AAGGAAGAUGCCAUGAAAG	80
			50	AGGAAGAUGCCAUGAAAGC	81
			51	GGAAGAUGCCAUGAAAGCU	82
			52	GAAGAUGCCAUGAAAGCUU	83
			53	AAGAUGCCAUGAAAGCUUA	84
			54	AGAUGCCAUGAAAGCUUAC	85
			55	GAUGCCAUGAAAGCUUACA	86
			56	AUGCCAUGAAAGCUUACAU	87
			57	UGCCAUGAAAGCUUACAUC	88
			58	GCCAUGAAAGCUUACAUCA	89
			59	CCAUGAAAGCUUACAUCAA	90
			60	CAUGAAAGCUUACAUCAAC	91
			61	AUGAAAGCUUACAUCAACA	92

Tabla I					
Secuencias utilizadas para los datos de las Figuras 12-14					
FIG.	**Núm. de Acceso**	**Nombre del Gen**	**Denominación**	**Secuencia Diana del ARNip**	**SEQ. ID NO.**
			62	UGAAAGCUUACAUCAACAA	93
			63	GAAAGCUUACAUCAACAAA	94
			64	AAAGCUUACAUCAACAAAG	95
			65	AAGCUUACAUCAACAAAGU	96
			66	AGCUUACAUCAACAAAGUA	97
			67	GCUUACAUCAACAAAGUAG	98
			68	CUUACAUCAACAAAGUAGA	99
			69	UUACAUCAACAAAGUAGAA	100
			70	UACAUCAACAAAGUAGAAG	101
			71	ACAUCAACAAAGUAGAAGA	102
			72	CAUCAACAAAGUAGAAGAG	103
			73	AUCAACAAAGUAGAAGAGC	104
			74	UCAACAAAGUAGAAGAGCU	105
			75	CAACAAAGUAGAAGAGCUA	106
			76	AACAAAGUAGAAGAGCUAA	107
			77	ACAAAGUAGAAGAGCUAAA	108
			78	CAAAGUAGAAGAGCUAAAG	109
			79	AAAGUAGAAGAGCUAAAGA	110
			80	AAGUAGAAGAGCUAAAGAA	111
			81	AGUAGAAGAGCUAAAGAAA	112
			82	GUAGAAGAGCUAAAGAAAA	113
			83	UAGAAGAGCUAAAGAAAAA	114
			84	AGAAGAGCUAAAGAAAAAA	115
			85	GAAGAGCUAAAGAAAAAAU	116
			86	AAGAGCUAAAGAAAAAAUA	117
			87	AGAGCUAAAGAAAAAAUAC	118
			88	GAGCUAAAGAAAAAAUACG	119
			89	AGCUAAAGAAAAAAUACGG	120
			90	GCUAAAGAAAAAAUACGGG	121
12B					
	NM_000633	Bcl2	Bcl2 2	GAAGUACAUCCAUUAUAAG	122
	NM_002745	MAPK1	MAPK1 2	AAACAGAUCUUUACAAGCU	123
	NM_006219	PI3K Cb	PI3K Cb 4	UUUCAAGUGUCUCCUAAUA	124
	NM_001654	ARaf1	Raf1 2	GCAAAGAACAUCAUCCAUA	125
	NM_002755	MAP2K1	MAP2K1 2	GCAGAGAGAGCAGAUUUGA	126

Tabla I					
Secuencias utilizadas para los datos de las Figuras 12-14					
FIG.	**Núm. de Acceso**	**Nombre del Gen**	**Denominación**	**Secuencia Diana del ARNip**	**SEQ. ID NO.**
	NMA_000044	AR	AR 3	UCAAGGAACUCGAUCGUAU	127
	NMA_001654	ARaf1	Raf1 3	GACAUGAAAUCCAACAAUA	128
	NM_006219	PI3K Cb	PI3K Cb 2	UCAAGUGUCUCCUAAUAUG	129
	NM_030662	MAP2K2	MAP2K2 1	CAAAGACGAUGACUUCGAA	130
	NM_030662	MAP2K2	MAP2K2 4	GGAAGCUGAUCCACCUUGA	131
	NM_002745	MAPK1	MAPK1 3	CAAGAGGAUUGAAGUAGAA	132
	NM_002745	MAPK1	MAPK1 1	CCAAAGCUCUGGACUUAUU	133
	NM_000633	Bcl2	Bcl2 3	GUACGACAACCGGGAGAUA	134
	NM_000633	Bcl2	Bcl2 4	AGAUAGUGAUGAAGUACAU	135
	NM_000633	Bcl2	Bcl2 1	GGGAGAUAGUGAUGAAGUA	136
	NM_000044	AR	AR 4	GAAAUGAUUGCACUAUUGA	137
	NM_001654	ARaf1	Raf1 1	GCACGGAGAUGUUGCAGUA	138
	NM_000348	SRD5A2	SRD5A2 1	GCUACUAUCUGAUUUACUG	139
	NM_000044	AR	AR 2	CAAGGGAGGUUACACCAAA	140
	NM_002755	MAP2K1	MAP2K1 3	GAGGUUCUCUGGAUCAAGU	141
	NM_002746	MAP3	MAPK3 4	GCUACACGCAGUUGCAGUA	142
	NM_002746	MAPK3	MAPK3 2	AGACUGACCUGUACAAGUU	143
	NM_030662	MAP2K2	MAP2K2 2	GAUCAGCAUUUGCAUGGAA	144
	NM_000044	AR	AR-1	GGAACUCGAUCGUAUCAUU	145
	NM_006219	PI3K Cb	PI3K Cb-1	CGACAAGACUGCCGAGAGA	146
	NM_005178	Bcl3	Bcl3 2	GAGCCUUACUGCCUUUGUA	147
	NM_006218	PI3K Ca	PI3K Ca 4	CUGAAGAAAGCAUUGACUA	148
	NM_005178	Bcl3	Bcl3 3	GGCCGGAGGCGCUUUACUA	149
	NM_002745	MAPK1	MAPK1 4	GUACAGGGCUCCAGAAAUU	150
	NM_005178	Bcl3	Bcl3 4	UCGACGCAGUGGACAUUAA	151
	NM_006218	PI3K Ca	PI3K Ca 2	AACUAGAAGUAUGUUGCUA	152
	NM_002746	MAPK3	MAPK3 1	GACCGGAUGUUAACCUUUA	153
	NM_000348	SRD5A2	SRD5A2 4	UUGGGUGUCUUCUUAUUUA	154
	NM_006218	PI3K Ca	PI3K Ca 3	AAUGGCUUUGAAUCUUUGG	155
	NM_002755	MAP2K1	MAP2K1 1	GCACAUGGAUGGAGGUUCU	156
	NM_006219	PI3K Cb	PI3K Cb 3	GGAUUCAGUUGGAGUGAUU	157
	NM_001654	ARaf1	Raf1 4	CAAAGAACAUCAUCCAUAG	158
	NM_001047	SRD5A1	SRD5A1 3	GAAAGCCUAUGCCACUGUU	159
	NM_000348	SRD5A2	SRD5A2 2	GCUAUGCCCUGGCCACUUG	160
	NM_002755	MAP2K1	MAP2K1 4	GAGCAGAUUUGAAGCAACU	161
	NM_001047	SRD5A1	SRD5A1 2	UAACUGCAGCCAACUAUUU	162
	NM_006218	PI3K Ca	PI3K Ca-1	AUGUUUACUACCAAAUGGA	163

Tabla I					
Secuencias utilizadas para los datos de las Figuras 12-14					
FIG.	**Núm. de Acceso**	**Nombre del Gen**	**Denominación**	**Secuencia Diana del ARNip**	**SEQ. ID NO.**
	NM_030662	MAP2K2	MAP2K2 3	UCCAGGAGUUUGUCAAUAA	164
	NM_001047	SRD5A1	SRD5A1-1	GCAGAUACUUGAGCCAUUG	165
	NM_002746	MAPK3	MAPK3 3	GAAACUACCUACAGUCUCU	166
	NM_001047	SRD5A1	SRD5A1 4	CCGGAAAUUUGAAGAGUAU	167
	NM_005178	Bcl3	Bcl3 1	GAACACCGAGUGCCAAGAA	.168
	NM_000348	SRD5A2	SRD5A2 3	GGACAUUUGUGUACUCACU	169
12 C					
	NM_002755	MAP2K1	MAP2K1 1	GCACAUGGAUGGAGGUUCU	170
	NM_002755	MAP2K1	MAP2K1 2	GCAGAGAGAGCAGAUUUGA	171
	NM_002755	MAP2K1	MAP2K1 3	GAGGUUCUCUGGAUCAAGU	172
	NM_002755	MAP2K1	MAP2K1 4	GAGCAGAUUUGAAGCAACU	173
	NM_030662	MAP2K2	MAP2K2 1	CAAAGACGAUGACUUCGAA	174
	NM_030662	MAP2K2	MAP2K2 2	GAUCAGCAUUUGCAUGGAA	175
	NM_030662	MAP2K2	MAP2K2 3	UCCAGGAGUUUGUCAAUAA	176
	NM_030662	MAP2K2	MAP2K2 4	GGAAGCUGAUCCACCUUGA	177
12 D					
	NM_030662	MAP2K2	MAP2K2 3	UCCAGGAGUUUGUCAAUAA	178
	NM_001047	SRD5A1	SRD5A1 1	GCAGAUACUUGAGCCAUUG	179
	NM_001047	SRD5A1	SRD5A1 3	CCGGAAAUUUGAAGAGUAU	180
	NM_000348	SRD5A2	SRD5A2 3	GGACAUUUGUGUACUCACU	181
13A					
	NM_005990	STK10		GAAACGAGAUUCCUUCAUC	182
	AY406545	MADH6		CAAGAUCGGUUUUGGCAUA	183
	NM_170679	SKP1A		CAAACAAUCUGUGACUAUU	184
	NM_002257	KLK1		CAACUUGUUUGACGACGAA	185
	NM_000942	PPIB		GAAAGGAUUUGGCUACAAA	186
	NM_005083	U2AF1L1		GAGCAUGUUUACAACGUUU	187
	NM_000942	PPIB		GGAAAGACUGUUCCAAAAA	188
	NM_006622	SNK		ACAUUUACAUUCUCUUGGA	189
	NM_000942	PPIB		GAAAGAGCAUCUACGGUGA	190
	NM_005379	MYO1A		ACAAGGAGAUUUAUACCUA	191
	NM_002620	PF4V1		AGGAACAUUUGGAGAGUUA	192
	NM_005627	Sgk1		CAUCGUUUAUAGAGACUUA	193

Tabla I					
Secuencias utilizadas para los datos de las Figuras 12-14					
FIG.	**Núm. de Acceso**	**Nombre del Gen**	**Denominación**	**Secuencia Diana del ARNip**	**SEQ. ID NO.**
	NMA_022550	XRCC4		GAAAGUAAGCAGAAUCUAU	194
	AY313906	SARS SEP		AACCAACGGUUUACGUCUA	195
	NM_181523	PIK3R1		GAAAGACAAGAGACCAAUA	196
	NM_020183	ARNTL2		CAACAGCGAUUUUAGGAUA	197
	NM_018131	C10ORF3		GGAAACAGCUGCUCAUUCA	198
	NM_139025	ADAMTS13		ACAUUUGGCUGUGAUGGUA	199
	NM_005767	P2RY5		GAAACUACAACUUACAUGA	200
	NM_147199	MRGX1		GAUGAUGUUUUCCUACUUU	201
	NM_001892	CSNK1A1		AGAAUUUGCGAUGUACUUA	202
	NM_006930	SKP1A		AGGUUUGCUUGAUGUUACA	203
	M15077	PPYLUC		CGAAAGGUCUUACCGGAAA	204
	NM_006257	PRKCQ		CAAAGAGUAUGUCGAAUCA	205
	NM_018131	C10ORF3		AAGGAAAGCUGACUGAUAA	206
	NM_013391	DMGDH		CAUCAAAGCUGCCAUGGAA	207
	BC025733	FADD		CAGCAUUUAACGUCAUAUG	208
	NM_005541	INPP5D		AWGCUUUUACACUUACAG	209
	NM_006395	GSA7		GAUCAAAGGUUUUCACUAA	210
	AC146999	Human Herpes-virus 5		CAAACCAGCGCGCUAAUGA	211
	NM_153202	ADAM33		CAAACAGCGUCUCCUGGAA	212
	NM_005508	CCR4		GAAAGCAUAUACAGCAAUU	213
	NM_002605	PDE8A		CAAAGAAGAUAACCAAUGU	214
	NM_000455	STK11		GAAACAUCCUCCGGCUGAA	215
	AF493910	RALA		GAGCAGAUUUUAAGAGUAA	216
	NM_012184	FOXD4L1		GGACAAUUUUGCAGCAACA	217
	NM_001273	CHD4		CAAAGGUGCUGCUGAUGUA	218
	NM_002434	MPG		ACAUCAUUUACGGCAUGUA	219
13B					
	NM_004429	EFNB1		CCACACCGCUGGCCAAGAA	220
	NM_002717	PPP2R2A		UAUCAAGCCUGCCAAUAUG	221
	XM_110671	M11		UCAAUAAGCCAUCUUCUAA	222
	NM_001282	AP2B1		GAGCUAAUCUGCCACAUUG	223
	NM_001846	COL4A2		CGAAGGCGGUGGCCAAUCA	224
	AF100153	CNK		GCACAUCCGUUGGCCAUCA	225
	NM_001136	AGER		GCCAGGCAAUGAACAGGAA	226
	NM_007122	USF1		GGAAGCCAGCGCUCAAUUG	227

Tabla I					
Secuencias utilizadas para los datos de las Figuras 12-14					
FIG.	**Núm. de Acceso**	**Nombre del Gen**	**Denominación**	**Secuencia Diana del ARNip**	**SEQ. ID NO.**
	NM_001136	AGER		GCGAGCCACUGGUGCUGAA	228
	NM_018653	GPRC5C		CCACCUCCGUUGCCAUAUG	229
	NM_001431	EPB41L2		GAAGGACUCUAGCCAGUUA	230
	NM_000119	EPB42		GACCACACCUUGCCAUCAA	231
	NM_004448	ERBB2		GCAGUUACCAGUGCCAAUA	232
	NM_005971	FXYD3		GGACGCCAAUGACCUAGAA	233
	NM_003494	DYSF		GAACUAUGCUGCCAUGAAG	234
	NM_013391	DMGDH		CAUCAAAGCUGCCAUGGAA	235
	NM_022353	OSGEPL1		AGACAUUGCUGCCACAGUA	236
	NM_003367	USF2		GGCCAGUUCUACGUCAUGA	237
	NM_172390	NFATc1		GCCAGGAGCUGAACAUUAA	238
13C					
	NM_005378	MYCN		CACGUCCGCUCAAGAGUGU	239
	NM_000147	FUCA1		UAACAAUGCUGGGAAUUCA	240
	NM_003566	EEA1		AGACAGAGCUUGAGAAUAA	241
	NM_004707	APG12L		UGUUGCAGCUUCCUACUUC	242
	NM_003918	GYG2		GACCAAGGCUUACUGAAUA	243
	NM_004462	FDFT1		CAUAGUUGGUGAAGACAUA	244
	XM_291277	SgK223		GAGCUCCACUUCAAUGAGA	245
	NM_004573	PLC beta 2		GAACAGAAGUUACGUUGUC	246
	NM_003955	SOCS3		CACCUGGACUCCUAUGAGA	247
	NM_203330	CD59		CUACAACUGUCCUAACCCA	248
	NM_002377	MAS1		CUACACAAUUGUCACAUUA	249
	NM_153326	AKR1A1		UGAGGAGGCUGAGUAAUUC	250
	NM_001749	CAPNS1		CCACAGAACUCAUGAACAU	251
	NM_016735	LIMK1		UCAACUUCAUCACUGAGUA	252
	NM_002393	MDM4		CGUCAGAGCUUCUCCGUAA	253
	NM_021969	NR0B2		CGUAGCCGCUGCCUAUGUA	254
	NM_002741	PRKCL1		ACAGCGACGUGUUCUCUGA	255
	NM_014452	TNFRSF21		CAGAAGGCCUCGAAUCUCA	256
	NM_139343	BIN1		GCUCAAGGCUGGUGAUGUG	257
	NM_001003945	ALAD		GAUGACAUACAGCCUAUCA	258
	NM_013315	TPTE		UUUAUUCGAUUCCUCGUUA	259
	NM_024560	FLJ21963		UCGAGUGGAUGAUGUAAUA	260
	L07868	ERBB4		AGGAUCUGCAUAGAGUCUU	261
	NM_001003809	DLGAP1		CAACCUGGAUGGUGACAUG	262

Tabla I					
Secuencias utilizadas para los datos de las Figuras 12-14					
FIG.	**Núm. de Acceso**	**Nombre del Gen**	**Denominación**	**Secuencia Diana del ARNip**	**SEQ. ID NO.**
	NM_005232	EPHA1		UGAAGAACGGUACCAGAUG	263
	NM_003818	CDS2		GUGAGACAGUGACGGAUUA	264
	NM_153675	FOXA2		ACGAACAGGUGAUGCACUA	265
	XM_496495	GGT2		AAUAAUGAAUGGACGACUU	266
	NM_020676	ABHD6		GAUGACCUGUCCAUAGAUG	267
	NM_000487	ARSA		UCUAUGACCUGUCCAAGGA	268
	AF348074	NAT2		AUACAGAUCUGGUCGAGUU	269
	U02388	CYP4F2		CAUAUUGACUUCCUGUAUU	270
14 A-14 I					
		EGFP		GCAAAGACCCCAACGAGAA	271
	NM_012154	eIF2C2		GCACGGAAGUCCAUCUGAA	272
				GCAGGACAAAGAUGUAUUA	273
				GGGUCUGUGGUGAUAAAUA	274
				GUAUGAGAACCCAAUGUCA	275
	NM_012154	eIF2C2		GCACGGAAGUCCAUCUGAA	276
				GCAGGACAAAGAUGUAUUA	277
				GGGUCUGUGGUGAUAAAUA	278
				GUAUGAGAACCCAAUGUCA	279
14J	NM_006218	PI3K Ca	PI3K Ca-1	AUGUUUACUACCAAAUGGA	280
	NM_001047	SRD5A1	SRD5A1 2	UAACUGCAGCCAACUAUUU	281
	NM_030662	MAP2K2	MAP2K2 3	UCCAGGAGUUUGUCAAUAA	282
	NM_001047	SRD5A1	SRD5A1-1	GCAGAUACUUGAGCCAUUG	283
	NN_001047	SRD5A1	SRD5A1 4	CCGGAAAUUUGAAGAGUAU	284
14K					
	NM_006218	PI3K Ca	PI3K Ca 1	AUGUUUACUACCAAAUGGA	285
	NM_001047	SRD5A1	SRD5A1 2	UAACUGCAGCCAACUAUUU	286
	NM_030662	MAP2K2	MAP2K2 3	UCCAGGAGUUUGUCAAUAA	287
	NM_001047	SRD5A1	SRD5A1 1	GCAGAUACUUGAGCCAUUG	288
	NM_001047	SRD5A1	SRD5A1 4	CCGGAAAUUUGAAGAGUAU	289
	NM_000348	SRD5A2	SRD5A2 3	GGACAUUUGUGUACUCACU	290
	M15077	PPYLUC		UGUUUGUGGACGAAGUACC	291
	BC020308	GAPDH		CCUGGCCAAGGUCAUCCAU	292
	NM_000942	PPIB		GAGAAAGGAUUUGGCUACA	293

Tabla I					
Secuencias utilizadas para los datos de las Figuras 12-14					
FIG.	**Núm. de Acceso**	**Nombre del Gen**	**Denominación**	**Secuencia Diana del ARNip**	**SEQ. ID NO.**
14L					
	NM_001047	SRD5A1	SRD5A1 2	UAACUGCAGCCAACUAUUU	294
	NM_030662	MAP2K2	MAP2K2 3	UCCAGGAGUUUGUCAAUAA	295
	NM_001047	SRD5A1	SRD5A1 1	GCAGAUACUUGAGCCAUUG	296
	NM_001047	SRD5A1	SRD5A1 4	CCGGAAAUUUGAAGAGUAU	297
	NM_000348	SRD5A2	SRD5A2 3	GGACAUUUGUGUACUCACU	298
	NM_001273	CHD4		CAAAGGUGCUGCUGAUGUA	299
	NM_002605	PDE8A		CAAAGAAGAUAACCAAUGU	300
	NM_000455	STK11		GAAACAUCCUCCGGCUGAA	301
Nota: Las secuencias para 14L también están presentes en una forma modificada en la que las posiciones 1 y 2 de las hebras efectora y antisentido contienen grupos 2'-O-metilo y la posición 1 de la hebra antisentido también contiene un grupo fosfato en el carbono 5'.					

Los datos anteriores apoyan la hipótesis de que el ARNip puede inducir toxicidad en un mecanismo independiente de la diana, específico de la secuencia. Los autores de la presente invención realizaron dos experimentos separados para someter a ensayo la dependencia de la toxicidad inducida por ARNip sobre el mecanismo del ARNi. Los resultados de estos experimentos se presentan más abajo y demuestran que la toxicidad está mediada por la ruta del ARNi. Puesto que los experimentos previos demostraron que la toxicidad no estaba asociada con la reducción de la expresión de la diana, se realizó un tercer experimento para determinar si el patrón químico de las modificaciones descrito en la primera realización podría eliminar la toxicidad.

En el primer experimento, se investigó la capacidad del ARNip que contiene un motivo tóxico para inducir muerte celular en circunstancias en las que el mecanismo del RNAi estaba severamente comprometido. Estudios previos revelaron que eIF2C2/hAgo2 es responsable de la escisión del ARNm y que la reducción de la expresión de este producto génico inutiliza severamente esta ruta. Los autores de la presente invención confirmaron este descubrimiento **(Figura 14 a-i)** y a continuación evaluaron la importancia de esta ruta en la toxicidad inducida por ARNip recién descubierta. Para someter a ensayo esto, las células transfectadas con la agrupación (T1) de ARNip eIF2C2/hAgo2 se transfectaron con posterioridad con ARNip tóxico que contenía los motivos AAA/UUU o GCCA/UGG **(Figura 14a,** "Experimento"). Los resultados de estos experimentos demostraron que en ausencia de una ruta de ARNi intacta, los ARNip tóxicos fueron incapaces de inducir el fenotipo de muerte celular (Figura 14j). Puesto que los experimentos paralelos en los que la ruta del ARNi se dejó intacta exhibieron la toxicidad característica de estas secuencias, se concluyó que era necesaria una ruta intacta de ARNi para la toxicidad inducida por ARNip. Este experimento apoya fuertemente la hipótesis de que el ARNip tóxico induce su fenotipo a través de la ruta del ARNi. Puesto que la toxicidad observada no está relacionada con el nivel o el grado de la reducción de la expresión de la diana, es probable que la inespecificidad sea responsable del fenotipo tóxico observado.

El apoyo adicional para la implicación de la vía del ARNi en la toxicidad por el ARNip vino de un experimento en el que el tamaño del dúplex se redujo de 19 pb a 17 pb. Estudios anteriores han demostrado que los dúplex que son más cortos que las secuencias de 19 pb se dirigen a las secuencias de ARNm ineficazmente, muy probablemente debido al hecho de que Dicer y/o RISC fallan en la mediación del ARNi cuando la longitud de la secuencia dúplex cae por debajo de 19bp (Elbashir, S. M. et al. "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells" Nature 2001 May 24; 411(6836):494-8). Cuando la longitud del ARNip tóxico de 19 pb, conocido se redujo en 2 pb (17 pb de longitud total, sin interrupción del motivo) el nivel de toxicidad se redujo drásticamente **(Figura 14k),** lo que sugiere que son necesarios la entrada y/o el procesamiento por RISC para la inducción de toxicidad. Estos resultados implican nuevamente la ruta del ARNi en esta forma de toxicidad celular inducida por ARNip. Dado que la toxicidad observada no está relacionada con el nivel o grado de reducción de la expresión de la diana, es probable que la inespecificidad sea responsable del fenotipo tóxico observado.

Como se señaló anteriormente, se ha demostrado que las modificaciones descritas en la primera realización de la invención eliminan los efectos inespecíficos. Puesto que la toxicidad celular inducida por ARNip es dependiente de

RNAi, pero no está relacionada con la reducción de la expresión de la diana, los autores de la presente invención decidieron someter a ensayo si las modificaciones que eliminan la inespecificidad, anulan la toxicidad celular inducida por ARNip. Para lograr esto, se añadió una variación del patrón de modificación química descrito en la primera realización a los ARNip que se sabe que inducen toxicidad en un mecanismo de dependiente de RNAi. Específicamente, se sintetizó ARNip para que portara las siguientes modificaciones: grupos 2'-O-metilo en las posiciones 1 y 2 de las hebras tanto efectora como antisentido, más un grupo fosfato 5' en el carbono 5 del nucleótido antisentido 5' terminal. Como se muestra en **Figura 14-1,** cuando se transfectaron ocho ARNip tóxicos, no modificados separados (MAP2K2 d3, SRD5A1 d1, d2, SRD5A1 SRD5A1 D4, D3, SRD5A2 PDE8A, STK11 y CHD4) a células, cada uno redujo la viabilidad celular por debajo del 75%. Por el contrario, la modificación química de los ocho dúplex redujo notablemente la toxicidad inducida por ARNip sin alterar significativamente la reducción de la expresión específica de la diana. Estos resultados apoyan firmemente la premisa de que la toxicidad inducida por ARNip inducida por ARNip que contiene AAA/UUU o AMCC/UGGC es el resultado de los efectos inespecíficos. Más importante aún, los resultados presentados aquí sugieren que los fenotipos inducidos inespecíficos pueden ser eliminados mediante la adición de las modificaciones de la invención.

Estos estudios se han ampliado mediante la evaluación de los efectos de los patrones de modificación de la invención en treinta y siete ARNip adicionales que se dirigen a luciferasa (Núm. de Acceso M15077). Específicamente, las secuencias enumeradas en **Tabla II** de más abajo se sintetizaron en los estados tanto modificado (2'-O-metilo en las posiciones 1 y 2 de la hebra efectora, 2'-O-metilo en la posición 2 de la hebra antisentido, fosfato en el carbono 5' del nucleótido 5' terminal de la hebra antisentido) y como no modificado, y se transfectaron a células HeLa (5.000 células por pocillo, ARNip 10 µM, 0,1 microlitros de Lipofectamine 2000 por pocillo). Posteriormente, el nivel de muerte de las células en cada cultivo se midió 72 horas después de la transfección utilizando Azul de Alamar.

Tabla II enumera las secuencias de luc tóxicas que se utilizan en este estudio e incluye (1) la SEC. ID NO. (columna derecha) y (2) la secuencia (columna de la izquierda, 5'→ 3', hebra efectora).

TABLA II	
Paseo con luc - Secuencias Tóxicas	
SECUENCIA	**SEC. ID NO.**
AGAUCCUCAUAAAGGCCAA	302
AGAGAUCCUCAUAAAGGCC	303
AAUCAGAGAGAUCCUCAUA	304
AAAAUCAGAGAGAUCCUCA	305
GAAAAAUCAGAGAGAUCCU	306
GCAAGAAAAAUCAGAGAGA	307
CUCGACGCAAGAAAAAUCA	309
GGAAAACUCGACGCAAGAA	309
CUUACCGGAAAACUCGACG	310
GUCUUACCGGAAAACUCGA	311
AGGUCUUACCGGAAAACUC	312
CGAAAGGUCUUACCGGAAA	313
AAGUACCGAAAGGUCUUAC	314
UGGACGAAGUACCGAAAGG	315
UGUUUGUGGACGAAGUACC	316
UGUGUUUGUGGACGAAGUA	317
GUUGUGUUUGUGGACGAAG	318
UUGCGCGGAGGAGUUGUGU	319
AAAGUUGCGCGGAGGAGUU	320
AGUCAAGUAACAACCGCGA	321

TABLA II	
Paseo con luc - Secuencias Tóxicas	
SECUENCIA	**SEC. ID NO.**
GUCGCCAGUCAAGUAACAA	322
GAUUACGUCGCCAGUCAAG	323
UGGAUUACGUCGCCAGUCA	324
CGUGGAUUACGUCGCCAGU	325
AGAUCGUGGAUUACGUCGC	326
AGAGAUCGUGGAUUACGUC	327
AAAAAGAGAUCGUGGAUUA	328
ACGGAAAAAGAGAUCGUGG	329
UGACGGAAAAAGAGAUCGU	330
GAGCACGGAAAGACGAUGA	331
UGGAGCACGGAAAGACGAU	332
UUUGGAGCACGGAAAGACG	333
GUUUUGGAGCACGGAAAGA	334
UGUUGUUUUGGAGCACGGA	335
CCGUUGUUGUUUUGGAGCA	336
AACUUCCCGCCGCCGUUGU	337
UGAACUUCCCGCCGCCGUU	338

Los resultados de estos estudios se presentan en la **Figura 14m** y muestran (1) en veinticinco de los treinta y siete casos, el nivel de toxicidad se redujo significativamente tras la adición de las modificaciones químicas de la invención, y (2) en veintidós de los veinte casos, el nivel de toxicidad cayó por debajo del nivel de 25% establecido previamente como la línea de discriminación entre transfecciones tóxicas y no tóxicas. Puesto que los estudios adicionales diseñados para comparar la funcionalidad de las secuencias de luc modificadas y no modificadas mostraron actividad comparable en ambos grupos de moléculas **(Figura 14n, c**élulas HEK 293, 20.000 células por pocillo, 0,3 microlitros de Lipofectamina 2000 por pocillo, punto temporal de 72 horas, ARNip 100 nM), estos descubrimientos apoyan firmemente la premisa de que (1) la toxicidad inducida por ARNip provocada por ARNip que contiene AAA/UUU o AMCC/UGGC es el resultado de los efectos inespecíficos, y (2) que los fenotipos inducidos inespecíficos pueden disminuirse o eliminarse en gran medida mediante la adición de las modificaciones de la invención.

Ejemplo 11

Efectos sinérgicos de las modificaciones químicas de la invención y la agrupación sobre eliminación de los efectos inespecíficos

Para evaluar el valor de la combinación de las modificaciones químicas de la invención y la agrupación para eliminar el silenciamiento inespecífico, se sometieron a ensayo cuatro ARNip así como la agrupación respectiva de las moléculas, dirigidos a ciclofilina B (PPIB) humana para determinar los efectos inespecíficos (en las formas tanto modificada como no modificada) utilizando perfilado de la expresión génica basado en micromatrices. Para lograr esto, se sintetizaron primero las secuencias dirigidas a PPIB (véase más abajo) en las formas no modificada y modificada (2'-O-metilo en las posiciones 1 y 2 de la hebra efectora, 2'-O-metilo en la posición 2 de la hebra antisentido, fosfato en el carbono 5' del nucleótido 5' terminal de la hebra antisentido).

Secuencias: hebra efectora

PPIB-1/Cl: 5'-GAAAGAGCAUCUACGGUGA-3' **(SEC. ID NO. 339)**
PPIB -2/C2: 5'-GAAAGGAUUUGGCUACAAA-3' **(SEC. ID NO. 340)**
PPIB -3/C3: 5'-ACAGCAAAUUCCAUCGUGU-3' **(SEC. ID NO. 341)**
PPIB -4/C4: 5'-GGAAAGACUGUUCCAAAAA-3' **(SEC. ID NO. 342)**

Posteriormente, los dúplex se transfectaron a células HeLa humanas (10K células por pocillo de una placa de 96 pocillos, 0,4 µL de lípido Dharmafect 1 por pocillo (Dharmacon, Inc.), concentración de 100 nM. Nota, en el caso de la agrupación, la concentración de cada dúplex fue de 25 nM, por lo tanto la concentración total se mantuvo constante con estudios realizados sobre ARNip individuales). A continuación se recogieron los productos lisados celulares para el análisis de micromatrices (24 horas después de la transfección) y la purificación del ARN total se realizó utilizando columnas RNeasy de Qiagen con digestión con ADNasa en columna. La integridad del ARN se analizó con el ARN 6000 Nano LabChip en Bioanalyzer 2100 de Agilent. Para llevar a cabo los perfiles de expresión génica se llevaron a cabo los siguientes procedimientos: para cada muestra, se amplificaron 650 ng de ARN total y se marcaron con Cy3 o Cy5 (Perkin Elmer) utilizando Low Input RNA Fluorescent Linear Amplification Kit de Agilent. Las hibridaciones se realizaron utilizando Human 1A (V2) Oligo Microarrays de Agilent (http://www.agilent.com). La referencia de hibridación (Cy3) fueron células transfectadas simuladamente o células no transfectadas, según se indique. Los portaobjetos se lavaron y se secaron utilizando 6X y 0.06X SSPE con N-lauroilsarcosina al 0,025%, acetonitrilo puro, y solución de secado y estabilización no acuosa patentada de Agilent. Posteriormente, se exploraron en un Agilent Microarray Scanner (modelo G2505B) y la imagen en bruto se procesó utilizando Feature Extraction (v7.1.1.). El procesamiento de análisis/datos adicional se realizó utilizando Spotfire Decision Site 8.0 y Spotfire Functional Genomics Module. Los genes de señal baja se eliminaron del análisis mediante la aplicación de un corte del Log (señal aditiva de color rojo y verde en píxeles)> 2,8 a partir de los datos de una auto-auto matriz representativa. No se llevó a cabo eliminación de valores atípicos. Se aplicó un punto de corte doble (Razón de Log >0,3 o <-0,3) a los genes utilizados en el análisis comparativo.

Los resultados del análisis del ARNip dirigido a ciclofilina B mostraron que si bien el nivel de reducción de la expresión del gen elegido como diana se mantuvo constante en los dúplex modificados y no modificados (datos no mostrados), en todos los casos la adición del patrón de modificación química de la invención redujo el número de fuera de genes inespecíficos (regulados a la baja más de dos veces) en 50% o más. Para los dúplex C1, C2, C3, y C4, el número de dianas inespecíficas se redujo de 5 → 2, 57 → 23, 12 → 6, y 72 → 21, respectivamente (Nota, en el caso de C2, se cree 17 de las 23 dianas inespecíficas son artefactos experimentales, por lo tanto la reducción en este caso puede ser tan grande como 57 → 6). Estos resultados apoyan los resultados anteriores (véanse las **Figuras 7-11)** que muestran que la adición de las modificaciones de la invención suprimen fuertemente los efectos inespecíficos. La **Figura 15c** muestra que el número de dianas inespecíficas generadas por la agrupación no modificada es menor que la que se pronosticaría a partir de los cuatro ARNip individuales (es decir, la suma de las dianas inespecíficas generadas por cada dúplex = 5 + 57 + 12 + 72 = 146 vs. la agrupación de los cuatro dúplex = 65). Por lo tanto, en este caso, la agrupación por sí misma puede reducir el número de dianas inespecíficas en aproximadamente 55%. Para sorpresa de los autores de la presente invención, se identificaron sólo cuatro dianas inespecíficas utilizando agrupaciones modificadas. En comparación con el número total de dianas inespecíficas observadas en los ARNip individuales, no modificados (146), esto representa una reducción de 97,2% en el número total de dianas inespecíficas. En comparación con el número de dianas inespecíficas observadas en las agrupaciones no modificadas (65), este cambio (65 → 4) representa una reducción neta de 94%. Estos resultados inesperados y sorprendentes demuestran que la combinación de las modificaciones de la invención con las agrupaciones, proporciona una ventaja drástica sorprendente sobre los ARNip individuales o las agrupaciones de ARNip.

Para determinar si los beneficios observados de la combinación de modificaciones químicas con el agrupamiento se limitan a las secuencias dirigidas a ciclofilina B, se sometieron a ensayo ARNip dirigidos a un segundo gen (MEK1 humano, MAP2K1, Núm. de acceso NM_002755) en un formato idéntico. Las secuencias utilizadas en este estudio se muestran a continuación:

MAP2K1-1 (M1): 5'-GCACAUGGAUGGAGGUUCU-3' **(SEQ. ID NO. 343)**
MAP2K1-2 (M2): S'-GCAGAGAGAGCAGAUUUGA-3' **(SEQ. ID NO. 344)**
MAP2K1-4 (M4): 5'-GAGCAGAUUUGAAGCAACU-3' **(SEQ. ID NO. 345)**
MAP2K1-5 (M5): 5'-CCAGAAAGCUAAUUCAUCU-3' **(SEQ. ID NO. 346)**

Como era el caso con la ciclofilina B, la adición de la modificación química de la invención al ARNip dirigido a MAP2K1 no afecta apreciablemente a la reducción de la expresión del gen elegido como diana. Pero como se ha observado previamente, la adición de las modificaciones químicas de la invención al ARNip individual dirigido a MAP2K1 redujo (en todos los casos con la excepción de uno que se sospecha que era un artefacto, es decir M4) el número de genes que eran dianas inespecíficas en dos veces (o más) en 50% o más (85→8, 9→2, 58→32, 15→41 (artefacto), véanse las Figuras **15d-f**). Además, como se observó en estudios previos con PPIB, la agrupación de

dúplex individuales generó menos dianas inespecíficas que el número combinado observado con los ARNip individuales (dianas inespecíficas agrupadas = 26 vs. dianas inespecíficas individuales combinadas = 167). Si bien esto representa una reducción de 85% en el número total de dianas inespecíficas, la combinación de modificaciones químicas con el agrupamiento aumentó de nuevo la especificidad la agrupación sola. Se observó que únicamente dos genes eran regulados a la baja dos veces o más cuando se utilizaron agrupaciones que contenían ARNip dirigido a MAP2K1 modificado. En comparación con los resultados generados con los ARNip no modificados, individuales (167) esto representa una reducción de 98,8% del número de dianas inespecíficas. En comparación con las agrupaciones no modificadas (26 dianas inespecíficas en total), el número de dianas inespecíficas observadas en las agrupaciones modificadas (2) representa una reducción de 92,3% del número total de genes inespecíficos. En conjunto, estos datos demuestran que la combinación de las modificaciones de la invención y la agrupación proporcionó un nivel no obtenible previamente de especificidad en la reducción de la expresión génica. Este aumento de especificidad se observa independientemente del gen elegido como diana y podría reducir enormemente el número de falsos positivos p. ej. en escrutinios de alto rendimiento diseñados para identificar dianas potenciales de fármacos.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> DHARMACON, INC. LEAKE, Devin YURIY, Fedorov REYNOLDS, Angela KHVOROVA, Anastasia MARSHALL, William

<120> Polinucleótidos Modificados para reducir los Efectos de la Inespecificidad en la Interferencia con ARN

<130> 13636PCT

<140> Pendiente de cesión
<141> 2005-03-31

<150> 60/630228<151> 2004-11-22
<150> 11/019831<151> 2004-12-22
<150> PCT/US04/10343
<151> 2004-04-01

<160> 346

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia efectora de ARNip

<400> 1
ugcugaccuc uguuaccuc 19

<210> 2
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia efectora de ARNip

<400> 2
gacaugcgaa ugacacuag 19

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

<220>

<223> Secuencia efectora de ARNip

<400> 3
ccuacagaga acugcgguu 19

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

<220>

<223> Secuencia efectora de ARNip

<400> 4
agcugaccuc uguuaccuc 19

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

<220>

<223> Secuencia efectora de ARNip

<400> 5
ccuacagaga acugcgguu 19

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

<220>

<223> Secuencia efectora de ARNip

<400> 6
gucaucagcu uugugccac 19

<210> 7
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia efectora de ARNip

<400> 7
gacaugcgaa ugacacuag 19

<210> 8
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia efectora de ARNip

<400> 8
agaggaacuc ucugcaagc 19

<210> 9
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia efectora de ARNip

<400> 9
uggaggggaa ugcucagaa 19

<210> 10
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia efectora de ARNip

<400> 10
uaaagauggc acuuucccg 19

<210> 11
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia efectora de ARNip

<400> 11
ugcugaccuc uguuaccuc 19

<210> 12
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia efectora de ARNip

<400> 12
gcucacgguc auuaccgag 19

<210> 13
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia efectora de ARNip

<400> 13
ccuacagaga acugcgguu 19

<210> 14
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia efectora de ARNip

<400> 14
ggcuuccuua caaggagau 19

<210> 15
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia efectora de ARNip

<400> 15
ccuacagaga acugcgguu 19

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

<220>

<223> Secuencia efectora de ARNip

<400> 16
cgggucuugu guccuucaa 19

<210> 17
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia efectora de ARNip

<400> 17
gucaucagcu uugugccac 19

<210> 18
<211> 4
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencias del bucle de ARNip

<400> 18
uucg 4

<210> 19
<211> 9
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencias del bucle de ARNip

<400> 19
uuuguguag 9

<210> 20
<211> 10
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencias del bucle de ARNip

<400> 20
cuuccuguca 10

<210> 21
<211> 7
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencias del bucle de ARNip

<400> 21
auaugug 7
<210> 22
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> hebra efectora de ARNip

<400> 22
gugauguaug ucagagaguu u 21

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

<220>

<223> hebra efectora de ARNip

<400> 23
gaaaaaucag agagauccu 19

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

<220>

<223> hebra efectora de ARNip

<400> 24
uaccggaaaa cucgacgca 19

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

<220>

<223> hebra efectora de ARNip

<400> 25
acgucgccag ucaaguaac 19

<210> 26
<211> 19

<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> hebra efectora de ARNip

<400> 26
gauuacgucg ccagucaag 19

<210> 27
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> hebra efectora de ARNip
<400> 27
agagaucgug gauuacguc 19

<210> 28
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> hebra efectora de ARNip

<400> 28
uguuguuuug gagcacgga 19

<210> 29
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> hebra efectora de ARNip

<400> 29
ccuacagaga acugcgguu 19

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

<220>

<223> hebra efectora de ARNip

<400> 30
ggcuuccuua caaggagau 19

<210> 31
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> hebra efectora de ARNip

<400> 31
cgggucuugu guccuucaa 19

<210> 32
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 32

acgggcaagg ccaaguggg 19

<210> 33
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip
<400> 33

cgggcaaggc caaguggga 19

<210> 34
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 34
gggcaaggcc aaguggggau 19

<210> 35
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 35
ggcaaggcca agugggaug

<210> 36
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 36

gcaaggccaa gugggaugc 19

<210> 37
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 37
caaggccaag ugggaugcc 19

<210> 38
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 38
aaggccaagu gggaugccu 19

<210> 39
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 39
aggccaagug ggaugccug 19

<210> 40
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 40
ggccaagugg gaugccugg 19

<210> 41
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 41
gccaaguggg augccugga 19

<210> 42
<211> 19

<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 42
ccaaguggga ugccuggaa 19

<210> 43
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 43
caagugggau gccuggaau 19

<210> 44
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 44
aagugggaug ccuggaaug 19

<210> 45
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 45
agugggaugc cuggaauga 19

<210> 46
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 46
gugggaugcc uggaaugag 19

<210> 47
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 47
ugggaugccu ggaaugagc 19

<210> 48
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 48
gggaugccug gaaugagcu 19

<210> 49
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 49
ggaugccugg aaugagcug 19

<210> 50
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 50
raugccugga augagcuga

<210> 51
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 51
augccuggaa ugagcugaa 19

<210> 52
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 52
ugccuggaau gagcugaaa 19

<210> 53
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 53
gccuggaaug agcugaaag 19

<210> 54
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 54
ccuggaauga gcugaaagg 19

<210> 55
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 55
cuggaaugag cugaaaggg 19

<210> 56
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 56
uggaaugagc ugaaaggga 19

<210> 57
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 57
ggaaugagcu gaaagggac 19

<210> 58
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 58
gaaugagcug aaagggacu 19

<210> 59
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 59
aaugagcuga aagggacuu 19

<210> 60
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 60
augagcugaa agggacuuc 19

<210> 61
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 61
ugagcugaaa gggacuucc 19

<210> 62
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 62
gagcugaaag ggacuucca 19

<210> 63
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 63
agcugaaagg gacuuccaa 19

<210> 64
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 64
gcugaaaggg acuuccaag 19

<210> 65
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 65
cugaaaggga cuuccaagg 19

<210> 66
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 66
ugaaagggac uuccaagga 19

<210> 67
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 67
gaaagggacu uccaaggaa 19

<210> 68
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 68
aaagggacuu ccaaggaag 19

<210> 69

<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 69
aagggacuuc caaggaaga 19

<210> 70
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 70
agggacuucc aaggaagau 19

<210> 71
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 71
gggacuucca aggaagaug 19

<210> 72
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 72
ugacuuccaa ggaagaugc 19

<210> 73
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 73
gacuuccaag gaagaugcc 19

<210> 74
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 74
acuuccaagg aagaugcca 19

<210> 75
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 75
cuuccaagga agaugccau 19

<210> 76
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 76
uuccaaggaa gaugccaug 19

<210> 77
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 77
uccaaggaag augccauga 19

<210> 78
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 78
ccaaggaaga ugccaugaa 19

<210> 79
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 79

caaggaagau gccaugaaa 19
<210> 80
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 80
aaggaagaug ccaugaaag 19

<210> 81
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 81
aggaagaugc caugaaagc 19

<210> 82
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 82
ggaagaugcc augaaagcu 19

<210> 83
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 83
gaagaugcca ugaaagcuu 19

<210> 84
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 84
aagaugccau gaaagcuua 19

<210> 85
<211> 19
<212> ARN

<213> Secuencia Artificial
<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 85
agaugccaug aaagcuuac 19

<210> 86
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 86
gaugccauga aagcuuaca 19

<210> 87
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 87
augccaugaa agcuuacau 19

<210> 88
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 88
ugccaugaaa gcuuacauc 19

<210> 89
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 89
gccaugaaag cuuacauca 19

<210> 90
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 90
ccaugaaagc uuacaucaa 19

<210> 91
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 91
caugaaagcu uacaucaac 19

<210> 92
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 92
augaaagcuu acaucaaca 19

<210> 93
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 93
ugaaagcuua caucaacaa 19

<210> 94
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 94
gaaagcuuac aucaacaaa 19

<210> 95
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 95
aaagcuuaca ucaacaaag 19

<210> 96
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 96
aagcuuacau caacaaagu 19

<210> 97
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 97
agcuuacauc aacaaagua 19

<210> 98
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 98
gcuuacauca acaaaguag 19

<210> 99
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 99
cuuacaucaa caaaguaga 19

<210> 100
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 100
uuacaucaac aaaguagaa 19

<210> 101
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 101
uacaucaaca aaguagaag 19

<210> 102
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 102
acaucaacaa aguagaaga 19

<210> 103
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 103
caucaacaaa guagaagag 19

<210> 104
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 104
aucaacaaag uagaagagc 19

<210> 105
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 105
ucaacaaagu agaagagcu 19

<210> 106
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 106
caacaaagua gaagagcua 19

<210> 107
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 107
aacaaaguag aagagcuaa 19

<210> 108
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 108
acaaaguaga agagcuaaa 19

<210> 109
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 109
caaaguagaa gagcuaaag 19

<210> 110
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 110
aaaguagaag agcuaaaga 19

<210> 111
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 111
aaguagaaga gcuaaagaa 19

<210> 112
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 112
aguagaagag cuaaagaaa 19

<210> 113
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 113
guagaagagc uaaagaaaa 19

<210> 114
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 114
uagaagagcu aaagaaaaa 19

<210> 115
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 115
agaagagcua aagaaaaaa 19

<210> 116
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 116
gaagagcuaa agaaaaaau 19

<210> 117
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 117
aagagcuaaa gaaaaaaua 19

<210> 118
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 118
agagcuaaag aaaaaauac 19

<210> 119
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 119
gagcuaaaga aaaaauacg 19

<210> 120
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 120
agcuaaagaa aaaauacgg 19

<210> 121
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 121
gcuaaagaaa aaauacggg 19

<210> 122
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 122
gaaguacauc cauuauaag 19

<210> 123
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 123
aaacagaucu uuacaagcu 19

<210> 124
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 124
uuucaagugu cuccuaaua 19

<210> 125
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 125
gcaaagaaca ucauccaua 19

<210> 126
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 126
gcagagagag cagauuuga 19

<210> 127
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 127
ucaaggaacu cgaucguau 19

<210> 128
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 128
gacaugaaau ccaacaaua 19

<210> 129
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 129

ucaagugucu ccuaauaug 19

<210> 130
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 130
caaagacgau gacuucgaa 19

<210> 131
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 131
ggaagcugau ccaccuuga 19

<210> 132
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 132
caagaggauu gaaguagaa 19

<210> 133
<211> 19
<212> ARN

<213> Secuencia Artificial
<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 133
ccaaagcucu ggacuuauu

<210> 134
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 134
guacgacaac cgggagaua 19

<210> 135
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 135
agauagugau gaaguacau 19

<210> 136
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 136
gggagauagu gaugaagua 19

<210> 137
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 137
gaaaugauug cacuauuga 19

<210> 138
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 138
gcacggagau guugcagua 19

<210> 139
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 139
gcuacuaucu gauuuacug 19

<210> 140
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 140
caagggaggu uacaccaaa 19

<210> 141
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 141
gagguucucu ggaucaagu 19

<210> 142
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 142
gcuacacgca guugcagua 19

<210> 143
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 143
agacugaccu guacaaguu 19

<210> 144
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 144
gaucagcauu ugcauggaa 19

<210> 145
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 145
ggaacucgau cguaucauu 19

<210> 146
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 146
cgacaagacu gccgagaga 19

<210> 147
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 147
gagccuuacu gccuuugua 19

<210> 148
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 148
cugaagaaag cauugacua 19

<210> 149
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 149
ggccggaggc gcuuuacua 19

<210> 150
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 150
guacagggcu ccagaaauu 19

<210> 151
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 151
ucgacgcagu ggacauuaa 19

<210> 152
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 152
aacuagaagu auguugcua 19

<210> 153
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 153
gaccggaugu uaaccuuua 19

<210> 154
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 154
uugggugucu ucuuauuua 19

<210> 155
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 155
aauggcuuug aaucuuugg 19

<210> 156
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> SIARN target sequence

<400> 156
gcacauggau ggagguucu 19

<210> 157
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 157
ggauucaguu ggagugauu 19

<210> 158
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 158
caaagaacau cauccauag 19

<210> 159
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 159
gaaagccuau gccacuguu 19

<210> 160
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 160
gcuaugcccu ggccacuug 19

<210> 161
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 161
gagcagauuu gaagcaacu 19

<210> 162
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 162
uaacugcagc caacuauuu 19

<210> 163
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 163
auguuuacua ccaaaugga 19

<210> 164
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 164
uccaggaguu ugucaauaa 19

<210> 165
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 165
gcagauacuu gagccauug 19

<210> 166
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 166
gaaacuaccu acagucucu 19

<210> 167
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 167
ccggaaauuu gaagaguau 19

<210> 168
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 168
gaacaccgag ugccaagaa 19

<210> 169
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 169
ggacauuugu guacucacu 19

<210> 170
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 170
gcacauggau ggagguucu 19

<210> 171
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 171
gcagagagag cagauuuga 19

<210> 172
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 172
gagguucucu ggaucaagu 19

<210> 173
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 173
gagcagauuu gaagcaacu 19

<210> 174
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 174
caaagacgau gacuucgaa 19

<210> 175
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 175
gaucagcauu ugcauggaa 19

<210> 176
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 176
uccaggaguu ugucaauaa 19

<210> 177
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 177
ggaagcugau ccaccuuga 19

<210> 178
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 178
uccaggaguu ugucaauaa 19

<210> 179
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 179
gcagauacuu gagccauug 19

<210> 180
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 180
ccggaaauuu gaagaguau 19

<210> 181
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 181
ggacauuugu guacucacu 19

<210> 182
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 182
gaaacgagau uccuucauc 19

<210> 183
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 183
caagaucggu uuuggcaua 19

<210> 184
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 184
caaacaaucu gugacuauu 19

<210> 185
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 185
caacuuguuu gacgacgaa 19

<210> 186
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 186
gaaaggauuu ggcuacaaa 19

<210> 187
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 187
gagcauguuu acaacguuu 19

<210> 188
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 188
ggaaagacug uuccaaaaa 19

<210> 189
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 189
acauuuacau ucucuugga 19

<210> 190
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 190
gaaagagcau cuacgguga 19

<210> 191
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

400> 191
acaaggagau uuauaccua 19

<210> 192
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 192
aggaacauuu ggagaguua 19

<210> 193
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 193
caucguuuau agagacuua 19

<210> 194
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

400> 194
gaaaguaagc agaaucuau 19

<210> 195
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 195
aaccaacggu uuacgucua 19

<210> 196
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 196
gaaagacaag agaccaaua 19

<210> 197
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 197
caacagcgau uuuaggaua 19

<210> 198
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 198
ggaaacagcu gcucauuca 19

<210> 199
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 199
acauuuggcu gugauggua 19

<210> 200
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 200
gaaacuacaa cuuacauga 19

<210> 201
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 201
gaagaagaaa accuacuuu 19

<210> 202
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 202
agaauuugcg auguacuua 19

<210> 203
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 203
agguuugcuu gauguuaca 19

<210> 204
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 204
cgaaaggucu uaccggaaa 19

<210> 205
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 205
caaagaguau gucgaauca 19

<210> 206
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 206
aaggaaagcu gacugauaa 19

<210> 207
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 207
caucaaagcu gccauggaa 19

<210> 208
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 208
cagcauuuaa cgucauaug 19

<210> 209
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 209
auugcguuua cacuuacag 19

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

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 210
gaucaaaggu uuucacuaa 19

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

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 211
caaaccagcg cgcuaauga 19

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

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 212
caaacagcgu cuccuggaa 19

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

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 213
gaaagcauau acagcaauu 19

<210> 214
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 214
caaagaagau aaccaaugu 19

<210> 215
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 215
gaaacauccu ccggcugaa 19

<210> 216
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 216

gagcagauuu uaagaguaa

<210> 217
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 217
ggacaauuuu gcagcaaca 19

<210> 218
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

400> 218
caaaggugcu gcugaugua 19

<210> 219
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 219
acaucauuua cggcaugua 19

<210> 220
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 220
ccacaccgcu ggccaagaa 19

<210> 221
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 221
uaucaagccu gccaauaug 19

<210> 222
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 222
ucaauaagcc aucuucuaa 19

<210> 223
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 223
gagcuaaucu gccacauug 19

<210> 224
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 224
cgaaggcggu ggccaauca 19

<210> 225
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 225
gcacauccgu uggccauca 19

<210> 226
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 226
gccaggcaau gaacaggaa 19

<210> 227
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 227
ggaagccagc gcucaauug 19

<210> 228
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 228
gcgagccacu ggugcugaa 19

<210> 229
<211> 19
<212> ARN

<213> Secuencia Artificial
<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 229
ccaccuccgu ugccauaug 19

<210> 230
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 230
gaaggacucu agccaguua 19

<210> 231
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 231
gaccacaccu ugccaucaa 19

<210> 232
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

400> 232
gcaguuacca gugccaaua 19

<210> 233
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 233
ggacgccaau gaccuagaa 19

<210> 234
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 234
gaacuaugcu gccaugaag 19

<210> 235
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 235
caucaaagcu gccauggaa 19

<210> 236
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 236
agacauugcu gccacagua 19

<210> 237
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 237
ggccaguucu acgucauga 19

<210> 238
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 238
gccaggagcu gaacauuaa 19

<210> 239
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> SIARN target sequence

<400> 239J

cacguccgcu caagagugu 19

<210> 240
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 240
uaacaaugcu gggaauuca 19

<210> 241
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 241
agacagagcu ugagaauaa 19

<210> 242
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 242
uguugcagcu uccuacuuc 19

<210> 243
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 243
gaccaaggcu uacugaaua 19

<210> 244
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 244
cauaguuggu gaagacaua 19

<210> 245
<211> 19
<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 245
gagcuccacu ucaaugaga 19

<210> 246
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 246
gaacagaagu uacguuguc 19

<210> 247
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 247
caccuggacu ccuaugaga 19

<210> 248
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 248
cuacaacugu ccuaaccca 19

<210> 249
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 249
cuacacaauu gucacauua 19

<210> 250
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

400> 250
ugaggaggcu gaguaauuc 19

<210> 251
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 251
ccacagaacu caugaacau 19

<210> 252
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 252
ucaacuucau cacugagua 19

<210> 253
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 253
cgucagagcu ucuccguaa 19

<210> 254
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 254
cguagccgcu gccuaugua 19

<210> 255
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 255
acagcgacgu guucucuga 19

<210> 256
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 256
cagaaggccu cgaaucuca 19

<210> 257
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 257
gcucaaggcu ggugaugug 19

<210> 258
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 258
gaugacauac agccuauca 19

<210> 259
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 259
uuuauucgau uccucguua 19

<210> 260
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 260
ucgaguggau gauguaaua 19

<210> 261
<211> 19
<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Análisis de diagnóstico de ARNip para Secuencia Diana de ARNip

<400> 261
aggaucugca uagagucuu 19

<210> 262
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 262
caaccuggau ggugacaug 19

<210> 263
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 263
ugaagaacgg uaccagaug 19

<210> 264
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 264
gugagacagu gacggauua 19

<210> 265
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 265
acgaacaggu gaugcacua 19

<210> 266
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 266
aauaaugaau ggacgacuu 19

<210> 267
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 267
gaugaccugu ccauagaug 19

<210> 268
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 268
ucuaugaccu guccaagga 19

<210> 269
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 269
auacagaucu ggucgaguu 19

<210> 270
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 270
cauauugacu uccuguauu 19

<210> 271
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 271
gcaaagaccc caacgagaa 19

<210> 272
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 272
gcacggaagu ccaucugaa 19

<210> 273
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 273
gcaggacaaa gauguauua 19

<210> 274
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 274
gggucugugg ugauaaaua 19

<210> 275
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 275
guaugagaac ccaauguca 19

<210> 276
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 276
gcacggaagu ccaucugaa 19

<210> 277
<211> 19
<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 277
gcaggacaaa gauguauua 19

<210> 278
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 278
gggucugugg ugauaaaua 19

<210> 279
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 279
guaugagaac ccaauguca 19

<210> 280
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 280
auguuuacua ccaaaugga 19

<210> 281
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 281
uaacugcagc caacuauuu 19

<210> 282
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 282
uccaggaguu ugucaauaa 19

<210> 283
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 283
gcagauacuu gagccauug 19

<210> 284
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 284
ccggaaauuu gaagaguau

<210> 285
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 285
auguuuacua ccaaaugga 19

<210> 286
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 286
uaacugcagc caacuauuu 19

<210> 287
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 287
uccaggaguu ugucaauaa 19

<210> 288
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 288
gcagauacuu gagccauug 19

<210> 289
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 289
ccggaaauuu gaagaguau 19

<210> 290
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 290
ggacauuugu guacucacu 19

<210> 291
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 291
uguuugugga cgaaguacc 19

<210> 292
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 292
ccuggccaag gucauccau 19

<210> 293
<211> 19
<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 293
gagaaaggau uuggcuaca 19

<210> 294
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

400> 294
uaacugcagc caacuauuu 19

<210> 295
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 295
uccaggaguu ugucaauaa 19

<210> 296
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 296
gcagauacuu gagccauug 19

<210> 297
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 297
ccggaaauuu gaagaguau 19

<210> 298
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 298
ggacauuugu guacucacu 19

<210> 299
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 299
caaaggugcu gcugaugua

<210> 300
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 300
caaagaagau aaccaaugu 19

<210> 301
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana de ARNip

<400> 301
gaaacauccu ccggcugaa 19

<210> 302
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 302
agauccucau aaaggccaa 19

<210> 303
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 303
agagauccuc auaaaggcc 19

<210> 304
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 304
aaucagagag auccucaua 19

<210> 305
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 305
aaaaucagag agauccuca 19

<210> 306
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 306
gaaaaaucag agagauccu 19

<210> 307
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>

<223> SiARN sensestrand

<400> 307
gcaagaaaaa ucagagaga 19

<210> 308
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 308
cucgacgcaa gaaaaauca 19

<210> 309
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 309
ggaaaacucg acgcaagaa 19

<210> 310
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 310
cuuaccggaa aacucgacg 19

<210> 311
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 311
gucuuaccgg aaaacucga 19

<210> 312
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 312
aggucuuacc ggaaaacuc 19

<210> 313
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 313
cgaaaggucu uaccggaaa 19

<210> 314
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 314
aaguaccgaa aggucuuac 19
<210> 315
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 315
uggacgaagu accgaaagg 19

<210> 316
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 316
uguuugugga cgaaguacc 19

<210> 317
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 317
uguguuugug gacgaagua 19

<210> 318
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 318
guuguguuug uggacgaag 19

<210> 319
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 319
uugcgcggag gaguugugu 19

<210> 320
<211> 19

<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 320
aaaguugcgc ggaggaguu 19

<210> 321
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 321
agucaaguaa caaccgcga 19

<210> 322
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> hebra efectora de ARNip

<400> 322
gucgccaguc aaguaacaa 19

<210> 323
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 323
gauuacgucg ccagucaag 19

<210> 324
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 324
uggauuacgu cgccaguca 19

<210> 325
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 325
cguggauuac gucgccagu 19

<210> 326
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 326
agaucgugga uuacgucgc 19

<210> 327
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 327
agagaucgug gauuacguc 19

<210> 328
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 328
aaaaagagau cguggauua 19

<210> 329
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 329
acggaaaaag agaucgugg 19

<210> 330
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 330
ugacggaaaa agagaucgu 19

<210> 331
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 331
gagcacggaa agacgauga 19

<210> 332
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 332
uggagcacgg aaagacgau 19

<210> 333
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 333
uuuggagcac ggaaagacg 19

<210> 334
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 334
guuuuggagc acggaaaga 19

<210> 335
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 335
uguuguuuug gagcacgga 19

<210> 336
<211> 19
<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 336
ccguuguugu uuuggagca 19

<210> 337
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 337
aacuucccgc cgccguugu 19

<210> 338
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 338
ugaacuuccc gccgccguu 19

<210> 339
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 339
gaaagagcau cuacgguga 19

<210> 340
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 340
gaaaggauuu ggcuacaaa 19

<210> 341
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 341
acagcaaauu ccaucgugu 19

<210> 342
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 342
ggaaagacug uuccaaaaa 19

<210> 343
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 343
gcacauggau ggagguucu 19

<210> 344
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 344
gcagagagag cagauuuga 19

<210> 345
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 345
gagcagauuu gaagcaacu 19

<210> 346
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Hebra efectora de ARNip

<400> 346
ccagaaagcu aauucaucu 19

REIVINDICACIONES

1. Un ARNip de doble hebra que comprende:

i. a hebra efectora que comprende
a. un primer nucleótido efector terminal 5', en donde dicho primer nucleótido efector terminal 5' comprende una primera modificación 2'-O-alquilo, y
b. un segundo nucleótido efector terminal 5', en donde dicho segundo nucleótido efector terminal 5' comprende una segunda modificación 2'-O-alquilo; y
ii. una hebra antisentido que comprende
a. un primer nucleótido antisentido terminal 5', en donde dicho primer nucleótido antisentido terminal 5' tiene uno o más grupos fosfato anclados al carbono 5' de su radical azúcar, y
b. un segundo nucleótido antisentido terminal 5', en donde dicho segundo nucleótido antisentido terminal 5' comprende una tercera modificación 2'-O-alquilo,

en donde dicha hebra efectora y dicha hebra antisentido son capaces de formar un dúplex de 18-19 pares de bases de nucleótidos que tiene una complementariedad de 100% a lo largo del intervalo del dúplex, y dentro de dicho dúplex dicho primer nucleótido efector terminal 5' es el nucleótido más 5' de la hebra efectora, dicho segundo nucleótido efector terminal 5' es inmediatamente adyacente y está aguas abajo del primer nucleótido efector terminal 5', dicho primer nucleótido antisentido terminal 5' es el nucleótido más 5' de la hebra antisentido y dicho segundo nucleótido antisentido terminal 5' es inmediatamente adyacente y está aguas abajo del primer nucleótido antisentido terminal 5', en donde todos los nucleótidos de la hebra efectora y la hebra antisentido distintos de dicho primer nucleótido efector terminal 5', dicho segundo nucleótido efector terminal 5', y dicho segundo nucleótido antisentido terminal 5' comprenden un 2'-OH.

2. El ARNip de doble hebra de la reivindicación 1, en donde dicha primera modificación 2'-O-alquilo comprende 2'-O-metilo, dicha segunda modificación 2'-O-alquilo comprende 2'-O-metilo, y dicha tercera modificación 2'-O-alquilo comprende 2'-O- metilo.

3. El ARNip de doble hebra de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un saliente 3' de 1 a 6 bases en al menos una de dicha hebra efectora y dicha hebra antisentido.

4. Un ARNip de doble hebra como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en el tratamiento del organismo humano o animal mediante terapia o para su uso en un método de diagnóstico que se pone en práctica en el organismo humano o animal.

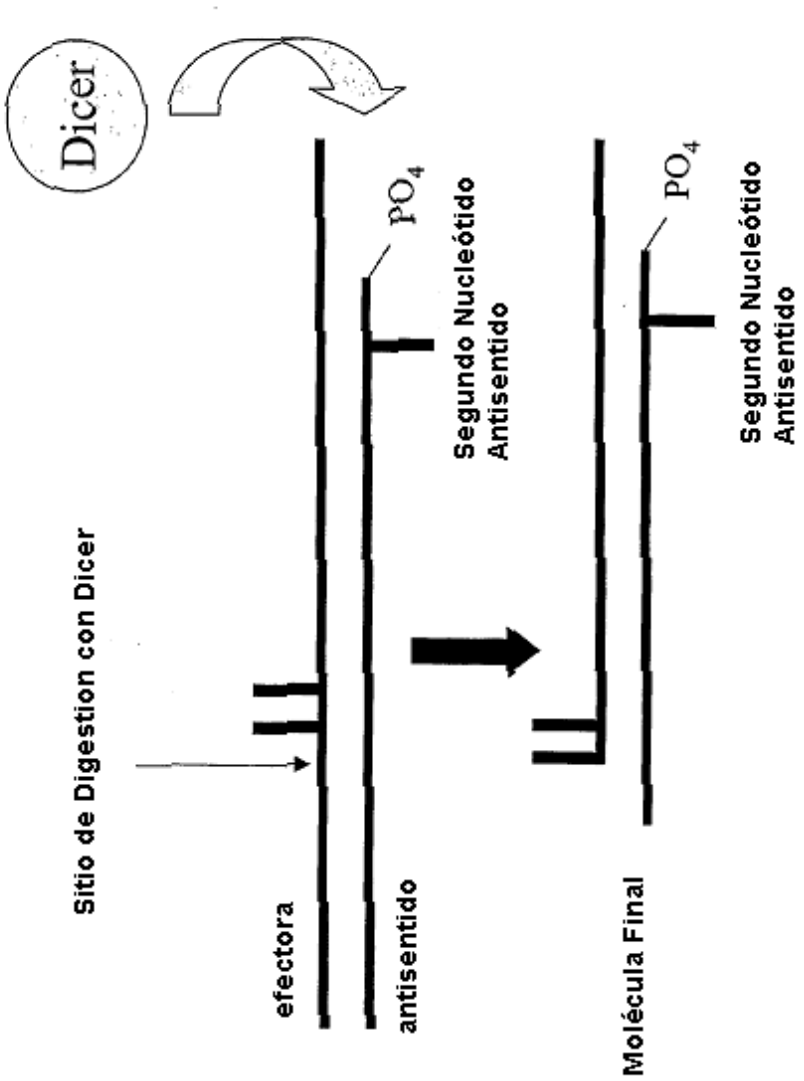
Dicer
Sitio de Digestion con Dicer
efectora
antisentido
PO_4
Segundo Nucleótido Antisentido
Molécula Final
PO_4
Segundo Nucleótido Antisentido

FIG. 1A

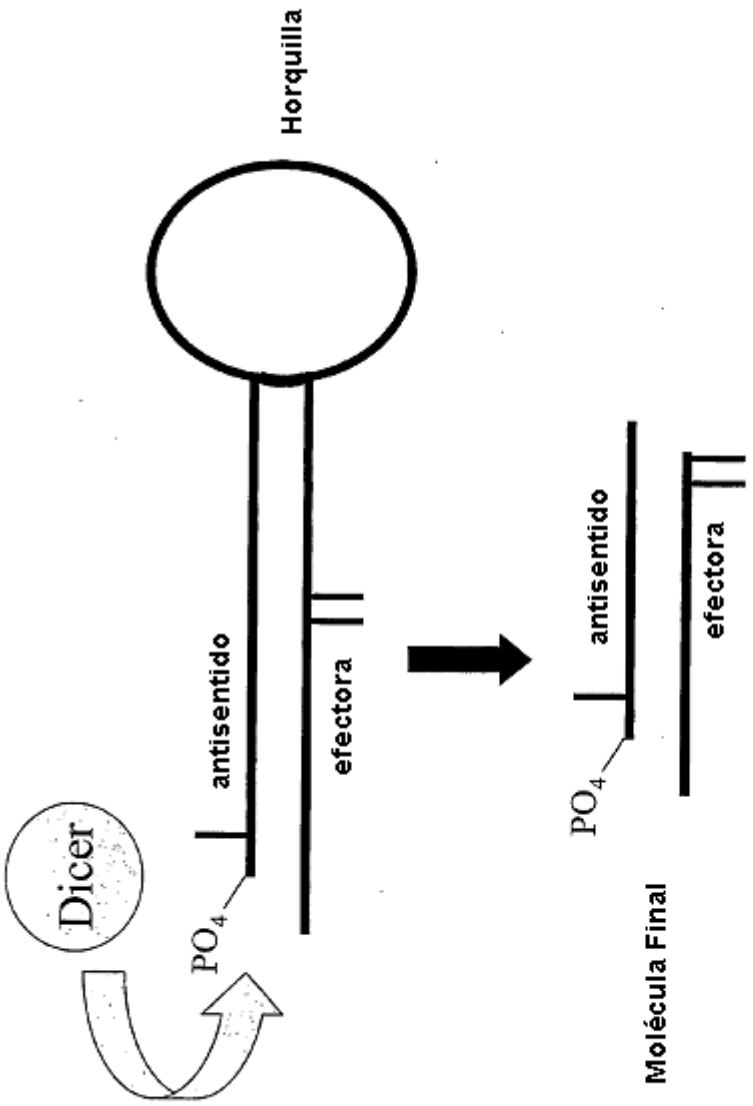
Dicer
PO4
antisentido
efectora
Horquilla
PO4
antisentido
efectora
Molécula Final

FIG. 2

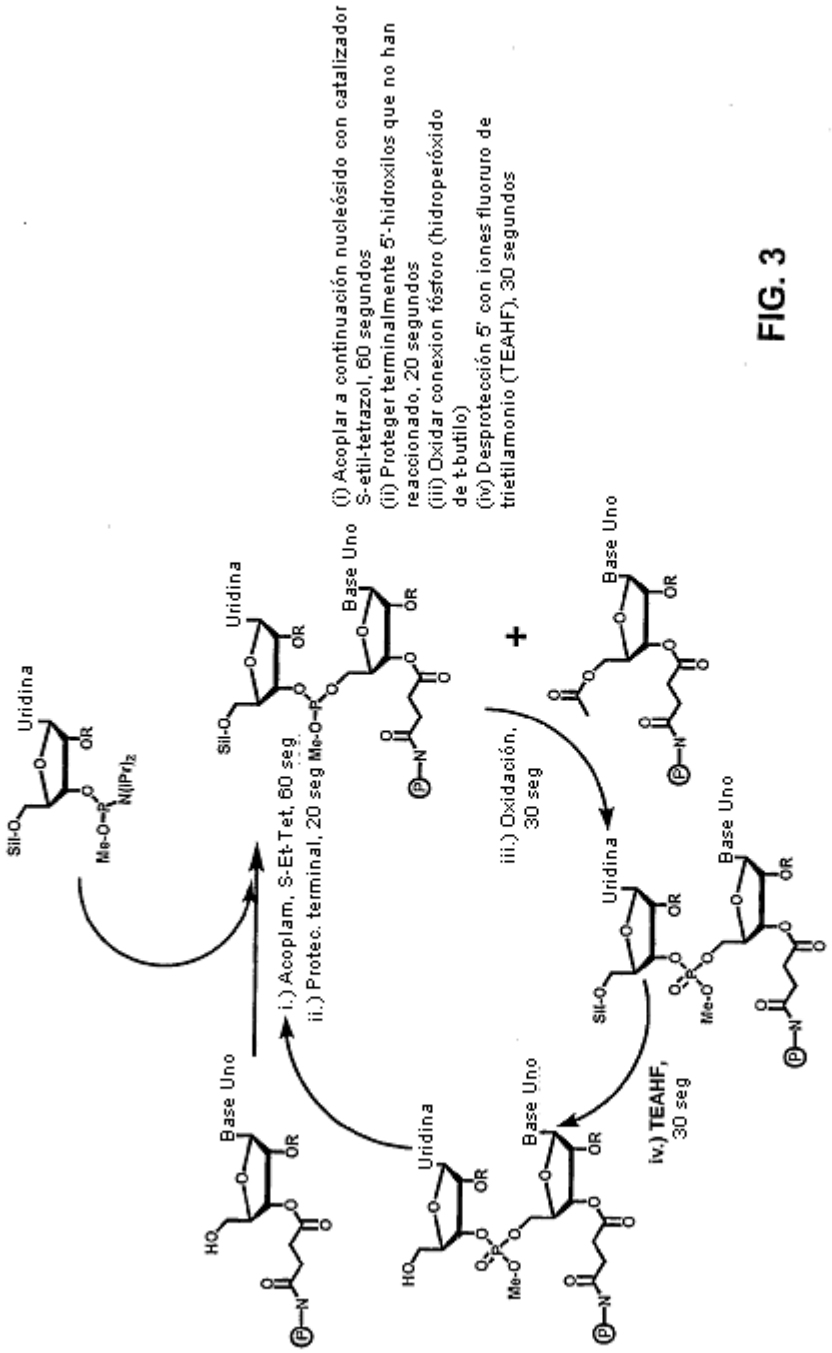
(i) Acoplar a continuación nucleósido con catalizador S-etil-tetrazol, 60 segundos
(ii) Proteger terminalmente 5'-hidroxilos que no han reaccionado, 20 segundos
(iii) Oxidar conexion fósforo (hidroperóxido de t-butilo)
(iv) Desprotección 5' con iones fluoruro de trietilamonio (TEAHF), 30 segundos
Uridina
Base Uno
i.) Acoplam. S-Et-Tet, 60 seg
ii.) Protec. terminal, 20 seg
iii.) Oxidación, 30 seg
iv.) TEAHF, 30 seg

FIG. 3

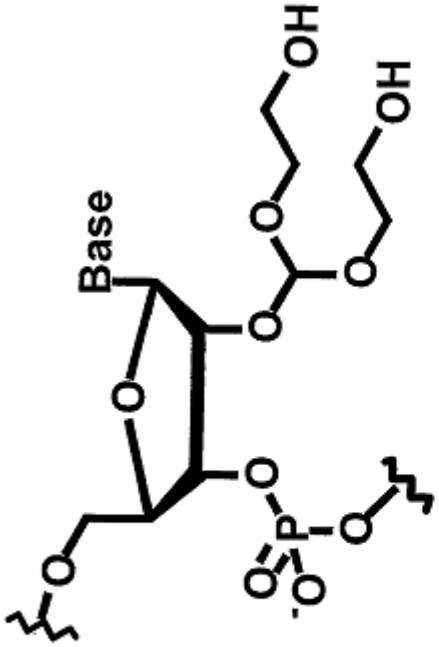

FIG. 4

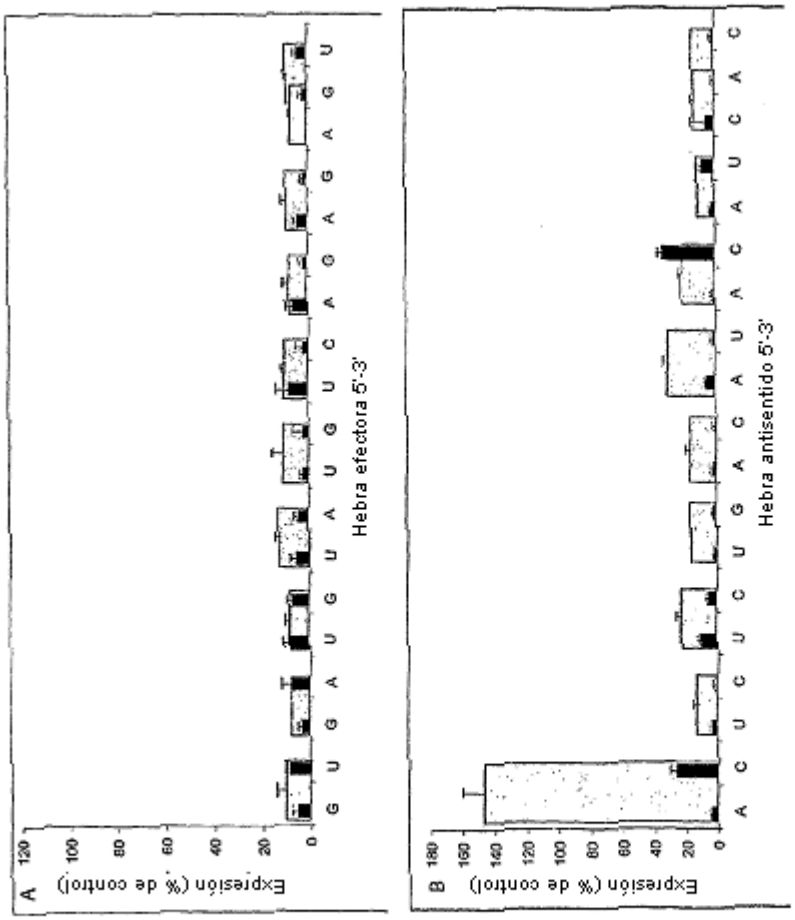
A
Expresión (% de control)
120
100
80
60
40
20
0
G U G A U G U A U G U C A G A G A G U
Hebra efectora 5'-3'
B
Expresión (% de control)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
A C U C U C U G A C A U A C A U C A C
Hebra antisentido 5'-3'

FIG. 5

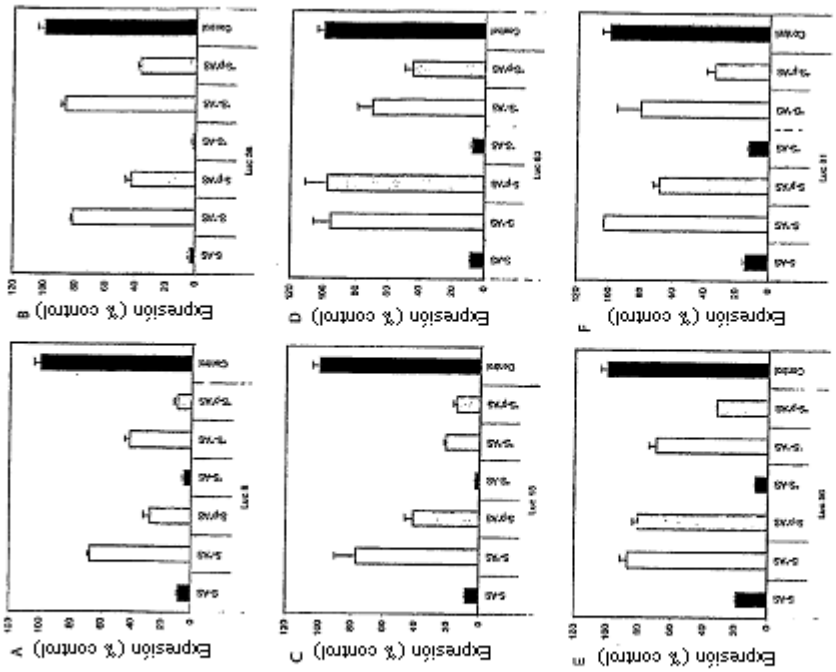

FIG. 6

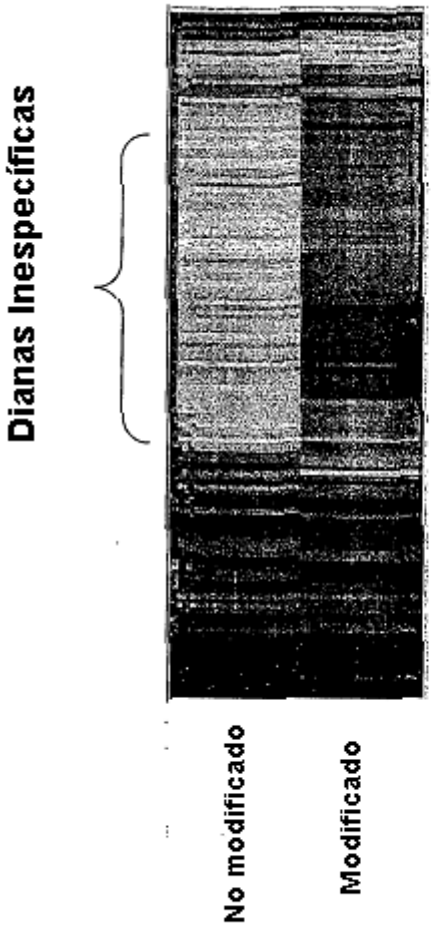

FIG. 7

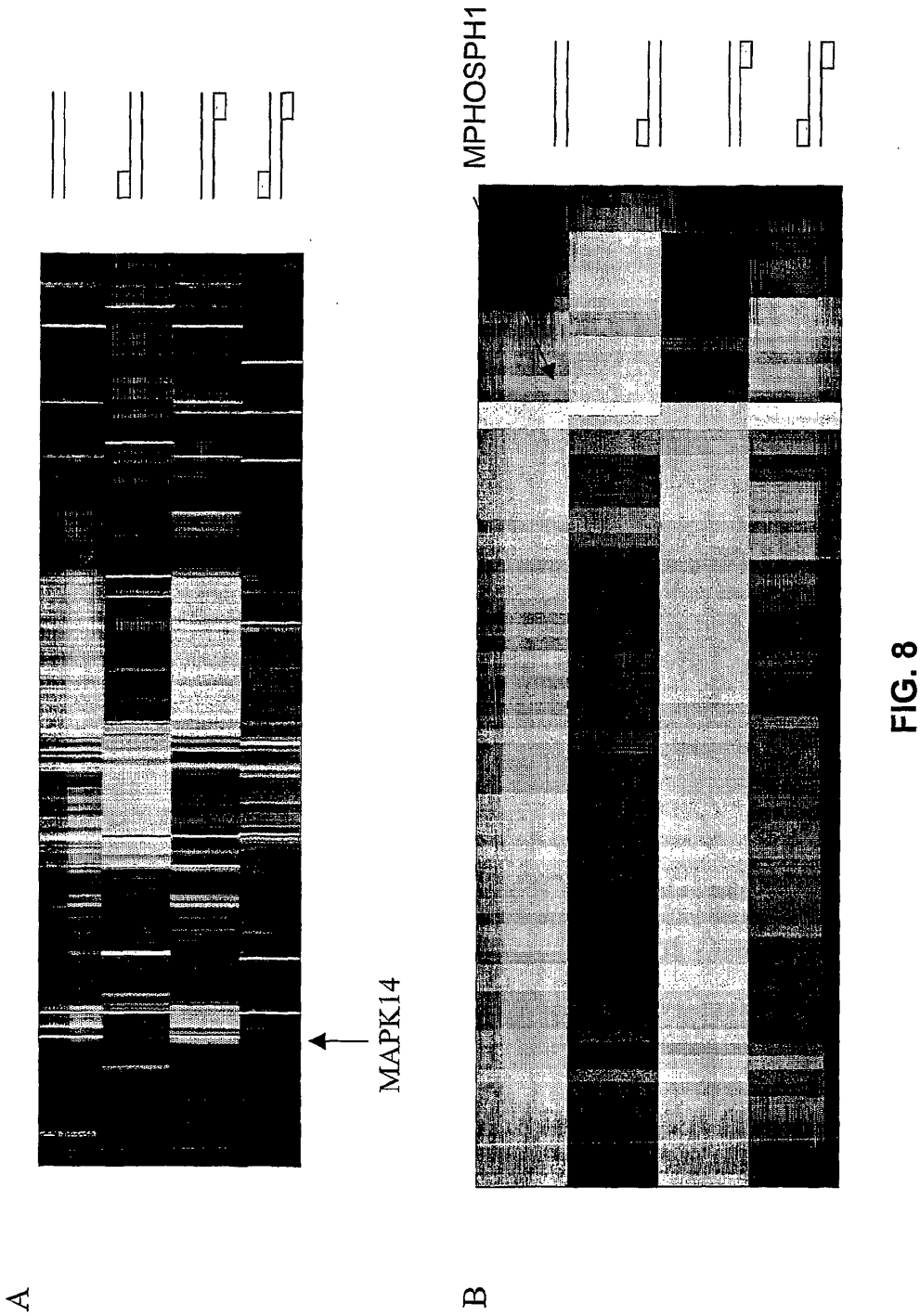

FIG. 8

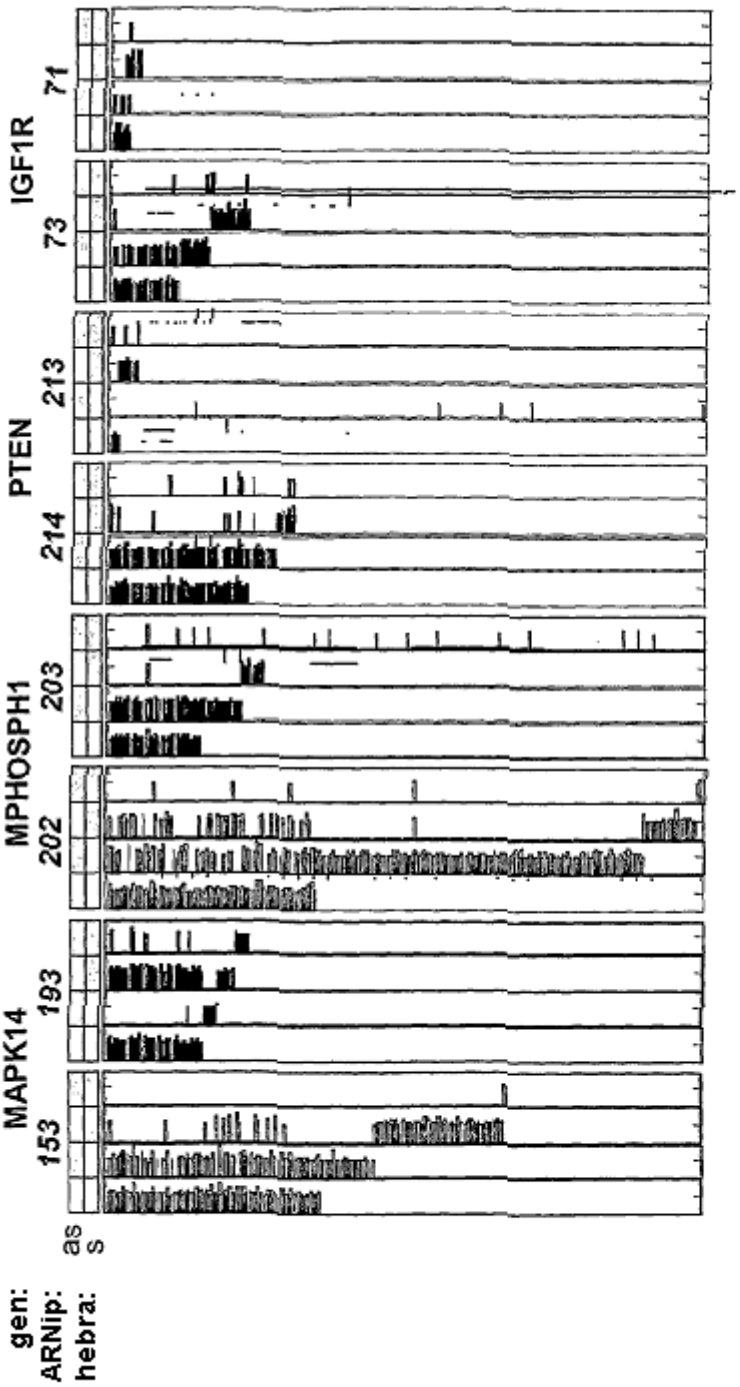
gen:
ARNip:
hebra:
as
s
MAPK14
153
193
MPHOSPH1
202
203
PTEN
214
213
IGF1R
73
71

FIG. 9

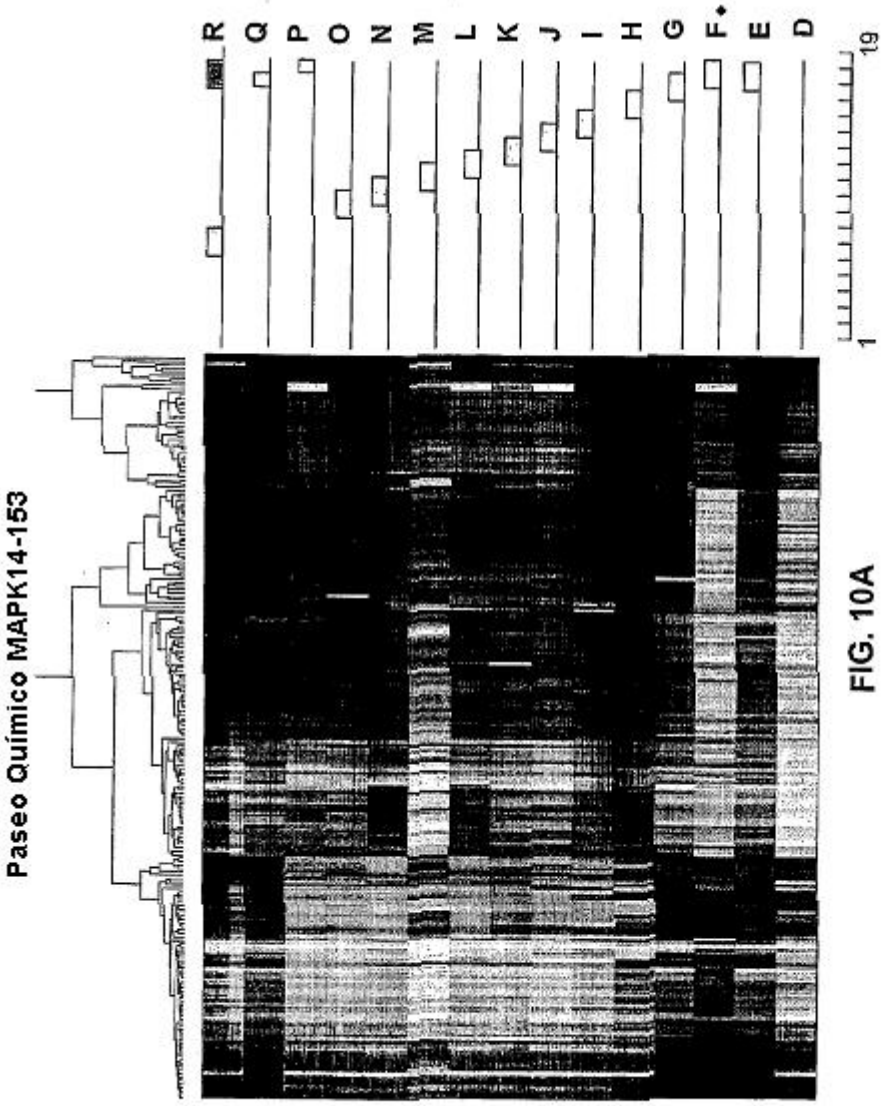

FIG. 10A

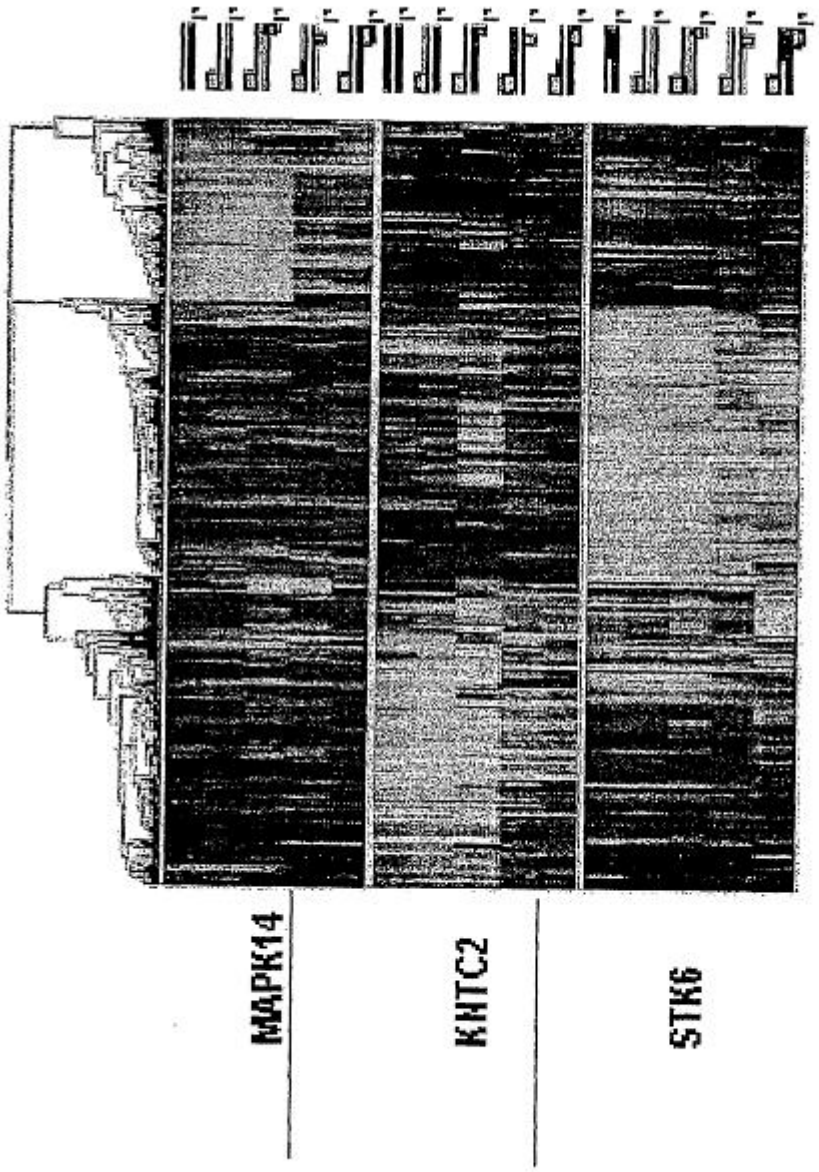

FIG. 10B

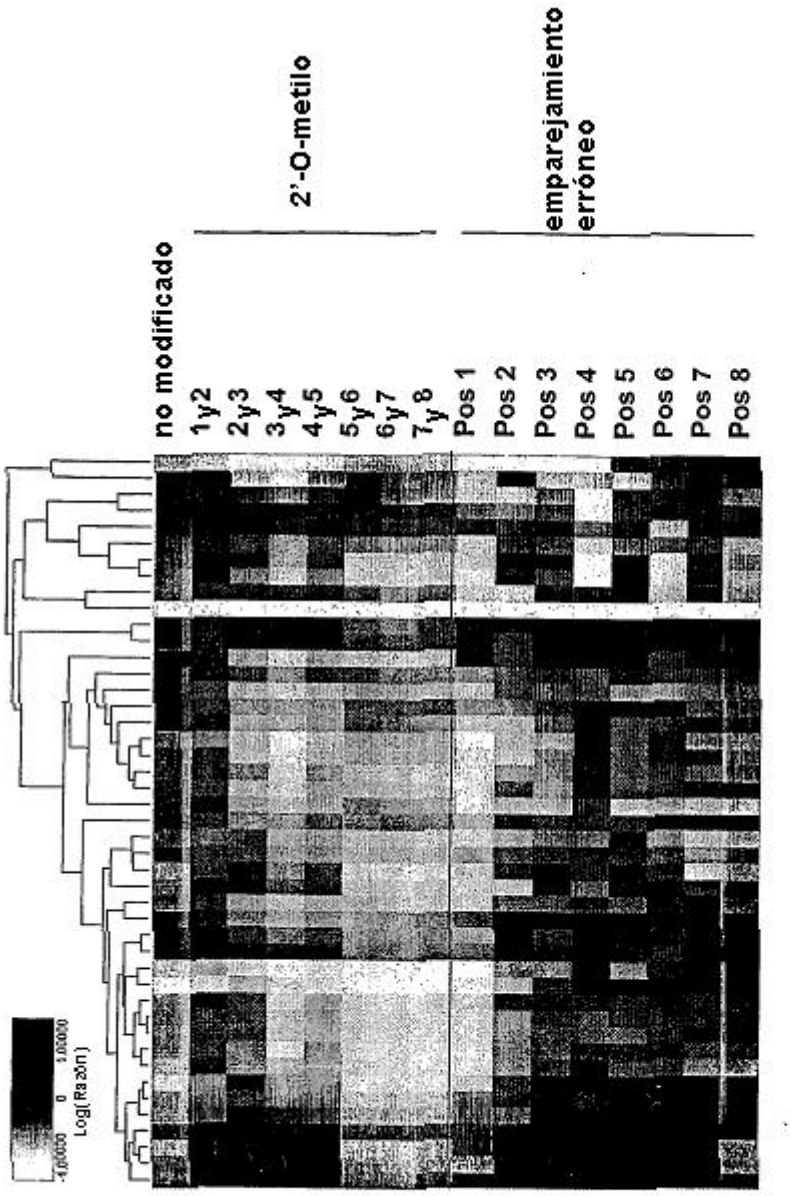
-1.00000
0
1.00000
Log(Razón)
no modificado
1 y 2
2 y 3
3 y 4
4 y 5
5 y 6
6 y 7
7 y 8
Pos 1
Pos 2
Pos 3
Pos 4
Pos 5
Pos 6
Pos 7
Pos 8
2'-O-metilo
emparejamiento erróneo

FIG. 11

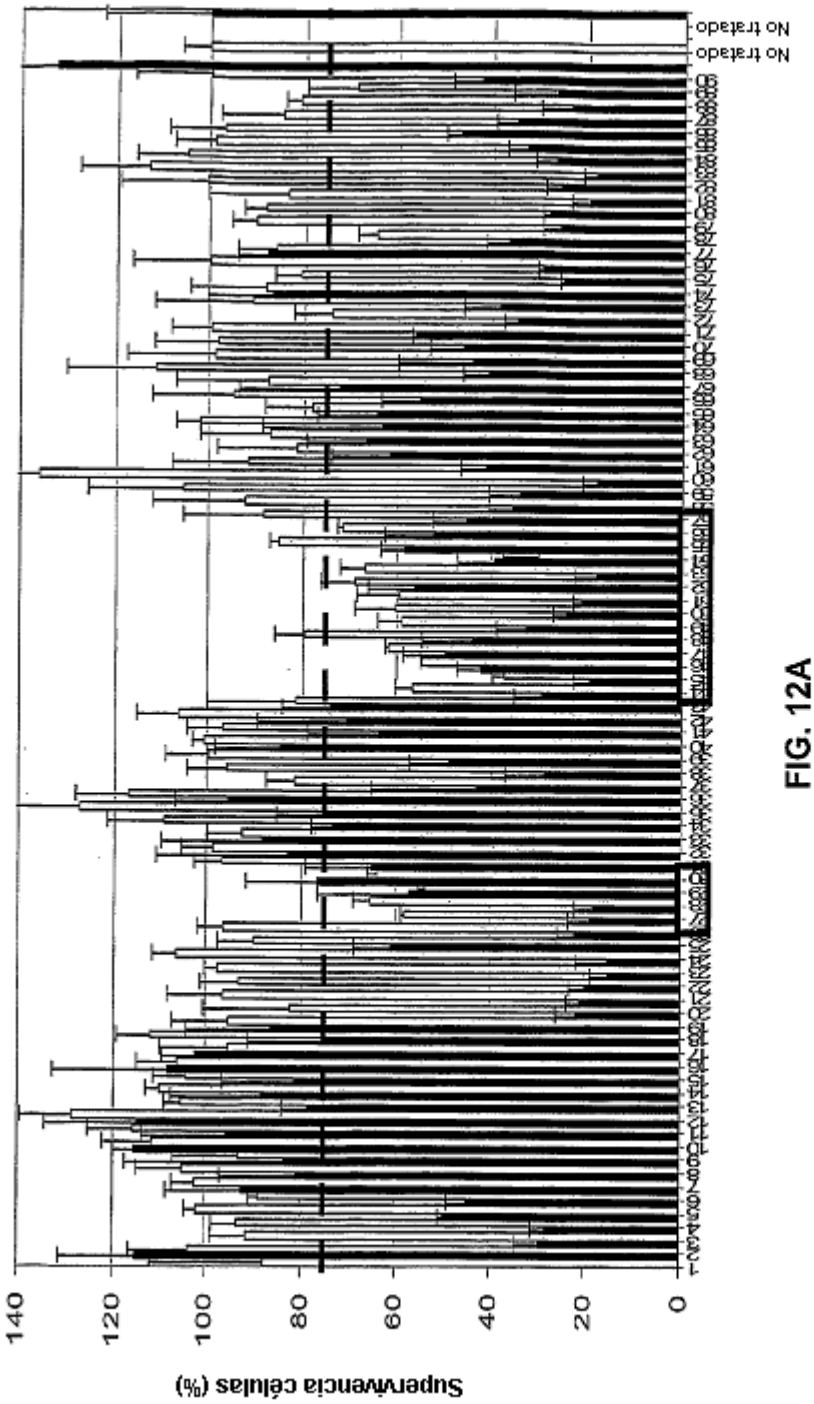
Supervivencia células (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
No tratado
No tratado

FIG. 12A

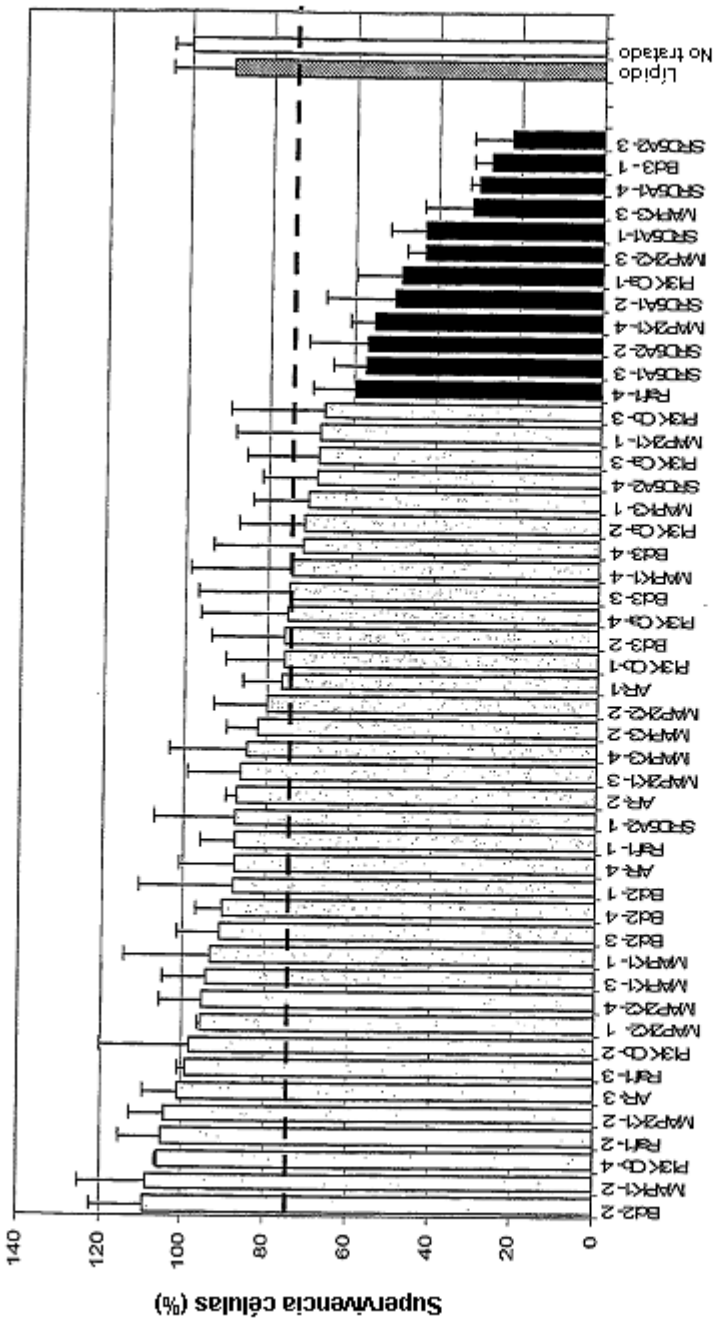
Supervivencia células (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
Bd2-2
MPK1-2
P13K Cb-4
RR1-2
MPZK1-2
AR-3
RR1-3
P13K Cb-2
MPZG- 1
MPZG-4
MPK1-3
MPK1-1
Bd2-3
Bd2-4
Bd2-1
AR-4
RR1-1
SRD5A2-1
AR-2
MPZK1-3
MPKG-4
MPKG-2
MPZG-2
AR1
P13K Cb-1
Bd3-2
P13K Cb-4
Bd3-3
MPK1-4
Bd3-4
P13K Cb-2
MPKG-1
SRD5A2-4
P13K Cb-3
MPZK1-1
P13K Cb-3
RR1-4
SRD5A1-3
SRD5A2-2
MPZK1-4
SRD5A1-2
P13K Cb-1
MPZG-3
SRD5A1-1
MPKG-3
SRD5A1-4
Bd3-1
SRD5A2-3
Lípido
No tratado

FIG. 12B

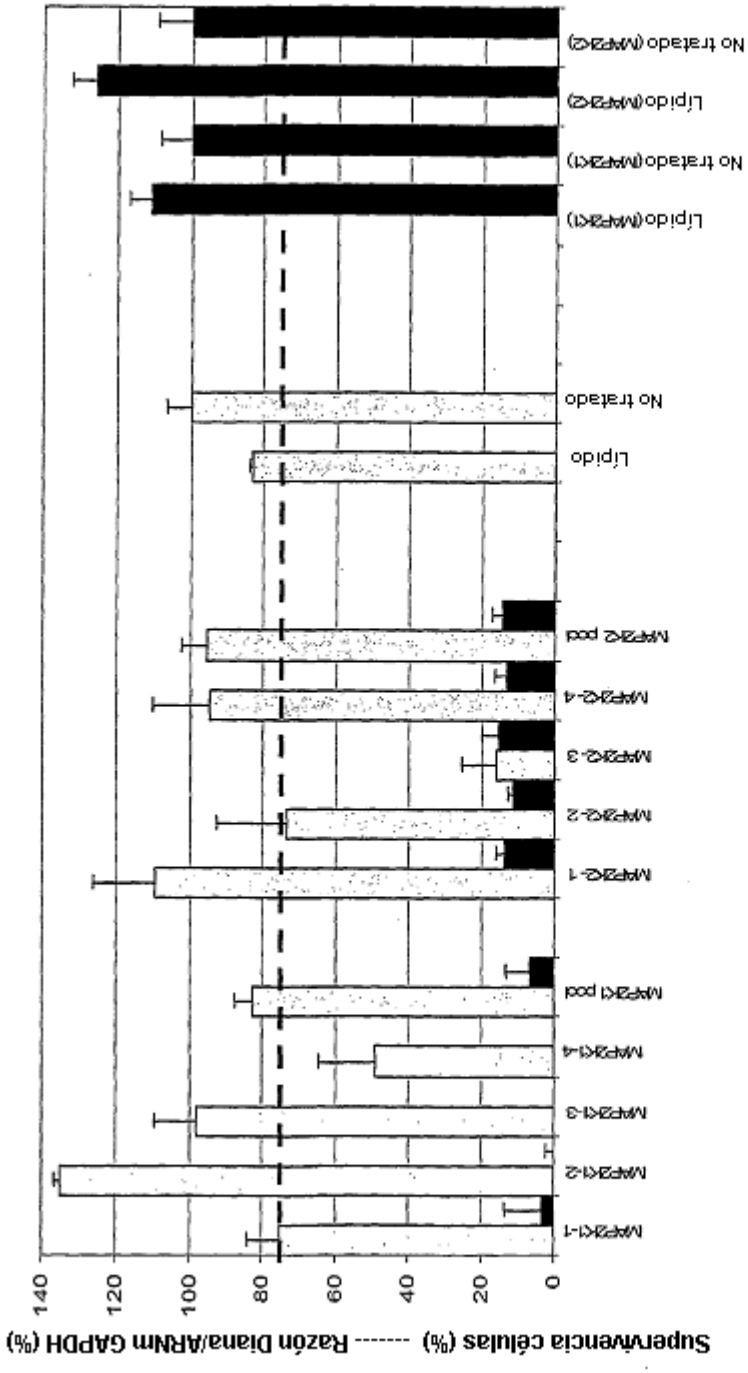
Supervivencia células (%) ------- Razón Diana/ARNm GAPDH (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
MPZ4C1-1
MPZ4C1-2
MPZ4C1-3
MPZ4C1-4
MPZ4C1 pool
MPZ4C-1
MPZ4C-2
MPZ4C-3
MPZ4C-4
MPZ4C pool
Lipido
No tratado
Lipido(MPZ4C1)
No tratado(MPZ4C1)
Lipido(MPZ4C)
No tratado(MPZ4C)

FIG. 12C

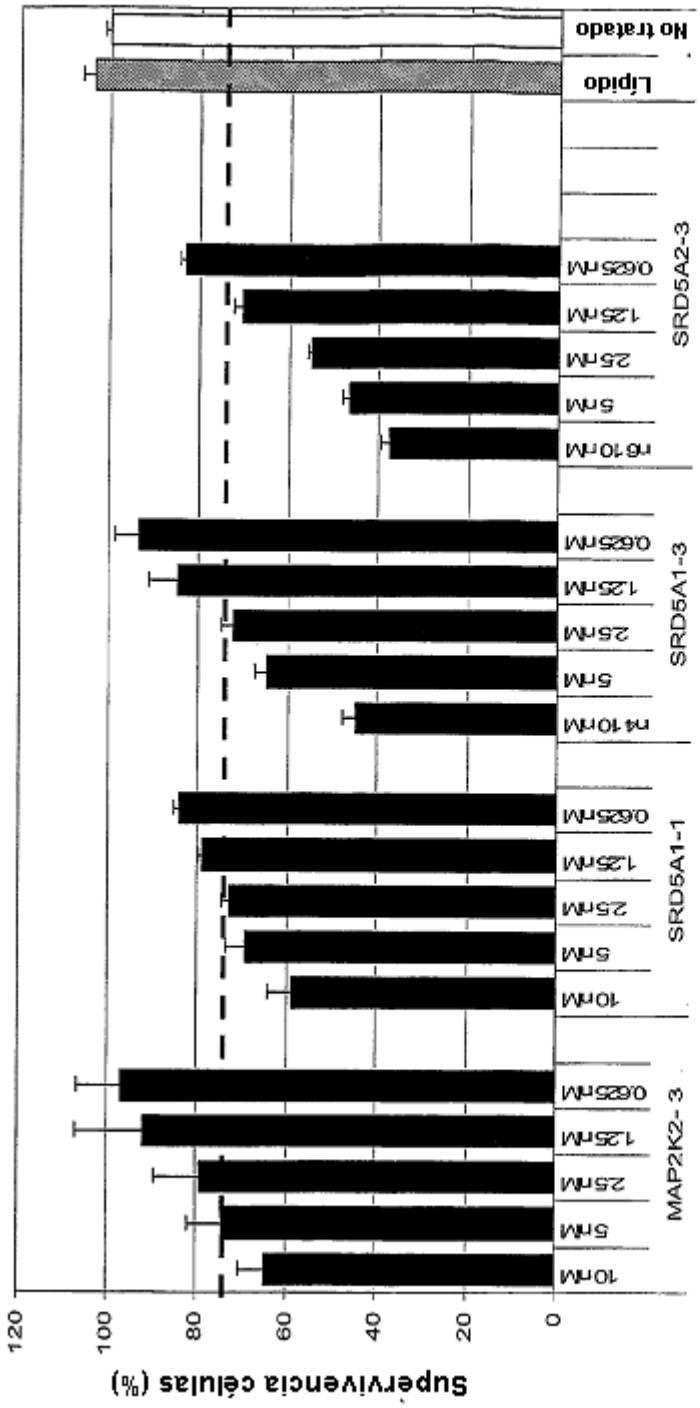
Supervivencia células (%)
120
100
80
60
40
20
0
MAP2K2- 3
10nM
5nM
2.5nM
1.25nM
0.625nM
SRD5A1-1
10nM
5nM
2.5nM
1.25nM
0.625nM
SRD5A1-3
n410nM
5nM
2.5nM
1.25nM
0.625nM
SRD5A2-3
n610nM
5nM
2.5nM
1.25nM
0.625nM
Lípido
No tratado

FIG. 12D

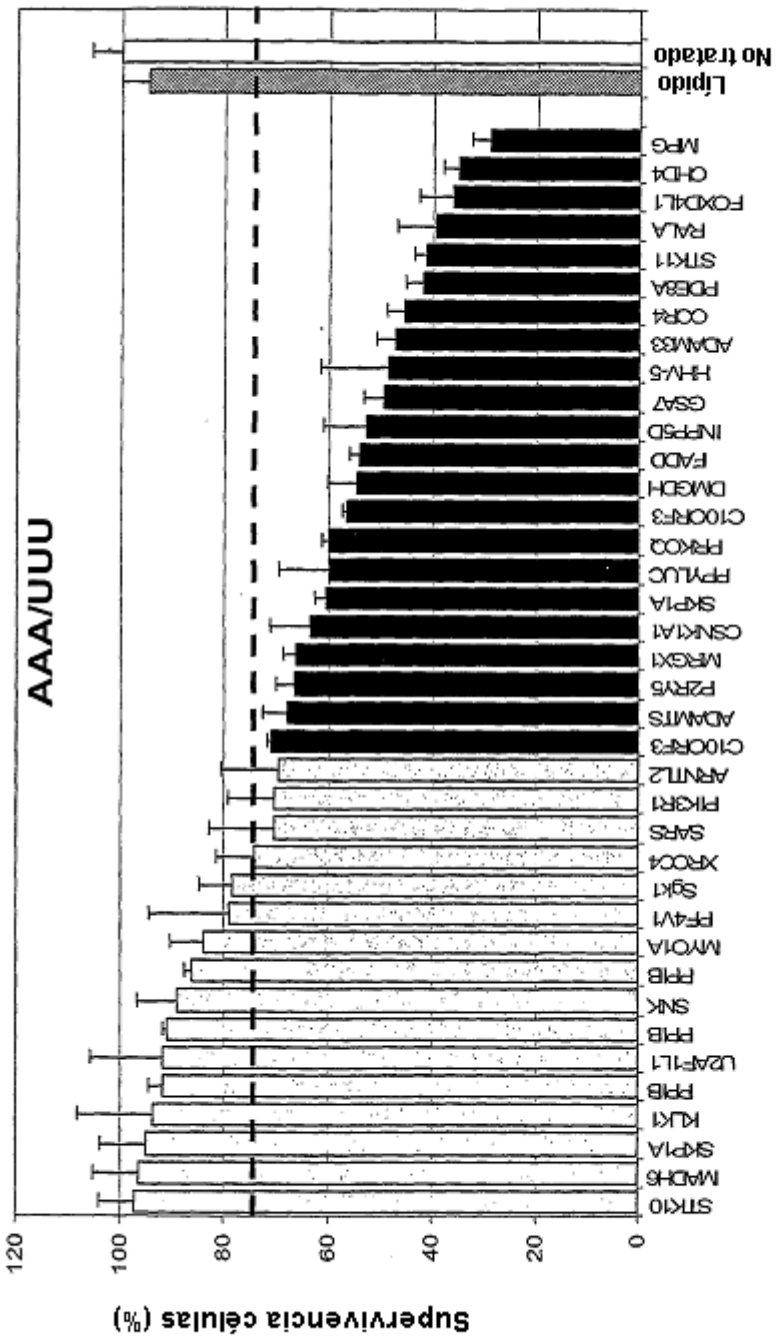
AAA/UUU
Supervivencia células (%)
120
100
80
60
40
20
0
STK10
MADH6
SKP1A
KLK1
PPIB
U2AF1L1
PPIB
SNK
PPIB
MYO1A
PF4V1
Sgk1
XRCC4
SARS
PIK3R1
ARNTL2
C10ORF3
ADAMTS
P2RY5
MRGX1
CSNK1A1
SKP1A
PPVLUC
PRKCQ
C10ORF3
DMGDH
FADD
INPP5D
GSAT
HHV-5
ADAM33
CCR4
PDE8A
STK11
RALA
FOXD4L1
CHD4
MPG
Lipido
No tratado

FIG. 13A

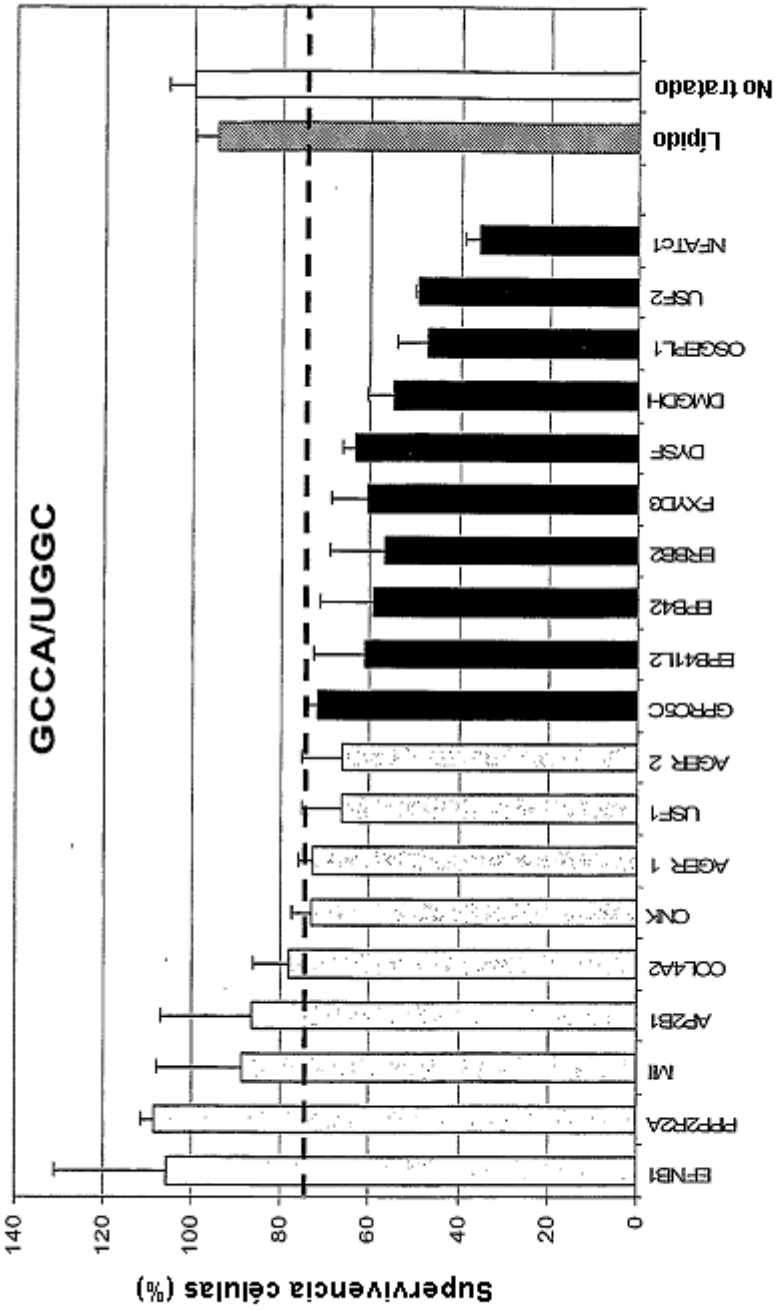
GCCA/UGGC
Supervivencia células (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
EFNB1
FPR2R2A
M1
AP2B1
COL4A2
CNK
AGER 1
USF1
AGER 2
GPRC5C
EPB41L2
EPB42
ERBB2
FXYD3
DYSF
DMGDH
OSGEPL1
USF2
NFATc1
Lipido
No tratado

FIG. 13B

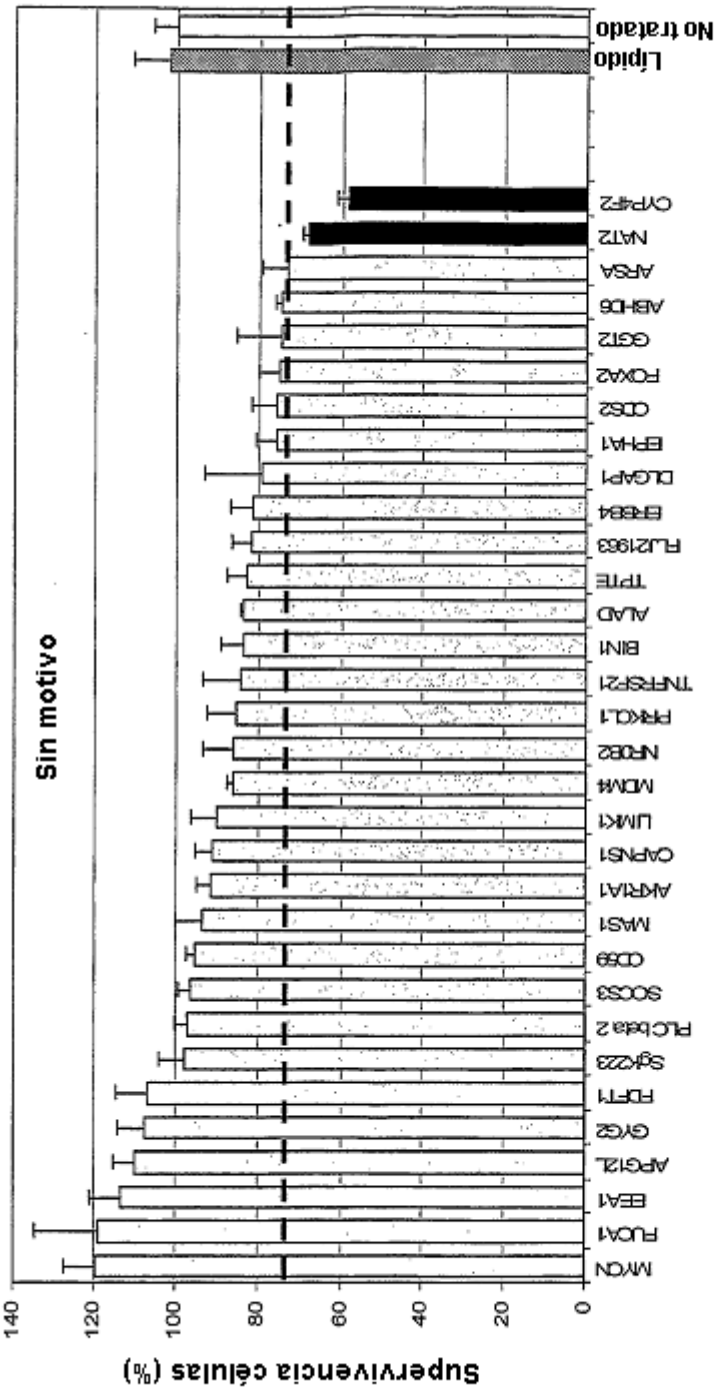
Sin motivo
Supervivencia células (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
MYCN
FUCA1
EEA1
APG12L
GYG2
FDFT1
Sgk223
PLCbeta2
SOCS3
CD9
MAS1
ADRIA1
CAPNS1
LIMK1
MDM4
NR0B2
PRKCL1
TNFRSF21
BIN1
ALAD
TPTE
FLJ21963
ERBB4
DLGAP1
EPHA1
CDS2
FOXA2
GGT2
ABHD6
ARSA
NAT2
CYP4F2
Lípido
No tratado

FIG. 13C

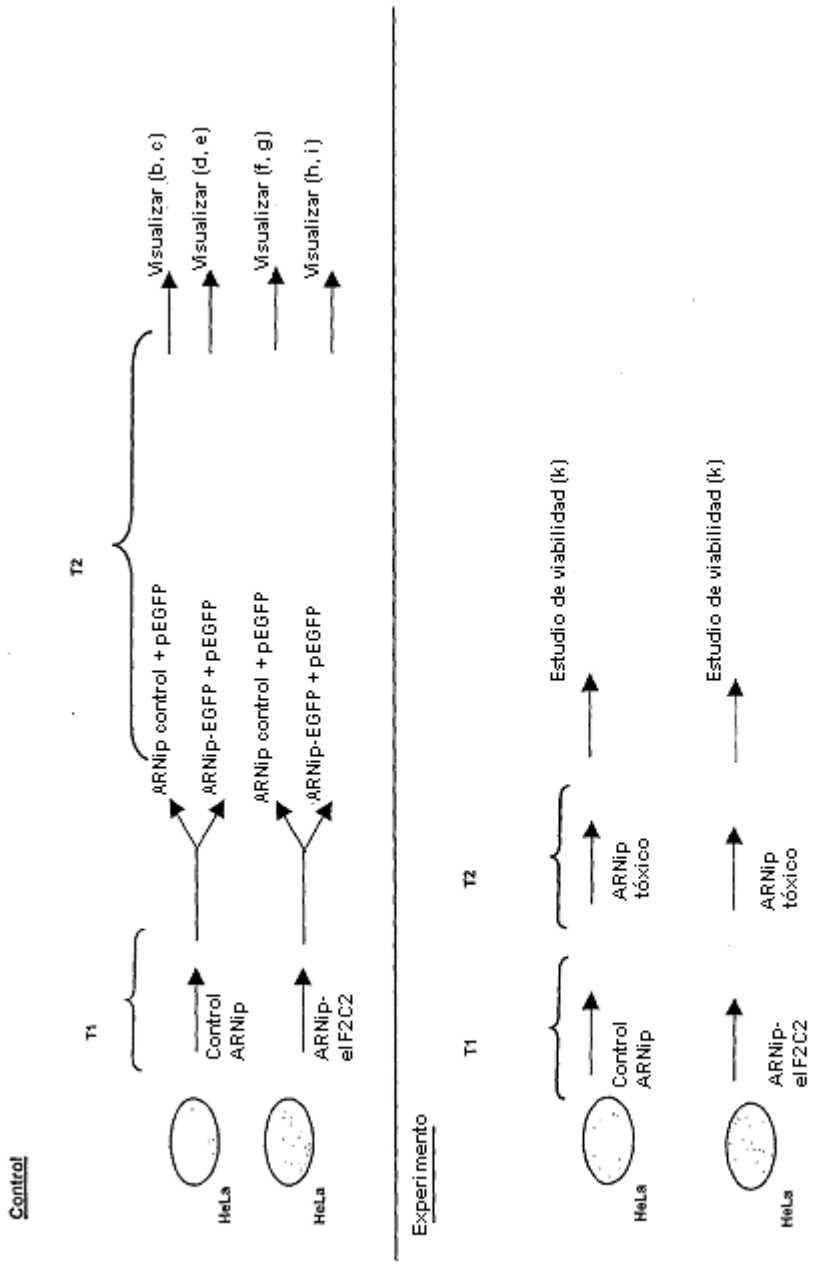
Control
T1
T2
HeLa
Control ARNip
ARNip-elF2C2
ARNip control + pEGFP
ARNip-EGFP + pEGFP
ARNip control + pEGFP
ARNip-EGFP + pEGFP
Visualizar (b, c)
Visualizar (d, e)
Visualizar (f, g)
Visualizar (h, i)
Experimento
T1
T2
HeLa
Control ARNip
ARNip-elF2C2
ARNip tóxico
ARNip tóxico
Estudio de viabilidad (k)
Estudio de viabilidad (k)

FIG. 14A

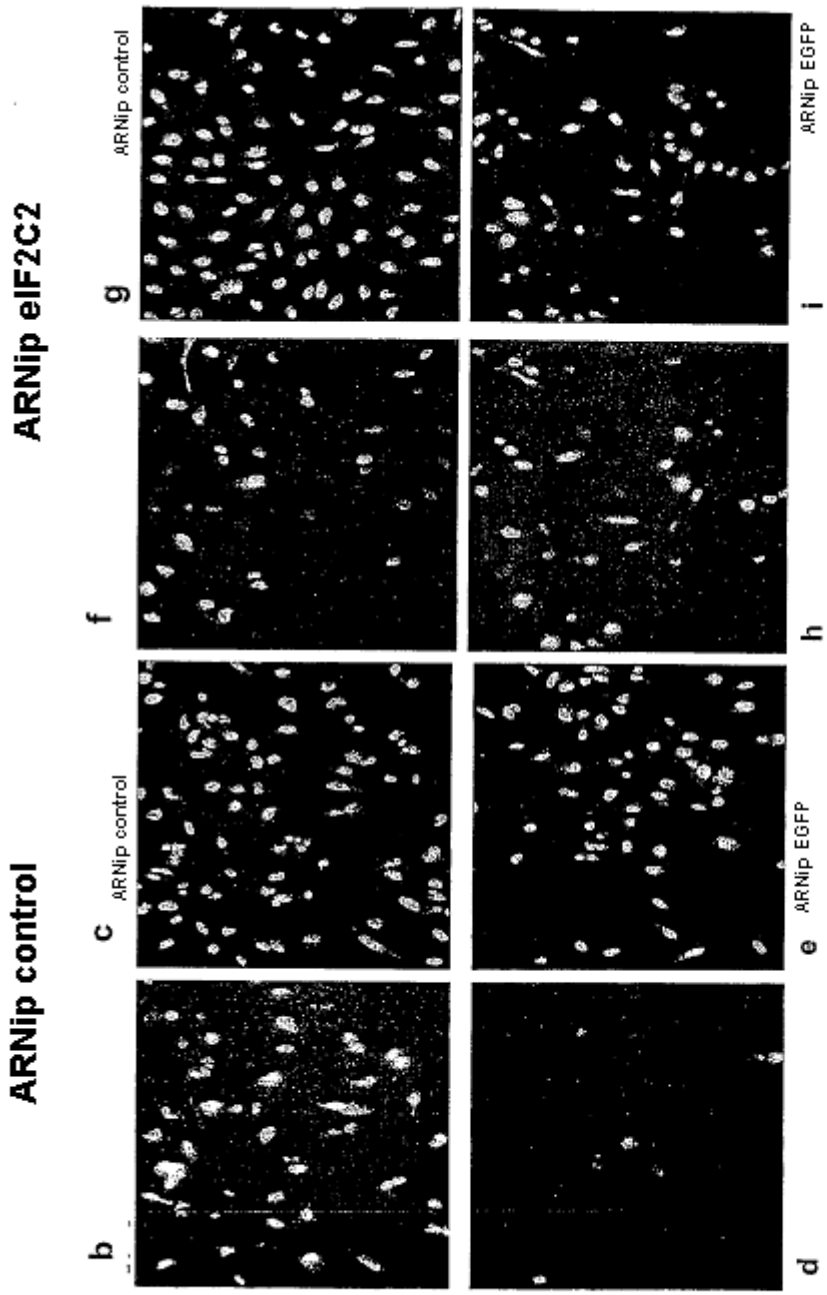
ARNip control
ARNip eIF2C2
b
c
ARNip control
f
g
ARNip control
d
e
ARNip EGFP
h
i
ARNip EGFP

FIG. 14B-I

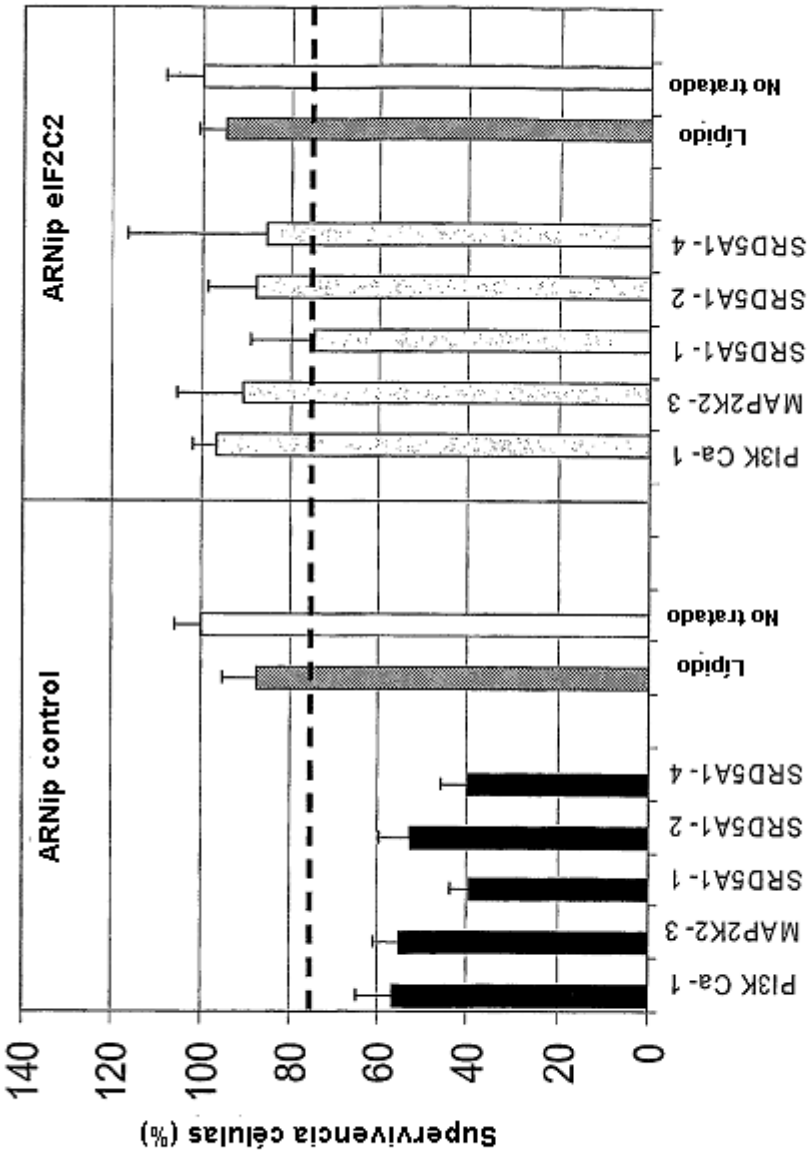
ARNip control
ARNip eIF2C2
Supervivencia células (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
PI3K Ca- 1
MAP2K2- 3
SRD5A1- 1
SRD5A1- 2
SRD5A1- 4
Lípido
No tratado
PI3K Ca- 1
MAP2K2- 3
SRD5A1- 1
SRD5A1- 2
SRD5A1- 4
Lípido
No tratado

FIG. 14J

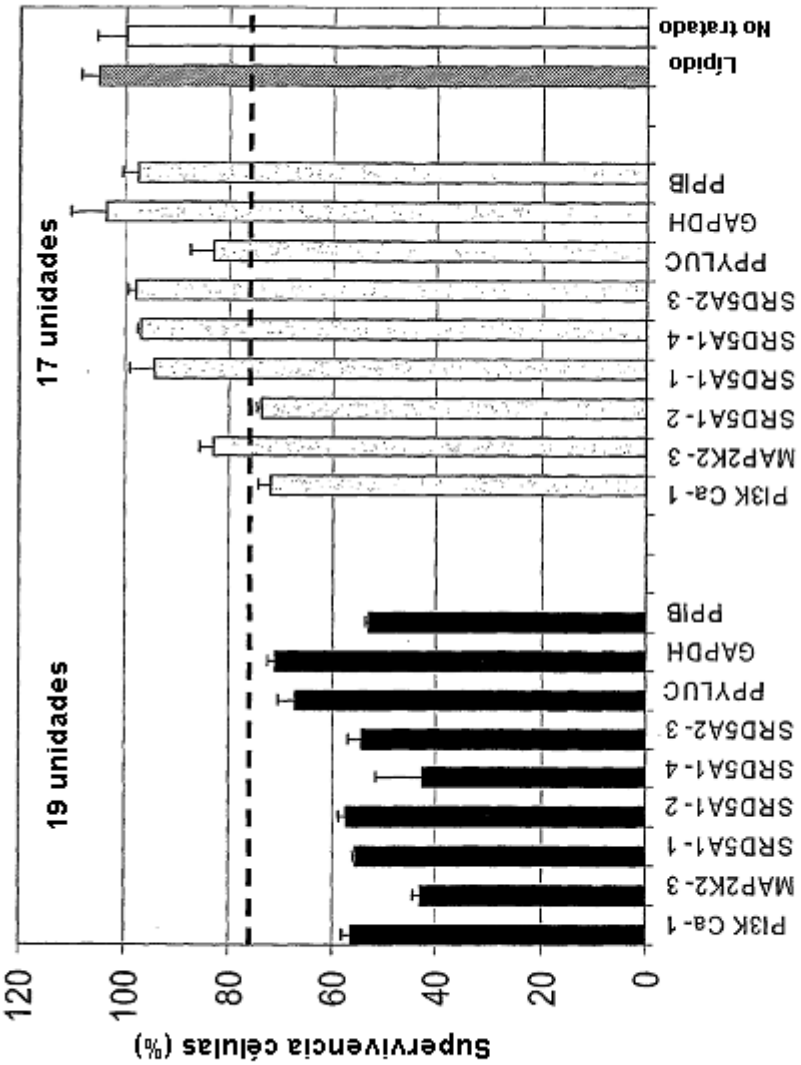
Supervivencia células (%)
120
100
80
60
40
20
0
19 unidades
17 unidades
P13K Ca-1
MAP2K2-3
SRD5A1-1
SRD5A1-2
SRD5A1-4
SRD5A2-3
PPYLUC
GAPDH
PPIB
P13K Ca-1
MAP2K2-3
SRD5A1-2
SRD5A1-1
SRD5A1-4
SRD5A2-3
PPYLUC
GAPDH
PPIB
Lípido
No tratado

FIG. 14K

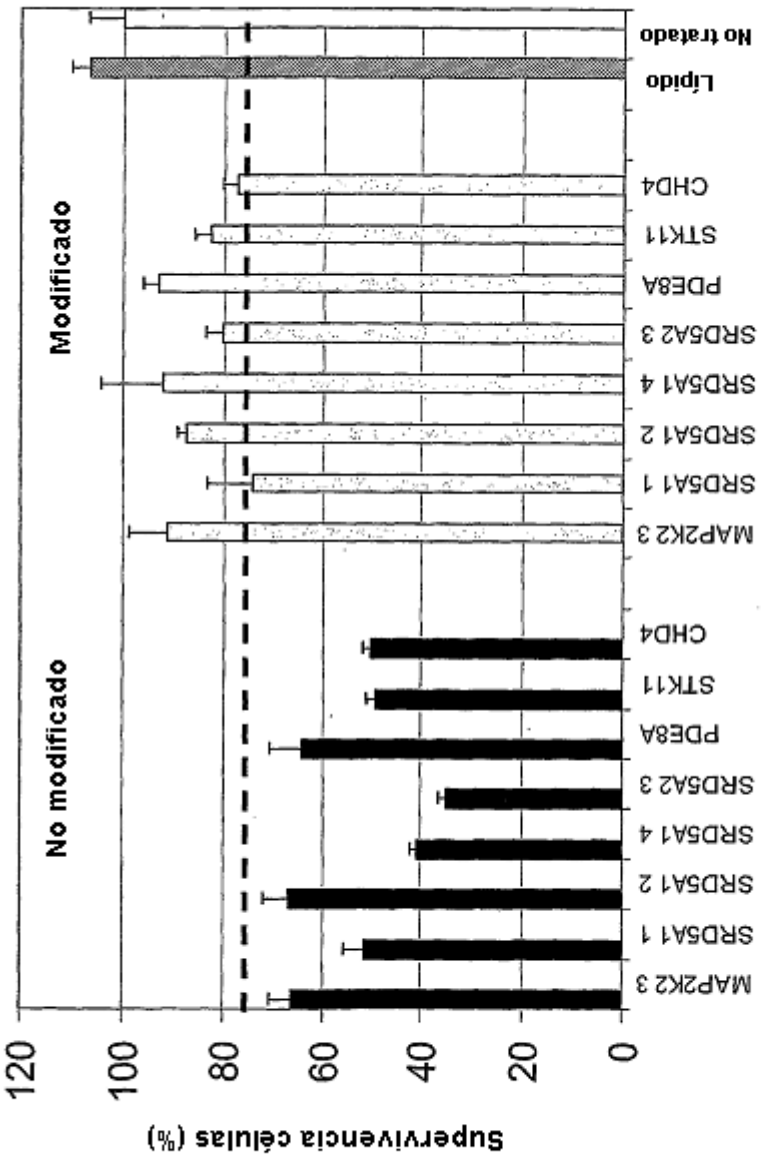
Supervivencia células (%)
120
100
80
60
40
20
0
No modificado
Modificado
MAP2K2 3
SRD5A1 1
SRD5A1 2
SRD5A1 4
SRD5A2 3
PDE8A
STK11
CHD4
MAP2K2 3
SRD5A1 1
SRD5A1 2
SRD5A1 4
SRD5A2 3
PDE8A
STK11
CHD4
Lípido
No tratado

FIG. 14L

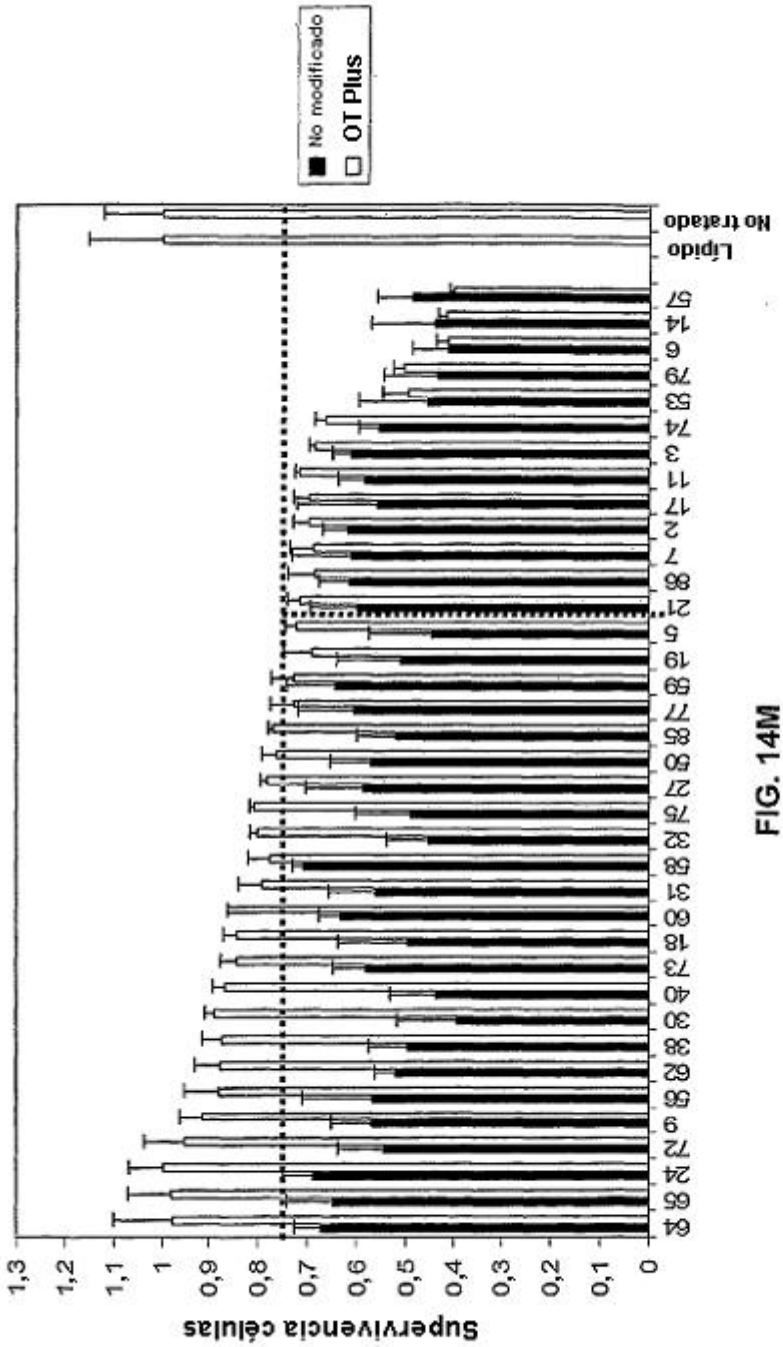
No modificado
OT Plus
Supervivencia células
1,3
1,2
1,1
1
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
64
65
24
72
9
56
62
38
30
40
73
18
60
31
58
32
75
27
50
85
77
59
19
5
21
86
7
2
17
11
3
74
53
79
6
14
57
Lípido
No tratado

FIG. 14M

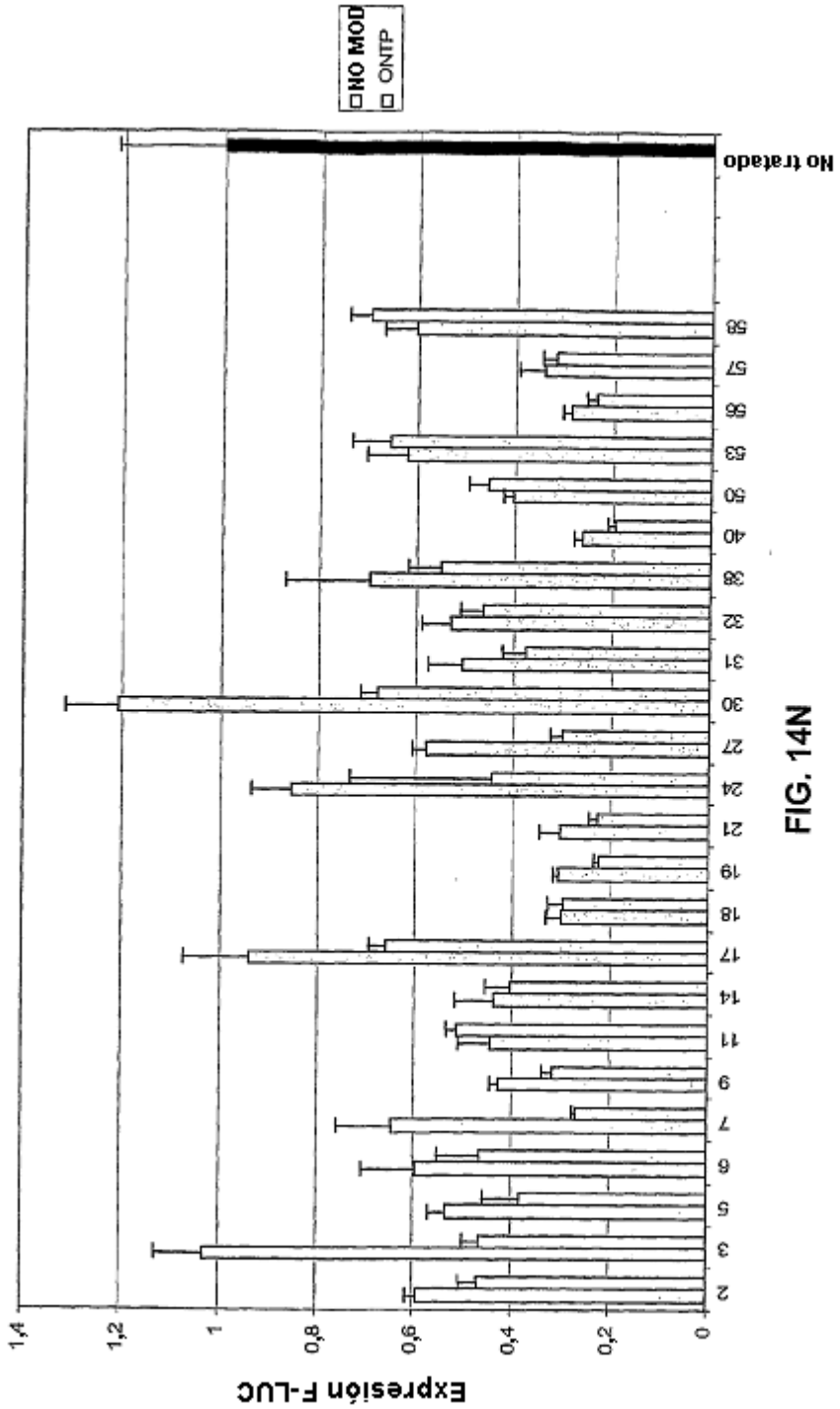
NO MOD
ONTP
Expresión F-LUC
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
2
3
5
6
7
9
11
14
17
18
19
21
24
27
30
31
32
38
40
50
53
56
57
58
No tratado

FIG. 14N

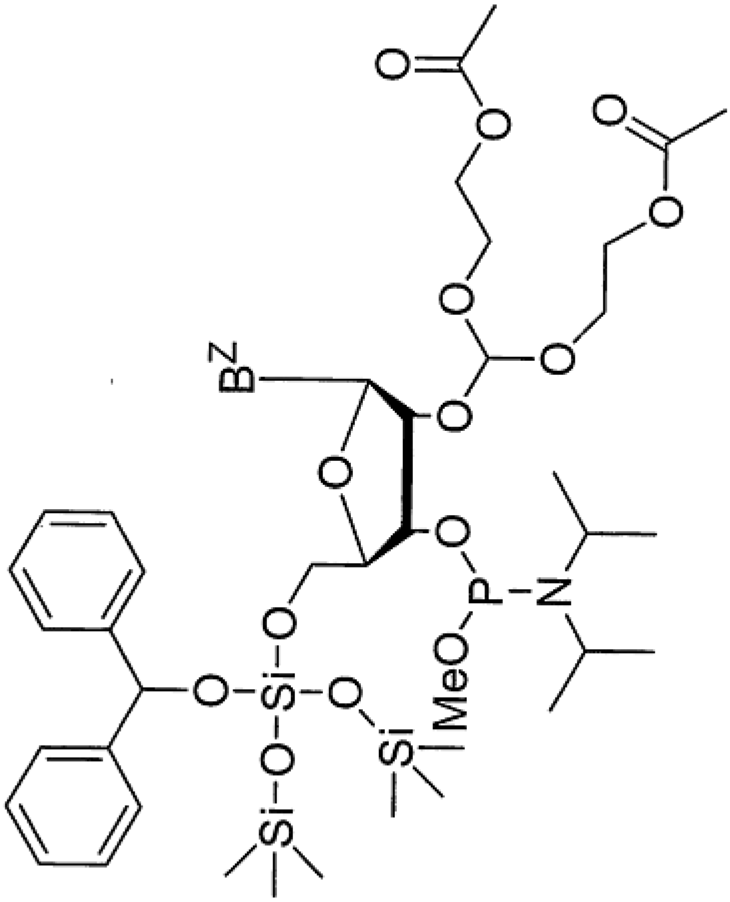

FIG. 15

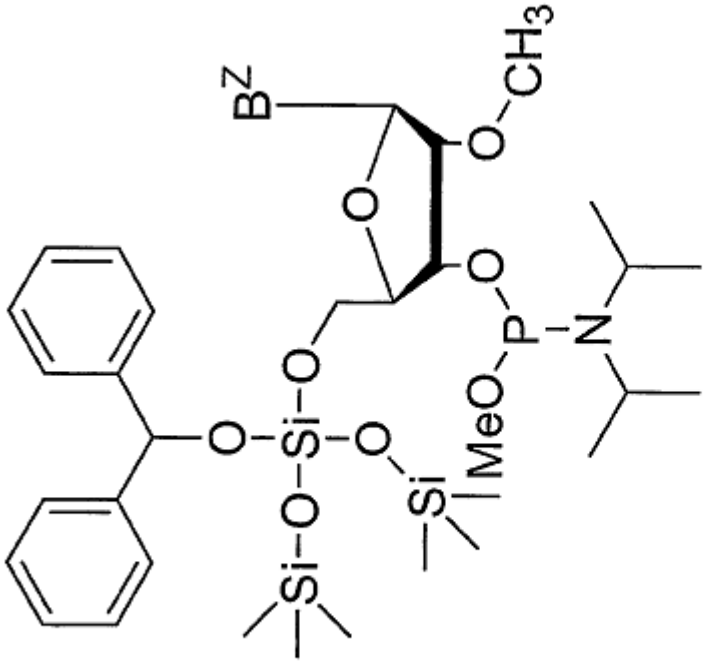

FIG. 16

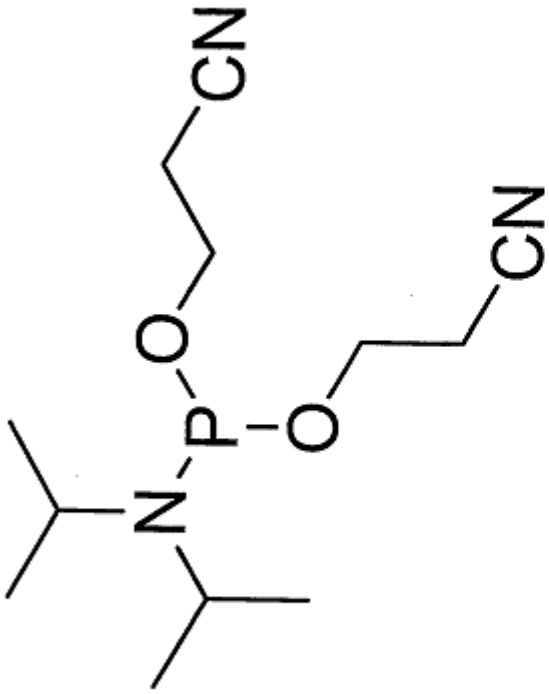

FIG. 17

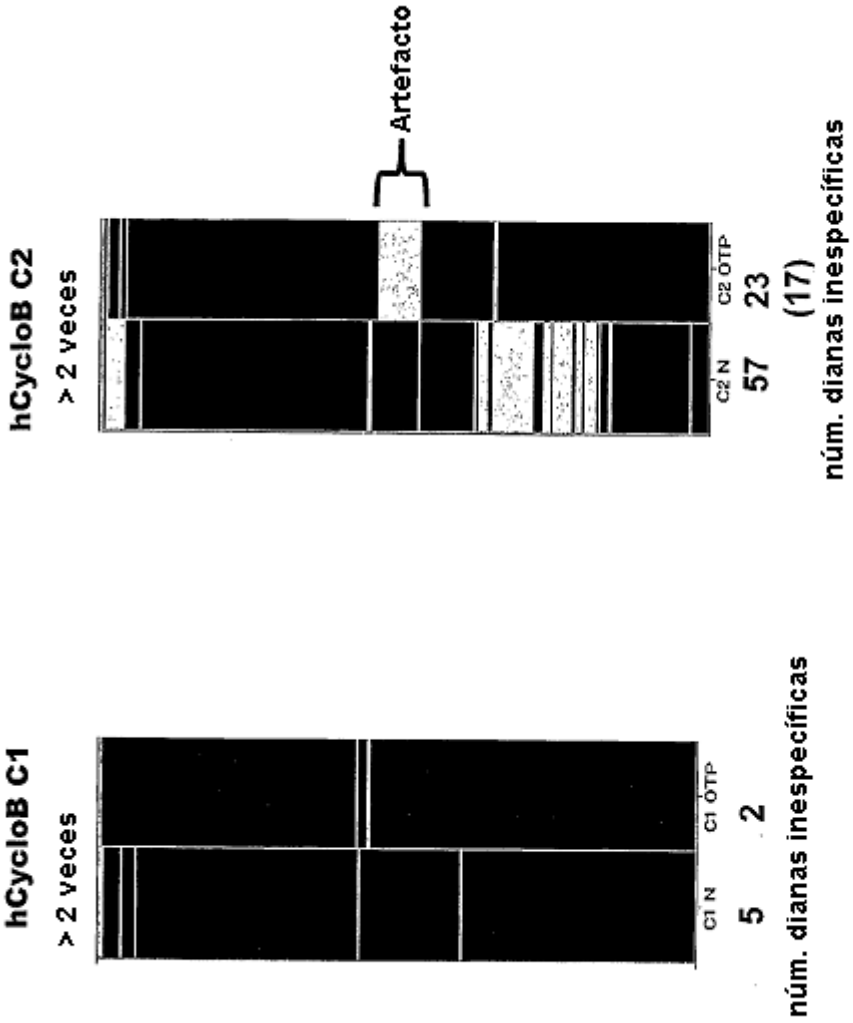
hCycloB C1
> 2 veces
C1 N
C1 OTP
5
2
núm. dianas inespecíficas
hCycloB C2
> 2 veces
Artefacto
C2 N
C2 OTP
57
23
(17)
núm. dianas inespecíficas

FIG. 18A

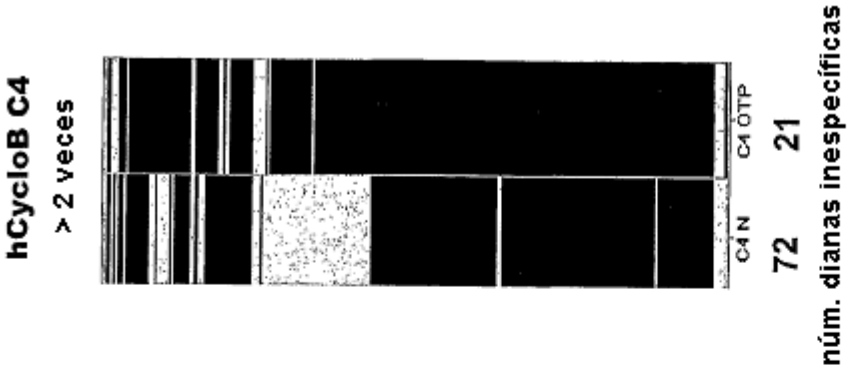

FIG. 18B

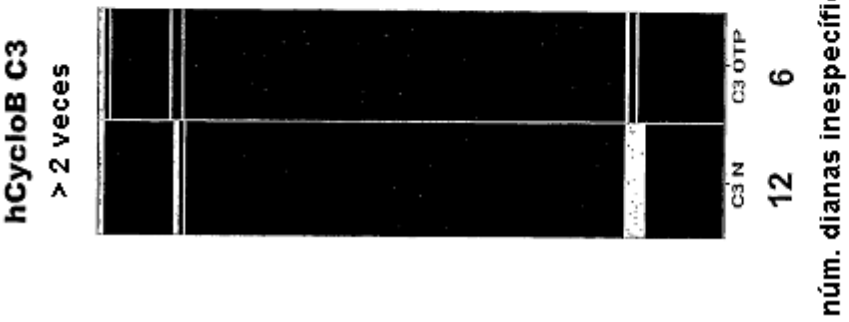

FIG. 18C

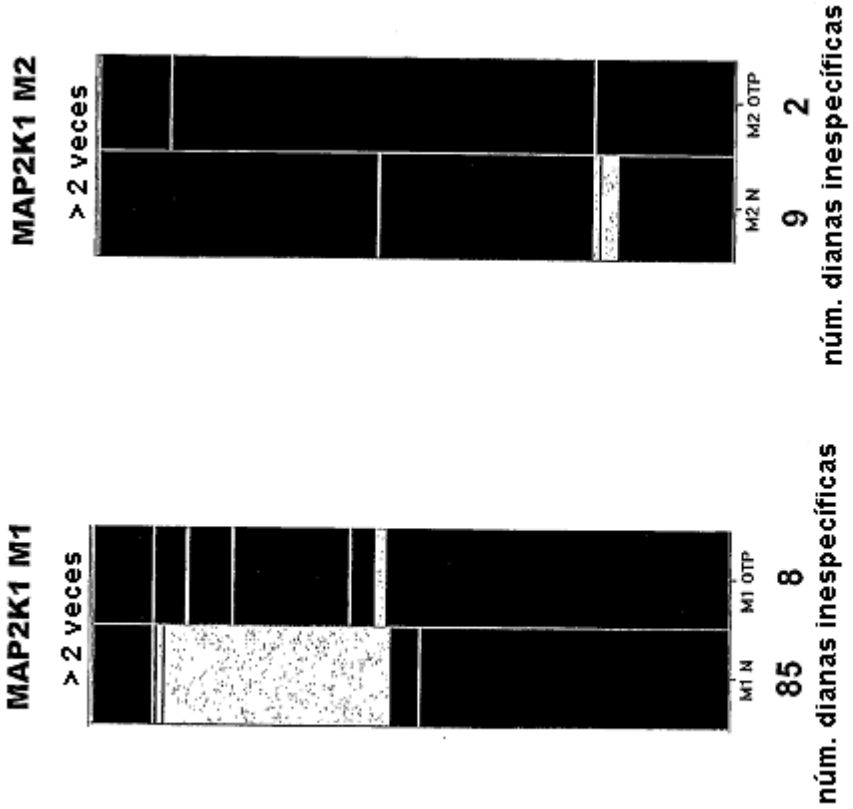
MAP2K1 M1
> 2 veces
M1 N
M1 OTP
85
8
núm. dianas inespecíficas
MAP2K1 M2
> 2 veces
M2 N
M2 OTP
9
2
núm. dianas inespecíficas

FIG. 18D

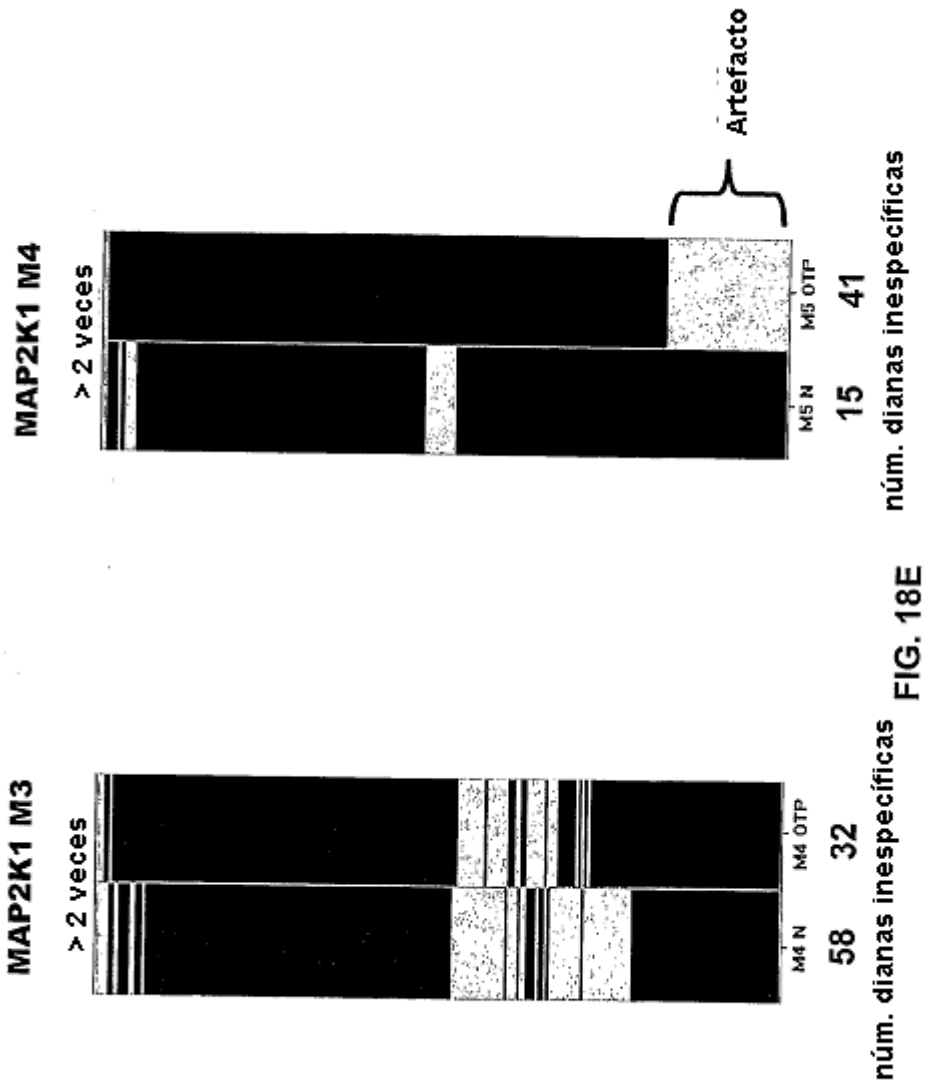
MAP2K1 M3
> 2 veces
M4 N
M4 OTP
58
32
núm. dianas inespecíficas
MAP2K1 M4
> 2 veces
M5 N
M5 OTP
15
41
núm. dianas inespecíficas
Artefacto

FIG. 18E

FIG. 18F

Agrupación MAP2K1
> 2 veces
MP N **
MP OTP
26
2
núm. dianas inespecíficas