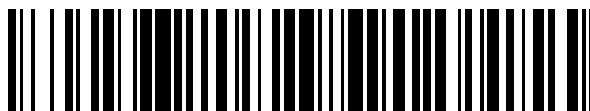


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 861**

51 Int. Cl.:

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

A01N 43/04 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2007 E 07759825 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 2008274**

54 Título: **Composiciones y métodos para inhibir la expresión del gen Eg5**

30 Prioridad:

31.03.2006 US 787762 P

15.12.2006 US 870259 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.09.2015

73 Titular/es:

**ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC. (100.0%)
300 THIRD STREET
CAMBRIDGE, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**BUMCROT, DAVID;
TAN, PAMELA;
VORNLOCHER, HANS-PETER y
GEICK, ANKE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 544 861 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para inhibir la expresión del gen *Eg5*

5 **Solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional en EE UU No. 60/787.762, presentada el 31 de marzo, 2006 y la solicitud provisional en EE UU No. 60/870.259, presentada el 15 de diciembre, 2006.

10 **Campo de la invención**

Esta solicitud se refiere a ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), y su uso en mediar interferencia por ARN para inhibir la expresión del gen *Eg5* y el uso del ARNbc para tratar procesos patológicos mediados por la expresión de *Eg5*, tal como cáncer, solo o en combinación con un ARNbc que se dirige al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Antecedentes de la invención

El mantenimiento de las poblaciones celulares en un organismo está regido por los procesos celulares de división celular y muerte celular programada. En células normales, los sucesos celulares asociados con el inicio y terminación de cada proceso están muy regulados. En enfermedad proliferativa, tal como cáncer, uno o ambos de estos procesos pueden estar alterados. Por ejemplo, una célula cancerosa puede haber perdido su regulación (control de los puntos de control) del ciclo de división celular mediante bien la sobreexpresión de un regulador positivo o la pérdida de un regulador negativo, tal vez por mutación.

Alternativamente, una célula cancerosa puede haber perdido su capacidad de experimentar muerte celular programada mediante la sobreexpresión de un regulador negativo. Por tanto, hay una necesidad para desarrollar nuevos fármacos quimioterapéuticos que restaurarán los procesos de control de los puntos de control y muerte celular programada a las células cancerosas.

Un enfoque para el tratamiento de cánceres humanos es dirigirse a una proteína que es esencial para la progresión del ciclo celular. Para que el ciclo celular prosiga de una fase a la siguiente, se deben completar ciertos sucesos prerequisites. Hay puntos de control en el ciclo celular que imponen el orden apropiado de sucesos y fases. Uno de tales puntos de control es el punto de control del huso que se produce durante la fase de metafase de la mitosis. Las moléculas pequeñas que se dirigen a proteínas con funciones esenciales en mitosis pueden promover que el punto de control del huso detenga las células en mitosis. De las moléculas pequeñas que paran las células en mitosis, las que muestran actividad antitumoral en clínica también inducen apoptosis, los cambios morfológicos asociados con la muerte celular programada. Un agente quimioterapéutico eficaz para el tratamiento del cáncer puede por tanto, ser uno que induzca el control de un punto de control y muerte celular programada. Desafortunadamente, hay pocos compuestos disponibles para controlar estos procesos dentro de la célula. La mayoría de los compuestos que se sabe causan parada mitótica y apoptosis actúan como agentes de unión a tubulina. Estos compuestos alteran la inestabilidad dinámica de los microtúbulos e indirectamente alteran la función/estructura del huso mitótico causando de esta manera parada mitótica. Puesto que la mayoría de estos compuestos se dirigen específicamente a la proteína tubulina que es un componente de todos los microtúbulos, también pueden afectar a uno o más de los numerosos procesos celulares normales en los que los microtúbulos desempeñan un papel. Por tanto, también hay una necesidad para moléculas pequeñas que se dirijan más específicamente a proteínas asociadas con células en proliferación.

Eg5 es una de varias proteínas motoras similares a cinesina que están localizadas en el huso mitótico y que se sabe se requieren para la formación y/o función del huso mitótico bipolar. Recientemente, hubo un artículo de una molécula pequeña que altera la bipolaridad del huso mitótico (Mayer, T. U. et. al. 1999. Science 286(5441) 971-4, incorporado en el presente documento mediante referencia). Más específicamente, la molécula pequeña indujo la formación de un huso mitótico anómalo en donde una matriz monoastral de microtúbulos emanaba de un par central de centrosomas, con los cromosomas unidos a los extremos distales de los microtúbulos. La molécula pequeña se llamó "monastrol" por el haz monoastral. Este fenotipo de haz monoastral se había observado previamente en células mitóticas que tenían la proteína motora *Eg5* inmunológicamente disminuida. Este fenotipo de haz monoastral distintivo facilitó la identificación de monastrol como un inhibidor potencial de *Eg5*. En efecto, se mostró además que monastrol inhibe la motilidad dirigida por *Eg5* de los microtúbulos en un ensayo in vitro. El inhibidor de *Eg5* monastrol no tenía efecto aparente sobre el motor cinesina relacionado o sobre el/los motor(es) responsables del movimiento del aparato de golgi en la célula. Las células que muestran el fenotipo de haz monoastral bien por la disminución inmunológica de *Eg5* o inhibición de *Eg5* por monastrol se detienen en la fase M del ciclo celular. Sin embargo, la parada mitótica inducida por la disminución inmunológica o inhibición de *Eg5* es transitoria (Kapoor, T. M., 2000. J Cell Biol 150(5) 975-80). Tanto el fenotipo de haz monoastral como la parada del ciclo celular en mitosis inducidas por monastrol son reversibles. Las células se recuperan para formar un huso mitótico bipolar normal, para completar la mitosis y seguir a través del ciclo celular y proliferación celular normal. Estos datos sugieren que un inhibidor de molécula pequeña de *Eg5* que inducía una parada mitótica transitoria puede no ser eficaz para el

tratamiento de la proliferación de células cancerosas. No obstante, el descubrimiento de que monastrol produce parada mitótica es intrigante y por tanto hay una necesidad para estudiar e identificar adicionalmente compuestos que se pueden usar para modular la proteína motora *Eg5* de una manera que fuera eficaz en el tratamiento de cánceres humanos. También hay una necesidad para explorar el uso de estos compuestos con otros agentes antineoplásicos.

VEGF (también conocido como factor de permeabilidad vascular, VPF) es una citoquina multifuncional que estimula la angiogénesis, proliferación de células epiteliales, y supervivencia de células endoteliales. VEGF se puede producir por una amplia variedad de tejidos, y su sobreexpresión o expresión anómala puede producir una variedad de trastornos, incluyendo cánceres y trastornos de retina tal como la degeneración macular senil y otros trastornos angiogénicos.

Recientemente, se ha mostrado que moléculas de ARN bicatenario (ARNbc) bloquean la expresión génica en un mecanismo regulador muy conservado conocido como interferencia por ARN (iARN). El documento WO 99/32619 (Fire et al.) divulga el uso de un ARNbc de al menos 25 nucleótidos de longitud para inhibir la expresión de genes en *C. elegans*. También se ha mostrado que el ARNbc degrada el ARN diana en otros organismos, incluyendo plantas (véase, por ejemplo, el documento WO 99/53050, Waterhouse et al.; y el documento WO 99/61631, Heifetz et al.), *Drosophila* (véase, por ejemplo, Yang, D., et al., *Curr. Biol.* (2000) 10:1191-1200), y mamíferos (véase, el documento WO 00/44895, Limmer; y el documento DE 101 00 586.5, Kreutzer et al.). Este mecanismo natural se ha convertido ahora en el foco para el desarrollo de una nueva clase de agentes farmacéuticos para tratar trastornos que están causados por la regulación anómala o indeseada de un gen.

A pesar de los avances significativos en el campo de la iARN y avances en el tratamiento de procesos patológicos mediados por la expresión de *Eg5*, permanece una necesidad para un agente que pueda silenciar selectiva y eficazmente el gen *Eg5* usando el propia maquinaria de iARN de la célula que tiene tanto alta actividad biológica como estabilidad in vivo, y que pueda inhibir eficazmente la expresión de un gen *Eg5* diana para su uso en tratar procesos patológicos mediados por la expresión *Eg5*.

Compendio de la invención

La invención se define en las reivindicaciones

La invención se refiere a ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), así como composiciones y métodos in vitro para inhibir la expresión del gen *Eg5* en una célula o mamífero usando tal ARNbc, solo o en combinación con un ARNbc que se dirige a VEGF. La invención también proporciona composiciones y métodos para tratar estados patológicos y enfermedades causadas por la expresión del gen *Eg5*, tal como en cáncer. El ARNbc de la invención comprende una hebra de ARN (la hebra antisentido) que tiene una región que tiene menos de 30 nucleótidos de longitud, generalmente de 19-24 nucleótidos de longitud, y es totalmente complementaria a al menos parte de un transcrito de ARNm del gen *Eg5*, dicha parte es como se define en las reivindicaciones.

En una forma de realización, la invención proporciona moléculas de ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión del gen *Eg5*. El ARNbc comprende al menos dos secuencias que son complementarias entre sí. El ARNbc comprende una hebra sentido que comprende una primera secuencia y una hebra antisentido que comprende una segunda secuencia. La hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que tiene totalmente complementaria a al menos parte de un ARNm que codifica *Eg5*, y la región de complementariedad es menos de 30 nucleótidos de longitud, generalmente de 19-24 nucleótidos de longitud. El ARNbc, al ponerse en contacto con una célula que expresa *Eg5*, inhibe la expresión del gen *Eg5* en al menos el 40%. Dicha parte de un ARNm que codifica *Eg5* se define en las reivindicaciones.

Se describen moléculas de ARNbc que pueden estar compuestas de una primera secuencia del ARNbc que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias sentido de las tablas 1-3 y la segunda secuencia se selecciona del grupo que consiste en las secuencias antisentido de las tablas 1-3.

Las moléculas de ARNbc de la invención pueden estar compuestas de nucleótidos naturales o pueden estar compuestas de al menos un nucleótido modificado, tal como un nucleótido modificado con 2'-O-metilo, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fosforotioato, y un nucleótido terminal unido a un derivado de colesterol. Alternativamente, el nucleótido modificado se puede elegir del grupo de: un nucleótido modificado con 2'-desoxi-2'-fluoro, un nucleótido modificado con 2'-desoxi, un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico, nucleótido modificado con 2'-amino, nucleótido modificado con 2'-alquilo, nucleótido de morfolino, un fosforamidato, y un nucleótido que comprende una base no natural. Tal secuencia modificada se basa en una primera secuencia de dicho ARNbc y una segunda secuencia como se define en las reivindicaciones.

En otra forma de realización, la invención proporciona una célula que comprende uno de los ARNbc de la invención. La célula generalmente es una célula de mamífero, tal como una célula humana.

En otra forma de realización, la invención proporciona una composición farmacéutica para inhibir la expresión del gen Eg5 en un organismo, generalmente un sujeto humano, que comprende uno o más de los ARNbc de la invención y un soporte farmacéuticamente aceptable o vehículo de administración.

5 En otra forma de realización, la invención proporciona un método in vitro para inhibir la expresión del gen Eg5 en una célula, que comprende los siguientes pasos:

- (a) introducir en la célula un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), en donde el ARNbc comprende al menos dos secuencias que son complementarias entre sí. El ARNbc comprende una hebra sentido que comprende una primera secuencia y una hebra antisentido que comprende una segunda secuencia. La hebra antisentido comprende una región de complementariedad que es completamente complementaria a al menos una parte de un ARNm que codifica Eg5, en donde la región de complementariedad tiene menos de 30 nucleótidos de longitud, generalmente de 19-24 nucleótidos de longitud, y en donde el ARNbc, al entrar en contacto con una célula que expresa Eg5, inhibe la expresión del gen Eg5 en al menos el 40%; y en donde dicha parte de un ARNm que codifica Eg5 se define en las reivindicaciones; y
- (b) mantener la célula producida en el paso (a) durante un tiempo suficiente para obtener degradación del transcrito de ARNm del gen Eg5, inhibiendo de esta manera la expresión del gen Eg5 en la célula.

En otra forma de realización, la invención proporciona el ARNbc definido anteriormente, para su uso en tratar, prevenir o controlar procesos patológicos mediados por la expresión de Eg5, por ejemplo, cáncer. Se describe la administración a un paciente en necesidad de tal tratamiento, prevención o control de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más de los ARNbc de la invención.

En otra forma de realización, la invención proporciona vectores para inhibir la expresión del gen Eg5 en una célula, que comprende una secuencia reguladora operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una hebra de uno de los ARNbc de la invención.

En otra forma de realización, la invención proporciona una célula que comprende un vector para inhibir la expresión del gen Eg5 en una célula. El vector comprende una secuencia reguladora operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una hebra de uno de los ARNbc de la invención.

En una forma de realización adicional, la invención proporciona el ARNbc de Eg5 y los usos del mismo como se describe anteriormente en combinación con un segundo ARNbc que se dirige al ARNm de VEGF. Una combinación de un ARNbc que se dirige a Eg5 y un segundo ARNbc que se dirige a VEGF proporciona actividad complementaria y sinérgica para tratar trastornos hiperproliferativos, particularmente carcinoma hepático.

Breve descripción de las figuras

No se presentan figuras.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) como se define en las reivindicaciones, así como composiciones y métodos in vitro para inhibir la expresión del gen Eg5 en una célula o mamífero usando el ARNbc. La invención también proporciona composiciones para tratar estados patológicos y enfermedades en un mamífero causadas por la expresión del gen Eg5 usando ARNbc. El ARNbc dirige la degradación específica de secuencia de ARNm a través de un proceso conocido como interferencia por ARN (iARN). La invención proporciona además este ARNbc en combinación con un segundo ARNbc que inhibe la expresión del gen VEGF.

Los ARNbc de la invención comprenden una hebra de ARN (al hebra antisentido) que tiene una región que tiene menos de 30 nucleótidos de longitud, generalmente de 19-24 nucleótidos de longitud, y es totalmente complementaria a al menos una parte de un transcrito de ARNm del gen Eg5, dicha parte se ha definido anteriormente. El uso de estos ARNbc permite la degradación dirigida de los ARNm de genes que están implicados en la replicación y o el mantenimiento de células cancerosas en mamíferos. Usando ensayos celulares y animales, los presentes inventores han demostrado que dosis muy bajas de estos ARNbc pueden mediar específica y eficazmente iARN, lo que produce una inhibición significativa de la expresión del gen Eg5. Por tanto, las composiciones de la invención que comprenden estos ARNbc son útiles para tratar procesos patológicos mediados por la expresión de Eg5, por ejemplo, cáncer, dirigiéndose a un gen implicado en la división mitótica.

La siguiente descripción detallada divulga cómo hacer y usar el ARNbc y las composiciones que contienen el ARNbc para inhibir la expresión del gen Eg5, así como composiciones para tratar enfermedades y trastornos causados por la expresión de Eg5, tal como cáncer, solo o en combinación con un segundo ARNbc que se dirige al gen VEGF. Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden un ARNbc que tienen una hebra antisentido que comprende una región de complementariedad que tiene menos de 30 nucleótidos de longitud, generalmente de 19-24 nucleótidos de longitud, y es sustancialmente complementaria a al menos parte de un transcrito de ARN del gen

Eg5, junto con un soporte farmacéuticamente aceptable. Como se ha comentado anteriormente, tales composiciones pueden incluir además un segundo ARNbc que se dirige a VEGF.

Según esto, ciertos aspectos de la invención proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el ARNbc de la invención junto con un soporte farmacéuticamente aceptable, métodos *in vitro* de usar las composiciones para inhibir la expresión del gen Eg5, y composiciones farmacéuticas para uso en tratar enfermedades causadas por la expresión del gen Eg5. La invención proporciona además las composiciones farmacéuticas anteriores que contienen además un segundo ARNbc diseñado para inhibir la expresión de VEGF.

I. Definiciones

Por conveniencia, el significado de ciertos términos y frases usados en la especificación, ejemplos, y reivindicaciones adjuntas, se proporcionan a continuación. Si hay una discrepancia aparente entre el uso de un término en otras partes de esta especificación y su definición proporcionada en esta sección, la definición en esta sección prevalece.

“G”, “C”, “A” y “U” cada una generalmente representa un nucleótido que contiene guanina, citosina, adenina o uracilo como una base, respectivamente. Sin embargo, se entenderá que el término “ribonucleótido” o “nucleótido” también se puede referir a un nucleótido modificado, como se detalla adicionalmente posteriormente, o una fracción de sustitución suplente. El experto en la materia sabe bien que guanina, citosina, adenina y uracilo se pueden sustituir por otras fracciones sin alterar sustancialmente las propiedades de apareamiento de bases de un oligonucleótido que comprende un nucleótido que lleva tal fracción de sustitución. Por ejemplo, sin limitación, un nucleótido que comprende inosina como su base se puede aparear con nucleótidos que contienen adenina, citosina o uracilo. Por tanto, los nucleótidos que contienen uracilo, guanina, o adenina se pueden sustituir en las secuencias de nucleótidos de la invención por un nucleótido que contiene, por ejemplo, inosina. Las secuencias que comprenden tales fracciones de sustitución son formas de realización de la invención.

Como se usa en el presente documento, “Eg5” se refiere al miembro 11 de la familia de cinesina humana, que también se conoce como KIF11, Eg5, HKSP, KNSL1 o TRIP5. La secuencia de Eg5 se puede encontrar como NCBI GeneID: 3832, HGNC ID: HGNC:6388 y RefSeq ID número: NM_004523.

Como se usa en el presente documento, “secuencia diana” se refiere a una porción contigua de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm formada durante la transcripción del gen Eg5, incluyendo ARNm que es un producto del procesamiento de ARN de un producto de transcripción primario. La secuencia diana según la invención se define en las reivindicaciones.

Como se usa en el presente documento, VEGF, también conocido como factor de permeabilidad vascular, es un factor de crecimiento angiogénico. VEGF es una glucoproteína homodimérica de 45 kDa que existe en al menos tres isoformas diferentes. Las isoformas de VEGF se expresan en célula endoteliales. El gen de VEGF contiene 8 exones que expresan una isoforma de la proteína de 189 aminoácidos. Una isoforma de 165 aminoácidos carece de los residuos codificados por el exón 6, mientras que una isoforma de 121 aminoácidos carece de los residuos codificados por los exones 6 y 7. VEGF145 es una isoforma predicha que contiene 145 aminoácidos y que carece del exón 7. VEGF puede actuar sobre células endoteliales uniéndose a un receptor tirosina quinasa endotelial, tal como Flt-1 (VEGFR-1) o KDR/flk-1 (VEGFR-2). VEGFR-2 se expresa en células endoteliales y está implicada en diferenciación de células endoteliales y vasculogénesis. Un tercer receptor, VEGFR-3 se ha implicado en linfogénesis.

Las varias isoformas tienen diferentes actividades biológicas e implicaciones clínicas. Por ejemplo, VEGF145 induce angiogénesis y como VEGF189 (pero a diferencia de VEGF165) VEGF145 se une eficazmente a la matriz extracelular por un mecanismo que no depende en sulfatos de heparina asociados a la matriz celular. VEGF muestra actividad como un mitógeno de células endoteliales y quimioatrayente *in vitro* e induce permeabilidad vascular y angiogénesis *in vivo*. VEGF se secreta por una amplia variedad de tipos celulares cancerosos y fomenta el crecimiento de tumores induciendo el desarrollo de vasculatura asociada a tumores. Se ha mostrado que la inhibición de la función de VEGF limita tanto el crecimiento de tumores experimentales primarios así como la incidencia de metástasis en ratones inmunosuprimidos. Se describen varios ARNbc dirigidos a VEGF en las solicitudes en tramitación junto a esta en EE UU con número de serie 11/078.073 y 11/340.080, incorporados en el presente documento mediante referencia).

Como se usa en el presente documento, el término “hebra que comprende una secuencia” se refiere a un oligonucleótido que comprende una cadena de nucleótidos que se describe por la secuencia referida usando la nomenclatura estándar de nucleótidos.

Como se usa en el presente documento, y a menos que se indique de otra manera, el término “complementaria”, cuando se usa para describir una primera secuencia de nucleótidos en relación a una segunda secuencia de nucleótidos, se refiere a la capacidad de un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos para hibridar y formar una estructura dúplex en ciertas condiciones con un oligonucleótido o

polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos, como entenderá el experto en la materia. Tales condiciones pueden, por ejemplo, ser condiciones rigurosas, donde condiciones rigurosas pueden incluir: NaCl 400 mM, PIPES 40 mM pH 6,4, EDTA 1 mM, a 50°C o 70°C durante 12-16 horas seguido por lavado. Se pueden aplicar otras condiciones, tal como condiciones fisiológicamente relevantes como se pueden encontrar dentro de un organismo. El experto en la materia podrá determinar el conjunto de condiciones más apropiadas para un ensayo de complementariedad de dos secuencias según la aplicación final de los nucleótidos hibridados.

Esto incluye apareamiento de bases del oligonucleótido o polinucleótido que comprende una primera secuencia con el oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos a lo largo la longitud entera de la primera y segunda secuencia de nucleótidos. Tales secuencias se pueden denominar como “completamente complementarias” una respecto a la otra en el presente documento. Sin embargo, donde una primera secuencia se denomina “sustancialmente complementaria” con respecto a una segunda secuencia en el presente documento, las dos secuencias pueden ser completamente complementarias, o pueden formar uno o más, pero generalmente no más de 4, 3 o 2 pares de bases mal apareados tras la hibridación, mientras que retienen la capacidad de hibridar en las condiciones más relevantes a su aplicación final. Sin embargo, donde dos nucleótidos se diseñan para formar, tras la hibridación, una o más proyecciones monocatenarias, tales proyecciones no se deben considerar como malos apareamientos con respecto a la determinación de complementariedad. Por ejemplo, un ARNbc que comprende un oligonucleótido de 21 nucleótidos de longitud y otro oligonucleótido de 23 nucleótidos de longitud, en donde el oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es completamente complementaria al oligonucleótido más corto, se puede aún denominar “completamente complementaria” para los fines de la invención.

Secuencias “complementarias”, como se usa en el presente documento, también puede incluir, o estar formadas enteramente de, pares de bases no de Watson-Crick y/o pares de bases formadas de nucleótidos no naturales y modificados, en tanto que los requisitos anteriores con respecto a su capacidad para hibridar se satisfagan.

Los términos “complementaria”, “completamente complementaria” y “sustancialmente complementaria” en el presente documento se pueden usar con respecto a la coincidencia de bases entre la hebra sentido y la hebra antisentido de un ARNbc, como se entenderá del contexto de su uso.

Como se usa en el presente documento, un polinucleótido que es “sustancialmente complementario a al menos parte de” un ARN mensajero (ARNm) se refiere a un polinucleótido que es sustancialmente complementario a una porción contigua del ARNm de interés (por ejemplo, que codifica Eg5). Por ejemplo, un polinucleótido es complementario a al menos una parte de un ARNm de Eg5 si la secuencia es sustancialmente complementaria a una porción no interrumpida de un ARNm que codifica Eg5.

El término “ARN bicatenario” o “ARNbc”, como se usa en el presente documento, se refiere a un complejo de moléculas de ácido ribonucleico, que tienen una estructura de dúplex que comprende dos hebras de ácido nucleico antiparalelas y sustancialmente complementarias, como se ha definido anteriormente. Las dos hebras que forman la estructura de dúplex pueden ser porciones diferentes de una molécula de ARN más larga, o pueden ser moléculas de ARN separadas. Donde las dos hebras son parte de una molécula más larga, y por tanto están conectadas por una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva formando una estructura de dúplex, la cadena de ARN que conecta se denomina un “bucle en horquilla”. Donde las dos hebras están conectadas covalentemente por medios diferentes de una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva que forman la estructura de dúplex, la estructura conectora se denomina un “enlazador”. Las hebras de ARN pueden tener el mismo número o uno diferente de nucleótidos. El número máximo de pares de bases es el número de nucleótidos en la hebra más corta del ARNbc menos cualquier proyección que esté presente en el dúplex. Además de la estructura de dúplex, un ARNbc puede comprender una o más proyecciones de nucleótidos.

Como se usa en el presente documento, una “proyección de nucleótidos” se refiere al nucleótido o nucleótidos no apareado(s) que sobresalen de la estructura de dúplex de un ARNbc cuando un extremo 3' de una hebra del ARNbc se extiende más allá del extremo 5' de la otra hebra, o viceversa. “Romo” o “extremo romo” significa que no nucleótidos no apareados en ese extremo del ARNbc, es decir, sin proyecciones de nucleótidos. Un ARNbc “de extremos romos” es un ARNbc que es bicatenario a lo largo su longitud entera, es decir, sin proyecciones de nucleótidos en ningún extremo de la molécula.

El término “hebra antisentido” se refiere a la hebra de un ARNbc que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una secuencia diana. Como se usa en el presente documento, el término “región de complementariedad” se refiere a la región en la hebra antisentido que es sustancialmente complementaria a una secuencia, por ejemplo, una secuencia diana, como se define en el presente documento. Donde la región de complementariedad no es completamente complementaria a la secuencia diana, los malos apareamientos se toleran más en las regiones terminales y, si están presentes, están generalmente en una región o regiones terminal(es), por ejemplo, a 6, 5, 4, 3 o 2 nucleótidos del extremo 5' y/o 3'.

El término “hebra sentido”, como se usa en el presente documento, se refiere a la hebra de un ARNbc que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una región de la hebra antisentido.

“Introducir en una célula”, cuando se refiere a un ARNbc, significa facilitar la captación o absorción en la célula, como entienden los expertos en la materia. La absorción o captación de ARNbc se puede producir mediante procesos celulares de difusión sin ayuda o activos, o por agentes o dispositivos auxiliares. El significado de este término no está limitado a células in vitro; un ARNbc también se puede “introducir en una célula”, en donde la célula es parte de un organismo vivo. En tales casos, la introducción en la célula incluirá la administración al organismo. Por ejemplo, para la administración in vivo, se puede inyectar el ARNbc en un sitio tisular o administrar por vía sistémica. La introducción in vitro en una célula incluye métodos conocidos en la técnica tal como electroporación y lipofección.

Los términos “silenciar” e “inhibir la expresión de”, en cuanto se refieren al gen Eg5, en el presente documento se refiere a la supresión al menos parcial de la expresión del gen Eg5, manifestada por una reducción de la cantidad de ARNm transcrito del gen Eg5 que se puede aislar de una primera célula o grupo de células en las que el gen Eg5 se transcribe y que se ha o han tratado de modo que la expresión del gen Eg5 se inhibe, comparado con una segunda célula o grupos de células sustancialmente idénticas a la primera célula o grupo de células pero que no se ha o han tratado así (células control). El grado de inhibición habitualmente se expresa en términos de

$$\frac{(\text{ARNm en células control}) - (\text{ARNm en células tratadas})}{(\text{ARNm en células control})} \bullet 100\%$$

Alternativamente, el grado de inhibición se puede dar en términos de una reducción de un parámetro que está funcionalmente unido a la transcripción del gen Eg5, por ejemplo, la cantidad de proteína codificada por el gen Eg5 que se secreta por una célula, o el número de células que muestran un cierto fenotipo, por ejemplo, apoptosis. En principio, el silenciamiento del gen Eg5 se puede determinar en cualquier célula que expresa la diana, sea constitutivamente o por ingeniería genómica, y por cualquier ensayo apropiado. Sin embargo, cuando se necesita una referencia para determinar si un ARNbc determinado inhibe la expresión del gen Eg5 en un cierto grado y por tanto está abarcado por la presente invención, el ensayo proporcionado en los ejemplos posteriormente sirve como tal referencia.

Por ejemplo, en ciertos casos, la expresión del gen Eg5 (o gen VEGF) se suprime en al menos aproximadamente el 20%, el 25%, el 35% o el 50% por la administración del oligonucleótido bicatenario de la invención. El gen Eg5 se puede suprimir en al menos aproximadamente el 60%, el 70% o el 80% por la administración del oligonucleótido bicatenario de la invención. En algunas formas de realización, el gen Eg5 se suprime en al menos aproximadamente el 85%, el 90% o el 95% por la administración del oligonucleótido bicatenario de la invención. Las tablas 1-3 proporcionan valores para la inhibición de la expresión usando varias moléculas de ARNbc de Eg5 en varias concentraciones.

Como se usa en el presente documento en el contexto de la expresión de Eg5, los términos “tratar”, “tratamiento”, y similares, se refieren al alivio de o paliación de procesos patológicos mediados por la expresión de Eg5. En el contexto de la presente invención en tanto que se refiere a cualquiera de las otras afecciones enumeradas en el presente documento posteriormente (diferentes que los procesos patológicos mediados por la expresión de Eg5), los términos “tratar”, “tratamiento”, y similares, significan aliviar o paliar al menos un síntoma asociado con tal afección, o ralentizar o invertir la progresión de la afección, tal como la ralentización y progresión de carcinoma hepático.

Como se usa en el presente documento, las frases “cantidad terapéuticamente eficaz” y “cantidad profilácticamente eficaz” se refieren a una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento, prevención o control de procesos patológicos mediados por la expresión de Eg5 o un síntoma evidente de procesos patológicos mediados por la expresión de Eg5 (solo o en combinación con la expresión de VEGF). La cantidad específica que es terapéuticamente eficaz la puede determinar fácilmente el médico habitual, y puede variar dependiendo de factores conocidos en la técnica, tal como, por ejemplo, el tipo de procesos patológicos mediados por la expresión de Eg5, los antecedentes y la edad del paciente, el estadio de los procesos patológicos mediados por la expresión de Eg5, y la administración de otros agentes anti-procesos patológicos mediados por la expresión de Eg5.

Como se usa en el presente documento, una “composición farmacéutica” comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de un ARNbc y un soporte farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, “cantidad farmacológicamente eficaz”, “cantidad terapéuticamente eficaz” o simplemente “cantidad eficaz” se refiere a esa cantidad de un ARN eficaz para producir el resultado farmacológico, terapéutico o preventivo pretendido. Por ejemplo, si un tratamiento clínico dado se considera eficaz cuando al menos una reducción del 25% en un parámetro medible asociado con una enfermedad o trastorno, una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco para el tratamiento de esa enfermedad o trastorno es la cantidad necesaria para efectuar al menos una reducción del 25% en ese parámetro.

El término “soporte farmacéuticamente aceptable” se refiere a un soporte para la administración de un agente terapéutico. Tales soportes incluyen, pero no están limitados a, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol, y combinaciones de los mismos. El término específicamente excluye medio de cultivo celular.

Para fármacos administrados por vía oral, los soportes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitados a excipientes farmacéuticamente aceptables tal como diluyentes inertes, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y conservantes. Los diluyentes inertes incluyen carbonato de sodio y calcio, fosfato de sodio y calcio, y lactosa, mientras que almidón de maíz y ácido alginico son agentes disgregantes adecuados. Los agentes aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina, mientras que el agente lubricante, si está presente, generalmente será estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, los comprimidos se pueden recubrir con un material tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, para retrasar la absorción en el aparato digestivo.

Como se usa en el presente documento, una "célula transformada" es una célula en la que se ha introducido un vector a partir del cual se puede expresar una molécula de ARNbc.

II. Ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc)

En una forma de realización, la invención proporciona moléculas de ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) como se definen en las reivindicaciones para inhibir la expresión del gen Eg5 (solo o en combinación con un segundo ARNbc para inhibir la expresión de VEGF) en una célula o mamífero, en donde el ARNbc comprende una hebra antisentido que comprende una región de complementariedad que es complementaria a al menos una parte de un ARNm formado en la expresión del gen Eg5, y en donde la región de complementariedad tiene menos de 30 nucleótidos de longitud, generalmente de 19-24 nucleótidos de longitud, y en donde dicho ARNbc, tras el contacto con una célula que expresa dicho gen Eg5, inhibe la expresión de dicho gen Eg5 en al menos el 40%. El ARNbc comprende dos hebras de ARN que son lo suficientemente complementarias para hibridar para formar una estructura dúplex. Una hebra del ARNbc (la hebra antisentido) comprende una región de complementariedad que es completamente complementaria a la secuencia diana anteriormente definida, derivada de la secuencia de un ARNm formado durante la expresión del gen Eg5, la otra hebra (la hebra sentido) comprende una región que es complementaria a la hebra antisentido, de modo que la dos hebras hibridan y forman una estructura dúplex cuando se combinan en condiciones adecuadas. Generalmente, la estructura dúplex tiene entre 15 y 30, más generalmente entre 18 y 25, aún más generalmente entre 19 y 24 y lo más generalmente entre 19 y 21 pares de bases de longitud. Similarmente, la región de complementariedad de la secuencia diana tiene entre 15 y 30, más generalmente entre 18 y 25, aún más generalmente entre 19 y 24 y lo más generalmente entre 19 y 21 nucleótidos de longitud. El ARNbc de la invención puede comprender además una o más proyección(es) de nucleótidos monocatenaria(s). El ARNbc se puede sintetizar por métodos estándar conocidos en la técnica como se comenta posteriormente, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado, tal como los que están comercialmente disponibles de, por ejemplo, Biosearch, Applied Biosystems, Inc. En una forma de realización preferida, el gen Eg5 es el gen Eg5 humano. En formas de realización específicas, la primera secuencia es la secuencia de SEQ ID NO: 135 y la segunda secuencia es la secuencia de SEQ ID NO: 136. Agentes antisentido alternativos que se dirigen a algún otro sitio en la secuencia diana proporcionados en las tablas 1-3 se pueden determinar fácilmente usando la secuencia diana y la secuencias que flanquea Eg5. En formas de realización que usan un segundo ARNbc que se dirige a VEGF, tales agentes se ejemplifican en los ejemplos y en las solicitudes en EE UU en tramitación junto a esta con números de serie: 11/078.073 y 11/340.080.

También se describe un ARNbc que comprende al menos dos secuencias de nucleótidos seleccionadas de los grupos de secuencias proporcionadas en las tablas 1-3. Una de las dos secuencias es complementaria a la otra de las dos secuencias, siendo una de las secuencias sustancialmente complementaria a una secuencia de un ARNm generado en la expresión del gen Eg5. Como tal, el ARNbc comprenderá dos oligonucleótidos, en donde un oligonucleótido se describe como la hebra sentido en las tablas 1-3 y el segundo oligonucleótido se describe como la hebra antisentido en las tablas 1-3.

El experto en la materia sabe bien que los ARNbc que comprenden una estructura dúplex de entre 20 y 23, pero específicamente 21, pares de bases se han considerado como particularmente eficaces en inducir interferencia por ARN (Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888). Sin embargo, otros han encontrado que ARNbc más cortos o más largos también pueden ser eficaces. En las formas de realización descritas anteriormente, en virtud de la naturaleza de las secuencias de oligonucleótidos proporcionadas en las tablas 1-3, los ARNbc de la invención pueden comprender al menos una hebra de una longitud de mínimamente 21 nt. Se puede esperar razonablemente que ARNbc más cortos que comprenden una de las secuencias de las tablas 1-3 menos solo unos pocos nucleótidos en uno o ambos extremos sean similarmente eficaces comparados con los ARNbc descritos anteriormente. Por tanto, ARNbc que comprenden una secuencia parcial de al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más nucleótidos contiguos de una de las secuencias de las tablas 1-3, y que se diferencian en su capacidad para inhibir la expresión del gen Eg5 en un ensayo de FACS como se describe en el presente documento posteriormente en no más del 5, 10, 15, 20, 25, o 30% de inhibición de un ARNbc que comprende la secuencia completa, están contemplados por la invención. ARNbc adicionales que cortan en la secuencia diana proporcionada en las tablas 1-3 se pueden hacer fácilmente usando la secuencia Eg5 y la secuencia diana proporcionada.

Además, los agentes de iARN proporcionados en las tablas 1-3 identifican un sitio en el ARNm de Eg5 que es susceptible a corte basado en iARN. Se describen además agentes de iARN que se dirigen dentro de la secuencia diana por uno de los agentes de la presente invención. Como se usa en el presente documento se dice que un

segundo agente de iARN se dirige a la secuencia de un primer agente de iARN si el segundo agente de iARN corta el mensajero en cualquier lugar en el ARNm que es complementario a la hebra antisentido del primer agente de iARN. Tal segundo agente generalmente consistirá en al menos 15 nucleótidos contiguos de una de las secuencias proporcionadas en las tablas 1-3 acoplado a secuencias de nucleótidos adicionales tomadas de la región contigua a la secuencia seleccionada en el gen Eg5. Por ejemplo, los últimos 15 nucleótidos de SEQ ID NO: 1 combinados con los siguientes 6 nucleótidos del gen diana Eg5 produce un agente monocatenario de 21 nucleótidos que se basa en una de las secuencias proporcionadas en las tablas 1-3.

Se describe un ARNbc que contiene uno o más malos apareamientos respecto a la secuencia diana. Tal ARNbc de la invención puede contener no más de 3 malos apareamientos. Si la hebra antisentido del ARNbc contiene malos apareamientos respecto a la secuencia diana, es preferible que el área de mal apareamiento no esté localizada en el centro de la región de complementariedad. Si la hebra antisentido del ARNbc contiene malos apareamientos respecto a la secuencia diana, es preferible que el mal apareamiento se restrinja a 5 nucleótidos desde cualquier extremo, por ejemplo, 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótido desde bien el extremo 5' o 3' de la región de complementariedad. Por ejemplo, para una hebra de ARNbc de 23 nucleótidos que es complementaria a una región del gen Eg5, el ARNbc generalmente no contiene ningún mal apareamiento en los 13 nucleótidos centrales. Los métodos descritos en la invención se pueden usar para determinar si un ARNbc que contiene un mal apareamiento a una secuencia diana es eficaz en inhibir la expresión del gen Eg5. La consideración de la eficacia de los ARNbc con malos apareamientos en inhibir la expresión del gen Eg5 es importante, especialmente si la región particular de complementariedad en el gen Eg5 se sabe que tiene variación de secuencia polimórfica en la población.

En una forma de realización, al menos un extremo del ARNbc tiene una proyección de nucleótidos monocatenaria de 1 a 4, generalmente 1 o 2 nucleótidos. Los ARNbc que tienen al menos una proyección de nucleótidos tienen inesperadamente propiedades inhibitorias superiores que sus homólogos de extremos romos. Además, los presentes inventores han descubierto que la presencia de solo una proyección de nucleótidos refuerza la actividad de interferencia del ARNbc, sin afectar a su estabilidad global. El ARNbc que tiene solo una proyección se ha demostrado particularmente estable y eficaz in vivo, así como en una variedad de células, medios de cultivo de células, sangre y suero. Generalmente, la proyección monocatenaria está localizada en el extremo 3' terminal de la hebra antisentido o, alternativamente, en el extremo 3' terminal de la hebra sentido. El ARNbc también puede tener un extremo romo, generalmente localizado en el extremo 5' de la hebra antisentido. Tales ARNbc tienen estabilidad y actividad inhibitoria mejoradas, permitiendo de esta manera la administración de dosis bajas, es decir, menos de 5 mg/kg de peso corporal del receptor al día. Generalmente, la hebra antisentido del ARNbc tiene una proyección de nucleótidos en el extremo 3', y el extremo 5' es romo. En otra forma de realización, uno o más nucleótidos en la proyección se sustituyen con un nucleósido tiofosfato.

En aun otra forma de realización, el ARNbc se modifica químicamente para mejorar la estabilidad. Los ácidos nucleicos de la invención se pueden sintetizar y/o modificar por métodos bien establecidos en la técnica, tal como los descritos en "Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, EE UU, que se incorpora al presente documento mediante referencia. Los ejemplos específicos de compuestos de ARNbc preferidos útiles en esta invención incluyen ARNbc que contienen esqueletos modificados o enlaces internucleosídicos no naturales. Como se define en esta especificación, los ARNbc que tienen esqueletos modificados incluyen los que retienen un átomo de fósforo en el esqueleto y los que no tienen un átomo de fósforo en el esqueleto. Para los fines de esta especificación, y como algunas veces se hace referencia en la técnica, los ARNbc modificados que no tienen un átomo de fósforo en su esqueleto también se puede considerar que son oligonucleósidos.

Los esqueletos de ARNbc modificados preferidos incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil u otros alquil fosfonatos, incluyendo 3'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fofinatos, fosforamidatos, incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos unidos por 2'-5' de estos, y los que tienen polaridad invertida en donde los pares adyacentes de unidades de nucleósido están unidas de 3'-5' a 5'-3' o de 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen varias sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Las patentes en EE UU representativas que enseñan la preparación de los enlaces que contienen fósforo anteriores incluyen, pero no están limitadas a, las patentes en EE UU Nos. 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.195; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.316; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; y 5.625.050.

Los esqueletos de ARNbc modificados preferidos que no incluyen un átomo de fósforo en los mismos incluyen esqueletos que se forman por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomos mixtos y enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen los que tienen enlaces morfolino (formados en parte de la porción de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilenformacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alqueno;

esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenimino y metilenhidracino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes de componentes de N, O, S y CH₂ mezcladas.

Las patentes en EE UU representativas que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero no están limitadas a, las patentes en EE UU Nos. 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.64.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

En otros miméticos de ARNbc preferidos, tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleósido se sustituyen con grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico adecuado. Uno de tales compuestos oligoméricos, un mimético de ARNbc que se ha mostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se denomina ácido peptidonucleico (APN). En compuestos APN, el esqueleto de azúcar de un ARNbc se sustituye por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases se retienen y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción amida del esqueleto. Las patentes en EE UU representativas que enseñan la preparación de compuestos APN incluyen, pero no están limitadas a, las patentes en EE UU Nos. 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Se pueden encontrar enseñanzas adicionales de compuestos APN en Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

Las formas de realización más preferidas de la invención son ARNbc con esqueletos de fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos de heteroátomos, y en particular --CH₂--NH--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--O--CH₂-- [conocido como un esqueleto metilén (metilimino) o MMI], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- y --N(CH₃)--CH₂--CH₂-- [en donde el esqueleto fosfodiéster nativo está representado como --O--P--O--CH₂--] de la anteriormente referenciada patente en EE UU No. 5.489.677, y los esqueleto amida de la anteriormente referenciada patente en EE UU No. 5.602.240. También son preferidos ARNbc que tienen estructuras de esqueleto de morfolino de la anteriormente referenciada patente en EE UU No. 5.034.506.

Los ARNbc modificados también pueden contener una o más fracciones de azúcar modificado. Los ARNbc preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S- o N-alquénilo; O-, S- o N-alquínilo; u O-alquil-O-alquilo, en donde el alquilo, alquénilo o alquínilo pueden ser alquilo de C₁ a C₁₀ o alquénilo y alquínilo de C₂ a C₁₀ sustituido o sin sustituir. Particularmente preferidos son O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros ARNbc preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior de C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo que corta ARN, un grupo indicador, un intercalante, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un ARNbc, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un ARNbc, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietil) o 2'-MOE) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504) es decir, un grupo alcoxi-alcoxi. Una modificación preferida adicional incluye 2'-dimetilaminoetoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos posteriormente, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂, también descrito en los ejemplos posteriormente.

Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluoro (2'-F). También se pueden hacer modificaciones similares en otras porciones del ARNbc, particularmente en la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal o en los ARNbc unidos por 2'-5' y la posición 5' del nucleótido 5' terminal. Los ARNbc también pueden tener miméticos de azúcar tal como fracciones ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranilo. Las patentes en EE UU representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificado incluyen, pero no están limitadas a, las patentes en EE UU No. 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; y 5.700.920.

Los ARNbc también pueden incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (con frecuencia denominadas en la técnica simplemente "base"). Como se usa en el presente documento, nucleobases "sin modificar" o "naturales" incluye las bases de purina adenina (A) y guanina (G) y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tal como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propil y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquil, 8-hidroxil y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometil y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-daazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Nucleobases adicionales incluyen las divulgadas en la patente en EE UU No. 3.687.808, las divulgadas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. L., ed. John Wiley & Sons, 1990, las divulgadas por Englisch et al., Angewandte Chemie, Edición Internacional, 1991, 30, 613, y las divulgadas

por Sanghvi, Y S., capítulo 15, DsRNA Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Ciertas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 grados C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. y Lebleu, B., Eds., DsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y son actualmente sustituciones de bases preferidas, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo.

Las patentes en EE UU representativas que enseñan la preparación de ciertas de las nucleobases modificadas indicadas anteriormente así como otras nucleobases modificadas incluyen, pero no están limitadas a, la anteriormente indicada patente en EE UU No. 3.687.808, así como las patentes en EE UU Nos. 4.845.205; 5.130.30; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121, 5.596.091; 5.614.617; 5.681.941, y la patente en EE UU no. 5.750.692.

Otra modificación de los ARNbc de la invención implica unir químicamente al ARNbc una o más fracciones o conjugados que aumentan la actividad, distribución celular o captación celular del ARNbc. Tales fracciones incluyen, pero no están limitadas a fracciones lipídicas tal como una fracción de colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 199, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Let., 1994 4 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, beril-S-tritilol (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Let., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., EMBO J, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-Hfosfonato de trietil-amonio (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), o ácido adamantano acético (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), un fracción de palmitilo (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), o una fracción octadecilamina o hexilamino-carboniloxicolessterol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937).

Las patentes en EE UU representativas que enseñan la preparación de tales conjugados de ARNbc incluyen, pero no están limitadas a, las patentes en EE UU Nos. 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

No es necesario para todas las posiciones en un compuesto determinado estar uniformemente modificadas, y de hecho más de una de las modificaciones anteriormente mencionadas se puede incorporar en un único compuesto o incluso en único nucleósido en un ARNbc. La presente invención también incluye compuestos de ARNbc que son compuestos químicos. Compuestos de ARNbc "químicos" o "quimeras", en el contexto de esta invención, son compuestos de ARNbc, particularmente ARNbc, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una hecha de al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de ARNbc. Estos ARNbc típicamente contienen al menos una región en donde el ARNbc está modificado de modo que confiere al ARNbc resistencia aumentada a la degradación por nucleasas, captación celular aumentada y/o afinidad de unión aumentada por el ácido nucleico diana. Una región adicional del ARNbc puede servir como una sustancia para enzimas capaces de cortar híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que corta la hebra de ARN de un dúplex ARN:ADN. La activación de la RNasa H, por tanto, produce el corte de ARN diana, aumentando mucho de esta manera la eficacia de la inhibición por ARNbc de la expresión génica. Por consiguiente, con frecuencia se pueden obtener resultados similares con ARNbc más cortos cuando se usan ARNbc quiméricos comparados con desoxiARNbc de fosforotioato que hibridan con la misma región diana. El corte del ARN diana se puede detectar rutinariamente por electroforesis en gel y, si es necesario, métodos de hibridación de ácidos nucleicos asociados conocidos en la técnica.

En ciertos casos, el ARNbc se puede modificar por un grupo no ligando. Se han conjugado un número de moléculas no ligando a ARNbc para aumentar la actividad, distribución celular o captación celular del ARNbc, y los procedimientos para realizar tales conjugaciones están disponibles en la bibliografía científica. Tales fracciones no ligando han incluido fracciones lipídicas, tal como una fracción de colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 199, 86, 6553), ácido cólico (Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Let., 1994, 4: 1053), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660: 306; Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Let., 1993, 3: 2765), un tiocolesterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20: 533), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., EMBO J, 1991, 10: 1111; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259: 327; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75: 49), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietil-amonio (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995,

36: 3651; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18: 3777), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14: 969), o ácido adamantano acético (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36: 3651), un fracción de palmitilo (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264: 229), o una fracción octadecilamina o hexilamino-carboniloxicolessterol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277: 923). Las patentes en EE UU representativas que enseñan la preparación de tales conjugados de ARNbc se han enumerado anteriormente. Los protocolos de conjugación típicos implican la síntesis de ARNbc que llevan un enlazador amino en una o más posiciones de la secuencia. El grupo amino se hace reaccionar después con la molécula que se conjuga usando reactivos de acoplamiento o activación adecuados. La reacción de conjugación se puede realizar bien con el ARNbc aún unido al soporte sólido o después de cortar el ARNbc en fase solución. La purificación de conjugado de ARNbc por HPLC típicamente da el conjugado puro.

Agentes de iARN codificados por vector

El ARNbc de la invención también se puede expresar de vectores víricos recombinantes intracelularmente in vivo. Los vectores víricos recombinantes de la invención comprenden secuencias que codifican el ARNbc de la invención y cualquier promotor adecuado para expresar las secuencias del ARNbc. Los promotores adecuados incluyen, por ejemplo, las secuencias del promotor de ARN pol III U6 o H1 y el promotor del citomegalovirus. La selección de otros promotores adecuados está dentro de la capacidad en la técnica. Los vectores víricos recombinantes de la invención también pueden comprender promotores inducibles o regulables para la expresión del ARNbc en un tejido particular o en un medio intracelular particular. El uso de vectores víricos recombinantes para administrar ARNbc de la invención a células in vivo se comenta en más detalle posteriormente.

El ARNbc de la invención se puede expresar de un vector vírico recombinante bien como dos moléculas separadas complementarias de ARN, o como una única molécula de ARN con dos regiones complementarias.

Se puede usar cualquier vector vírico capaz de aceptar las secuencias codificantes de la(s) molécula(s) de ARNbc que se van a expresar, por ejemplo, vectores derivados de adenovirus (AV), virus adenoasociados (AAV); retrovirus (por ejemplo, lentivirus (LV), rhabdovirus, virus de la leucemia murina); virus del herpes, y similares. El tropismo de los vectores víricos se puede modificar pseudotipando los vectores con proteínas de la envuelta u otros antígenos de superficie de otros virus, o sustituyendo diferentes proteínas de cápside vírica, según sea apropiado.

Por ejemplo, los vectores lentivíricos de la invención se pueden pseudotipar con proteínas de superficie del virus de la estomatitis vesicular (VSV), rabia, Ébola, Mokola, y similares. Se puede hacer que los vectores AAV de la invención se dirijan a diferentes células manipulando los vectores para expresar diferentes serotipos de proteínas de la cápside. Por ejemplo, un vector AAV que expresa una cápside de serotipo 2 en un genoma de serotipo 2 se llama AAV 2/2. Este gen de la cápside de serotipo 2 en el vector AAV 2/2 se puede sustituir por un gen de cápside de serotipo 5 para producir un vector AAV 2/5. Las técnicas para construir vectores AAV que expresan diferentes serotipos de proteínas de la cápside están en las capacidades en la técnica; véase, por ejemplo, Rabinowitz J E et al. (2002), J Virol 76:791-801, cuya divulgación entera se incorpora al presente documento mediante referencia.

La selección de vectores víricos recombinantes adecuados para su uso en la invención, métodos para insertar secuencias de ácidos nucleicos para expresar el ARNbc en el vector, y métodos de administrar el vector vírico a las células de interés están en las capacidades en la técnica. Véase, por ejemplo, Dornburg R (1995), Gene Therap. 2: 301-310; Eglitis M A (1988), Biotechniques 6: 608-614; Miller A D (1990), Hum Gene Therap. 1: 5-14; Anderson W F (1998), Nature 392: 25-30; y Robinson D A et al., Nat. Genet. 33: 401-406, cuyas divulgaciones enteras se incorporan al presente documento mediante referencia.

Los vectores víricos preferidos son los derivados de AV y AAV. En una forma de realización particularmente preferida, el ARNbc de la invención se expresa como dos moléculas separadas, complementarias de ARN monocatenario de un vector AAV recombinante que comprende, por ejemplo el promotor de ARN U6 o H1, o el promotor del citomegalovirus (CMV).

Un vector AV adecuado para expresar el ARNbc de la invención, un método para construir el vector AV recombinante y un método para administrar el vector en células diana, se describen en Xia H et al. (2002), Nat. Biotech. 20: 1006-1010.

Los vectores AAV adecuados para expresar el ARNbc de la invención, métodos para construir el vector AV recombinante y métodos para administrar los vectores en células diana, se describen en Samulski R et al. (1987), J. Virol. 61: 3096-3101; Fisher K J et al. (1996), J. Virol. 70: 520-532; Samulski R et al. (1989), J. Virol. 63: 3822-3826; patente en EE UU No. 5.252.479; patente en EE UU No. 5.139.941; solicitud de patente internacional No. WO 94/13788; y solicitud de patente internacional No. WO 93/24641, cuyas divulgaciones enteras se incorporan al presente documento mediante referencia.

III. Composiciones farmacéuticas que comprenden ARNbc

En una forma de realización, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un ARNbc, como se describe en el presente documento, y un soporte farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica que comprende el ARNbc es útil para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o actividad del gen Eg5, tal como procesos patológicos mediados por la expresión de Eg5. Tales composiciones farmacéuticas se formulan basadas en el modo de administración. Un ejemplo es composiciones que se formulan para la administración sistémica a través de administración parenteral.

En otra forma de realización, tales composiciones comprenderán además un segundo ARNbc que inhibe la expresión de VEGF. Se describen ARNbc dirigidos a VEGF en los ejemplos y las solicitudes en EE UU en tramitación junto a esta con número de serie: 11/078.073 y 11/340.080.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se van a administrar en dosis suficientes para inhibir la expresión del gen Eg5 (y la expresión de VEGF cuando un segundo ARNbc se incluye). En general, una dosis adecuada de ARNbc estará en el intervalo de 0,01 a 5,0 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor al día, generalmente en el intervalo de 1 microgramo a 1 mg por kilogramo de peso corporal al día. La composición farmacéutica se puede administrar una vez al día o el ARNbc se puede administrar como dos, tres o más subdosis a intervalos apropiados a lo largo del día o incluso usando infusión continua o administración mediante una formulación de liberación controlada. En ese caso, el ARNbc contenido en cada subdosis debe ser correspondientemente menor para alcanzar la dosis diaria total. La forma farmacéutica también puede estar compuesta para administrar durante varios días, por ejemplo, usando una formulación de liberación sostenida convencional que proporciona liberación sostenida del ARNbc durante un periodo de varios días. Las formulaciones de liberación sostenida se conocen bien en la técnica y son particularmente útiles para la administración de agentes en un sitio particular, tal como se podría usar con los agentes de la presente invención. En esta forma de realización, la forma farmacéutica contiene un múltiplo correspondiente de la dosis diaria.

El experto en la materia apreciará que ciertos factores pueden influir la dosis y cadencia requeridas para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo, pero no limitados a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición puede incluir un tratamiento único o una serie de tratamientos. Se pueden hacer estimaciones de dosis eficaces y semividas in vivo para los ARNbc individuales abarcados por la invención usando metodologías convencionales o en base de pruebas in vivo usando un modelo animal apropiado, como se describe en otra parte en el presente documento.

Los avances en genética en ratones han generado un número de modelos de ratón para el estudio de varias enfermedades humanas, tal como procesos patológicos mediados por la expresión de Eg5. Tales modelos se usan para el ensayo in vivo de ARNbc, así como para determinar una dosis terapéuticamente eficaz.

La presente invención también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos de ARNbc de la invención. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar en un número de maneras dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y según el área que se va a tratar. La administración puede ser tópica, pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo intratecal o intraventricular.

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables soportes farmacéuticos convencionales, acuosos, polvo o bases oleaginosas, espesantes y similares. También pueden ser útiles condones, guantes recubiertos y similares. Las formulaciones tópicas preferidas incluyen esas en las que los ARNbc de la invención están en mezcla con un agente de administración tópica tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Los lípidos y liposomas preferidos incluyen neutros (por ejemplo, dioleoilfosfatidil DOPE etanolamina, dimiristoilfosfatidil colina DMPC, distearoilfosfatidil colina) negativos (por ejemplo, dimiristoilfosfatidil glicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo, dioleoiltrimetilaminopropil DOTAP y dioleoilfosfatidil etanolamina DOTMA). Los ARNbc de la invención pueden estar encapsulados en liposomas o pueden formar complejos con ellos, en particular con liposomas catiónicos. Alternativamente, los ARNbc pueden estar en complejos con lípidos, en particular lípidos catiónicos. Los ácidos grasos y ésteres preferidos incluyen, pero no están limitados a, ácido araquidónico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido laurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazaciloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un éster de alquilo de C₁₋₁₀ (por ejemplo, isopropilmiristato IPM), monoglicérido, diglicérido o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Se describen formulaciones tópicas en detalle en la solicitud de patente en EE UU número de serie 09/315.298 presentada el 20 de mayo, 1999.

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para la administración oral incluyen polvos o gránulos, microparticulados, nanoparticulados, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas

- de gel, saquitos, comprimidos o minicomprimidos. Pueden ser deseables espesantes, agentes saborizantes, diluyentes, emulsionantes, ayudas de dispersión o aglutinantes. Las formulaciones orales preferidas son esas en las que los ARNbc de la invención se administran junto con uno o más potenciadores de penetración tensioactivos y quelantes. Los tensioactivos preferidos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Los ácidos/sales biliares preferidos incluyen ácido quenodesoxicólico (CDCA) y ácido ursodesoxiciquenodesoxicólico (UDCA), ácido cólico, ácido deshídrocólico, ácido desoxicólico, ácido glucólico, ácido glicólico, ácido glicodesoxicólico, ácido taucólico, ácido taurodesoxicólico, tauro-24,25-dihidrofusidato de sodio y glucodihidrofusidato de sodio. Los ácidos grasos preferidos incluyen ácido araquidónico, ácido undecanoico, ácido oleico, ácido laurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linoléico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un monoglicérido, un diglicérido o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos (por ejemplo, sodio). También son preferidas combinaciones de potenciadores de penetración, por ejemplos ácidos /sales grasos en combinación con ácidos /sales biliares. Una combinación particularmente preferida es la sal sódica de ácido laurico, ácido cáprico y UDCA. Los potenciadores de penetración adicionales incluyen polioxietileno-9-lauril éter, polioxietileno-20-cetil éter. Los ARNbc de la invención se pueden administrar por vía oral, en forma granular incluyendo partículas secas rociadas, o en complejo para formar micro o nanopartículas. Los agentes de acomplejar ARNbc incluyen poliaminoácidos; poliiminas; poliácridatos; polialquilacrilatos, polioxetanos, polialquilcianoacrilatos; gelatinas cationizadas, albúminas, almidones, acrilatos, polietilenglicoles (PEG) y almidones; polialquilcianoacrilatos; poliiminas derivadas con DEAE, pululanos, celulosas y almidones. Los agentes de acomplejamiento particularmente preferidos incluyen quitosano, N-trimetilquitosano, poli-L-lisina, polihistidina, poliornitina, poliesperminas, protamina, polivinilpiridina, politiodietilaminometileno P(TDAE), poliaminoestireno (por ejemplo, p-amino), poli(metilcianoacrilato), poli(etilcianoacrilato), poli(butílicoacrilato), poli(isobutílicoacrilato), poli(isohexilcianoacrilato), DEAE-metacrilato, DEAE-hexilacrilato, DEAE-acrilamida, DEAE-albúmina y DEAE-dextrano, polimetilacrilato, polihexilacrilato, poli(D,L-ácido láctico), poli(DL-ácido láctico-co-glicólico (PLGA), alginato, y polietilenglicol (PEG). Las formulaciones orales para ARNbc y su preparación se describen en detalle en la solicitud en EE UU número de serie 08/886.829 (presentada el 1 de julio, 1997), número de serie 09/108.673 (presentada el 1 de julio, 1998), número de serie 09/256.515 (presentada el 23 de febrero, 1999), número de serie 09/082.624 (presentada el 231 de mayo, 1998) y número de serie 09/315.298 (presentada el 20 de mayo, 1999).
- Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal, intraventricular o intrahepática pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tal como, pero no limitados a, potenciadores de penetración, compuestos soporte y otros soportes o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, soluciones, emulsiones, y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones se pueden generar de una variedad de componentes que incluyen, pero no están limitados a, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes. Particularmente preferidas son formulaciones que se dirigen al hígado cuando se tratan trastornos hepáticos tal como carcinoma hepático.
- Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que se pueden presentar convenientemente en formas farmacéuticas unitarias, se pueden preparar según técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen el paso de asociar los principios activos con el/los soporte(s) o excipiente(s) farmacéuticamente aceptable(s). En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme y estrechamente los principios activos con soportes líquidos o soportes sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto.
- Las composiciones de la presente invención se pueden formular en cualquiera de muchas posibles formas farmacéuticas tal como, pero no limitadas a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también se pueden formular como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.
- Emulsiones**
- Las composiciones de la presente invención se pueden preparar y formular como emulsiones. Las emulsiones son típicamente sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotitas que habitualmente superan 0,1 .mu.m de diámetro (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 199; Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, p. 245; Block en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 2, p. 335; Higuchi et al., en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Las emulsiones con frecuencia son sistemas bifásicos que comprenden dos fases líquidas inmiscibles mezcladas estrechamente y dispersadas una en otra. En general, las emulsiones pueden ser bien de la variedad de agua en aceite o de aceite en agua. Cuando una fase acuosa se divide finamente en y se dispersa como gotitas diminutas en una fase

oleaginoso voluminoso, la composición resultante se llama una emulsión de agua en aceite. Alternativamente, cuando la fase oleaginoso se divide finamente en y dispersa como gotitas diminutas en una fase acuosa voluminosa, la composición resultante se llama una emulsión de aceite en agua. Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersas, y el fármaco activo que puede como una solución bien en la fase acuosa, la fase oleaginoso o él mismo como una fase separada. También pueden estar presentes excipientes farmacéuticos, tal como emulsionantes, estabilizantes, tintes, y antioxidantes en emulsiones según sea necesario. Las emulsiones farmacéuticas también pueden ser emulsiones múltiples que están compuestas de más de dos fases tal como, por ejemplo, en el caso de emulsiones de aceite en agua en aceite y agua en aceite en agua. Tales formulaciones complejas con frecuencia proporcionan ciertas ventajas que las emulsiones binarias sencillas no. Las emulsiones múltiples en las que gotitas de aceite individuales de una emulsión de aceite en agua encierran pequeñas gotitas de agua constituyen una emulsión de agua en aceite en agua. Asimismo un sistema de gotitas de aceite encerradas en glóbulos de agua estabilizadas en una fase continua oleaginoso proporciona una emulsión de aceite en agua en aceite.

Las emulsiones se caracterizan por poca o ninguna estabilidad termodinámica. Con frecuencia, la fase dispersa o discontinua de la emulsión está bien dispersa en la fase externa o continua y se mantiene en esta forma por medio de emulsionantes o la viscosidad de la formulación. Cualquiera de las fases de la emulsión puede ser un semisólido o un sólido, como es el caso de la bases de pomadas estilo emulsión y cremas. Otros medios de estabilizar emulsiones suponen el uso de emulsionantes que se pueden incorporar en cualquier fase de la emulsión. Los emulsionantes se pueden clasificar en sentido general en cuatro categorías: tensioactivos sintéticos, emulsionantes naturales, bases de absorción y sólidos finamente dispersados (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 199).

Los tensioactivos sintéticos, también conocidos como agentes activos de superficie, han encontrado amplia aplicabilidad en la formulación de emulsiones y se han revisado en la bibliografía (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 285; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, volumen 1, p. 199). Los tensioactivos son típicamente anfífilos y comprenden una porción hidrofílica y una hidrofóbica. La proporción de la naturaleza hidrofílica respecto a la hidrofóbica del tensioactivo se ha denominado el equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB) y es una herramienta valiosa en categorizar y seleccionar tensioactivos en la preparación de formulaciones. Los tensioactivos se pueden clasificar en diferentes clases basado en la naturaleza del grupo hidrofílico: no iónico, aniónico, catiónico y anfótero (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 285).

Los emulsionantes naturales usados en formulaciones en emulsión incluyen lanolina, cera de abeja, fosfátidos, lecitina y goma arábiga. Las bases de absorción poseen propiedades hidrofílicas de modo que pueden absorber agua para formar emulsiones de agua en aceite y aun retienen sus consistencias semisólidas, tal como lanolina anhidra y vaselina hidrofílica. Los sólidos finamente divididos también se han usado como buenos emulsionantes especialmente en combinación con tensioactivos y en preparaciones viscosas. Estos incluyen sólidos inorgánicos polares, tal como hidróxidos de metales pesados, arcillas que no se hinchan tal como bentonita, atapulgita, hectorita, caolín, montmorillonita, silicato de aluminio coloidal y silicato de magnesio y aluminio coloidal, pigmentos y sólidos no polares tal como carbono o triestearato de glicerilo.

También se incluyen una gran variedad de materiales no emulsionantes en las formulaciones en emulsión y contribuyen a las propiedades de emulsiones. Estos incluyen grasas, aceites, ceras, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos, humectantes, coloides hidrofílicos, conservantes y antioxidantes (Block, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 335; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 199).

Los coloides hidrofílicos o hidrocoloides incluyen gomas naturales y polímeros sintéticos tal como polisacáridos (por ejemplo, goma arábiga, agar, ácido algínico, carragenano, goma guar, goma karaya y traganto), derivados de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa y carboxipropilcelulosa), y polímeros sintéticos (por ejemplo, carbómeros, éteres de celulosa, y polímeros de carboxivinilo). Estos se dispersan o hinchan en agua para formar soluciones coloidales que estabilizan las emulsiones al formar películas interfaciales fuertes alrededor de las gotitas de la fase dispersada y al aumentar la viscosidad de la fase externa.

Puesto que las emulsiones con frecuencia contienen un número de ingredientes tal como hidratos de carbono, proteínas, esteroides y fosfátidos que puede apoyar fácilmente el crecimiento de microbios, estas formulaciones con frecuencia incorporan conservantes. Los conservantes comúnmente usados incluidos en las formulaciones en emulsión incluyen metilparabeno, propilparabeno, sales de amonio cuaternario, cloruro de benzalconio, ésteres de ácido p-hidroxibenzoico, y ácido bórico. También se añaden comúnmente antioxidantes a las formulaciones en emulsión para prevenir el deterioro de la formulación. Los antioxidantes usados pueden ser captadores de radicales libres tal como tocoferoles, galatos de alquilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, o agentes reductores tal como ácido ascórbico y metabisulfito de sodio y antioxidantes sinérgicos tal como ácido cítrico, ácido tartárico, y lecitina.

La aplicación de formulaciones en emulsión a través de rutas dermatológica, oral y parenteral y los métodos para su fabricación se han revisado en la bibliografía (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 199). Las formulaciones en emulsión para la administración oral se han usado mucho debido a la facilidad de formulación, así como la eficacia desde un punto de vista de absorción y biodisponibilidad (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, p. 245; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 199). Los laxantes basados en aceite de vaselina, las vitaminas liposolubles y preparaciones nutritivas con alta grasa están entre los materiales que se han administrado comúnmente por vía oral como emulsiones de aceite en agua.

Las composiciones de ARNbc y ácidos nucleicos se pueden formular como microemulsiones. Una microemulsión se puede definir como un sistema de agua, aceite y anfífilo que es una solución líquida única ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, p. 245). Típicamente las microemulsiones son sistemas que se preparan dispersando primero un aceite en una solución acuosa de tensioactivo y después añadiendo una cantidad suficiente de un cuarto componente, generalmente un alcohol de cadena de longitud intermedia para formar un sistema transparente. Por tanto, las microemulsiones también se han descrito como dispersiones termodinámicamente estables, isotrópicamente transparentes de dos líquidos inmiscibles que se estabilizan por películas interfaciales de moléculas tensioactivas (Leung y Shah, en: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, Nueva York, páginas 185-215). Las microemulsiones comúnmente se preparan a través de una combinación de tres a cinco componentes que incluyen aceite, agua, tensioactivo, cotensioactivo y electrolito. Si la microemulsión es del tipo agua en aceite o aceite en agua depende de las propiedades del aceite y el tensioactivo usados y de la estructura y empaquetamiento geométrico de las cabezas polares y colas hidrocarbonadas de las moléculas de tensioactivo (Schott, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

El enfoque fenomenológico que utiliza diagramas de fase se ha estudiado extensamente y ha dado un conocimiento exhaustivo, al experto en la materia, de cómo formular microemulsiones (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 245; Block, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 335). Comparadas con las emulsiones convencionales, las microemulsiones ofrecen la ventaja de solubilizar fármacos insolubles en agua en una formulación de gotitas termodinámicamente estables que se forman espontáneamente.

Los tensioactivos usados en la preparación de microemulsiones incluyen, pero no están limitados a, tensioactivos iónicos, tensioactivos no iónicos, Brij 96, éteres de polioxietileno oileilo, ésteres de ácidos grasos y poliglicerol, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (MO310), monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (MO750), sequilolato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol (DAO750), solos o en combinación con cotensioactivos. El cotensioactivo, habitualmente un alcohol de cadena corta tal como etanol, 1-propanol y 1-butanol, sirve para aumentar la fluidez interfacial penetrando en la película del tensioactivo y consecuentemente creando una película desordenada debido al espacio vacío generado entre las moléculas de tensioactivo. Sin embargo, las microemulsiones se pueden preparar sin el uso de cotensioactivos y en la técnica se conocen sistemas de microemulsión autoemulsionantes sin alcohol. La fase acuosa puede ser típicamente, pero no está limitada a, agua, una solución acuosa del fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poliglicérols, propilenglicoles, y derivados de etilenglicol. La fase oleaginosa puede incluir, pero no está limitada a, materiales tales como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácidos grasos, mono, di y triglicéridos de cadena media (C8-C12), ésteres de ácidos grasos y glicerilo polioxietilados, alcoholes grasos, glicéridos poliglicolizados, glicéridos de C8-C10 poliglicolizados saturados, aceites vegetales y aceite de silicona.

Las microemulsiones son particularmente de interés desde el punto de vista de la solubilización del fármaco y absorción aumentada de fármacos. Se ha propuesto que las microemulsiones basadas en lípidos (tanto de aceite en agua como de agua en aceite) aumentan la biodisponibilidad oral de fármacos, incluyendo péptidos (Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clín. Pharmacol., 1993, 13, 205). Las microemulsiones proporcionan ventajas de solubilización de fármaco mejorada, protección del fármaco de hidrólisis enzimática, posible aumento de la absorción de fármaco debido a alteraciones inducidas por tensioactivos en la fluidez y permeabilidad de la membrana, facilidad de preparación, facilidad de administración oral sobre formas farmacéuticas sólidas, potencia clínica mejorada, y toxicidad disminuida (Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho et al., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143). Con frecuencia las microemulsiones se forman espontáneamente cuando sus componentes se juntan a temperatura ambiente. Esto puede ser particularmente ventajoso cuando se formulan fármacos, péptidos o ARNbc termolábiles. Las microemulsiones también han sido eficaces en la administración transdérmica de componentes activos tanto en aplicaciones cosméticas como farmacéuticas. Se espera que las composiciones y formulaciones en microemulsión de la presente invención faciliten la absorción sistémica aumentada de ARNbc y ácidos nucleicos del aparato digestivo, así como que mejoren la captación celular local de los ARNbc y ácidos nucleicos.

Las microemulsiones de la presente invención también pueden contener componentes y aditivos adicionales tal como monoestearato sorbitano (Grill 3), Labrasol y potenciadores de penetración para mejorar las propiedades de la formulación y para aumentar la absorción de los ARNbc y ácidos nucleicos de la presente invención. Los potenciadores de penetración usados en las microemulsiones de la presente invención se pueden clasificar como que pertenecen a uno de cinco categorías amplias --tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Cada una de estas clases se ha comentado anteriormente.

10 Liposomas

Hay muchas estructuras de tensioactivos organizadas además de las microemulsiones que se han estudiado y usado para la formulación de fármacos. Estas incluyen monocapas, micelas, bicapas y vesículas. Las vesículas, tal como liposomas, han atraído gran interés debido a su especificidad y la duración de acción que ofrecen desde el punto de vista de la administración del fármaco. Como se usa en la presente invención, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta de lípidos anfifílicos organizados en una bicapa o bicapas esférica(s).

Los liposomas son vesículas unilamelares y multilamelares que tienen una membrana formada de un material lipofílico y un interior acuoso. La parte acuosa contiene la composición que se va a administrar. Los liposomas catiónicos poseen la ventaja de poder fusionarse a la pared celular. Los liposomas no catiónicos, aunque no pueden fusionarse tan eficazmente con la pared celular, son captados por macrófagos in vivo.

Para cruzar intactos la piel de mamíferos, las vesículas lipídicas deben pasar a través de una serie de poros finos, cada uno con un diámetro menor de 50 nm, bajo la influencia de un gradiente transdérmico adecuado. Por tanto, es deseable usar un liposoma que sea muy deformable y capaz de pasar a través de tales poros finos.

Las ventajas adicionales de los liposomas incluyen; los liposomas obtenidos de fosfolípidos naturales son biocompatibles y biodegradables; los liposomas pueden incorporar una amplia gama de fármacos solubles en agua y lípidos; los liposomas pueden proteger fármacos encapsulados en sus compartimentos internos del metabolismo y la degradación (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 245). Consideraciones importantes en la preparación de formulaciones de liposomas con la carga de superficie del lípido, el tamaño de la vesícula y el volumen acuoso de los liposomas.

Los liposomas son útiles para la transferencia y administración de principios activos al sitio de acción. Puesto que la membrana liposómica es estructuralmente similar a las membranas biológicas, cuando se aplican liposomas a un tejido, los liposomas empiezan a fusionarse con las membranas celulares y según progresa la fusión del liposoma y la célula, los contenidos liposómicos se vacían en la célula donde el agente activo puede actuar.

Las formulaciones liposómicas han sido el foco de investigación extensa como el modo de administración para muchos fármacos. Hay evidencia creciente de que para la administración tópica, los liposomas presentan varias ventajas sobre otras formulaciones. Tales ventajas incluyen efectos secundarios reducidos relacionados con la alta absorción sistémica del fármaco administrado, acumulación aumentada del fármaco administrado en la diana deseada, y la capacidad de administrar una amplia variedad de fármacos, tanto hidrofílicos como hidrofóbicos, en la piel.

Varios artículos han detallado la capacidad de los liposomas de administrar agentes incluyendo ADN de alto peso molecular a la piel. Se han administrado compuestos incluyendo analgésicos, anticuerpos, hormonas y ADN de alto peso molecular a la piel. La mayoría de las aplicaciones produjeron el direccionamiento a la epidermis superior.

Los liposomas están en dos clases amplias. Los liposomas catiónicos son liposomas cargados positivamente que interaccionan con las moléculas de ADN cargadas negativamente para formar un complejo estable. El complejo ADN/liposoma cargado positivamente se une a la superficie celular cargada negativamente y se internaliza en un endosoma. Debido al pH ácido en el endosoma, los liposomas se rompen, liberando sus contenidos en el citoplasma celular (Wang et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985).

Los liposomas que son sensibles al pH o están cargados negativamente, atrapan ADN más que formar complejos con él. Puesto que tanto el ADN como el lípido están cargados similarmente, se produce repulsión más que la formación de complejo. No obstante, algo de ADN se atrapa en el interior acuoso de estos liposomas. Los liposomas sensibles al pH se han usado para administrar ADN que codifica el gen de la timidina quinasa a monocapas de células en cultivo. La expresión del gen exógeno se detectó en las células diana (Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).

Un tipo principal de composición de liposoma incluye fosfolípidos diferentes de fosfatidilcolina de origen natural. Las composiciones de liposomas neutros, por ejemplo, se pueden formar de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) o dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC). Las composiciones de liposomas aniónicos generalmente se forman de dimiristoil fosfatidilglicerol, mientras que los liposomas fusogénicos aniónicos se forman principalmente de dioleil

fosfatidiletanolamina (DOPE). Otro tipo de composiciones liposómicas se forma de fosfatidilcolina (PC) tal como, por ejemplo, PC de soja, y PC de huevo. Otro tipo se forma de mezclas de fosfolípidos y/o fosfatidilcolina y/o colesterol.

Varios estudios han evaluado la administración tópica de formulaciones de fármacos en liposomas a la piel. La aplicación de liposomas que contienen interferón a la piel de hamsters produjo una reducción de las llagas de herpes en la piel mientras que la administración de interferón a través de otros medios (por ejemplo, como una solución o como una emulsión) fueron ineficaces (Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, 2, 405-410). Además, un estudio adicional probó la eficacia de interferón administrado como parte de una formulación liposómica respecto a la administración de interferón usando un sistema acuoso, y concluyó que la formulación liposómica era superior a la administración acuosa (du Plessis et al., *Antiviral Research*, 1992, 18, 259-265).

Los sistemas liposómicos no iónicos también se han examinado para determinar su utilidad en la administración de fármacos a la piel, en particular sistemas que comprenden tensioactivo no iónico y colesterol. Se usaron formulaciones liposómicas no iónicas que comprenden Novasoma.TM. I (dilaurato de glicerilo/colesterol/polioxietileno-10-estearil éter) y Novasoma.TM. II (diestearato de glicerilo/colesterol/polioxietileno-10-estearil éter) para administrar ciclosporina A en la dermis de piel de ratón. Los resultados indicaron que tales sistemas liposómicos no iónicos eran eficaces en facilitar el depósito de ciclosporina A en diferentes capas de la piel (Hu et al. *S.T.P. Pharma. Sci.*, 1994, 4, 6, 466).

Liposomas también incluye liposomas "estéricamente estabilizados", un término que, como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan en liposomas, producen vidas de circulación aumentadas relativas a los liposomas que carecen de tales lípidos especializados. Los ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son esos en los que parte de la porción de lípidos que forman la vesícula del liposoma (A) comprende uno o más glucolípidos, tal como monosialogangliósido G.sub.M1, o (B) está derivado con uno o más polímeros hidrofílicos, tal como una fracción de polietilenglicol (PEG). Mientras que no se quiere estar unido por ninguna teoría particular, se piensa en la técnica que, al menos para liposomas estéricamente estabilizados que contienen gangliósidos, esfingomielina o lípidos derivados con PEG, la semivida d circulación aumentada de estos liposomas estéricamente estabilizados deriva de una captación reducida en las células del sistema reticuloendotelial (SER) (Allen et al., *FEBS Letters*, 1987, 223, 42; Wu et al., *Cancer Research*, 1993, 53, 3765).

Varios liposomas que comprenden uno o más glucolípidos se conocen en la técnica. Papahadjopoulos et al. (*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1987, 507, 64) describieron la capacidad de monosialogangliósido G.sub.M1, sulfato de galactocerebrósido y fosfatidilinositol para mejorar las semividas en sangre de liposomas. Estos resultados fueron explicados por Gabizon et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, 85, 6949). La patente en EE UU No. 4.837.028 y el documento WO 88/04924, ambas a Allen et al., divulgan liposomas que comprenden (1) esfingomielina y (2) el gangliósido G.sub.M1 o un éster sulfato de galactocerebrósido. La patente en EE UU No. 5.543.152 (Webb et al) divulga liposomas que comprenden esfingomielina. Se divulgan liposomas que comprenden 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina en el documento WO 97/13499 (Lim et al).

En la técnica se conocen muchos liposomas que comprenden lípidos derivados con uno o más polímeros hidrofílicos, y métodos de preparación de los mismos. Sunamoto et al. (*Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1980, 53, 2778) describieron liposomas que comprenden un detergente no iónico 2C.sub.1215G, que contienen una fracción PEG. Illum et al. (*FEBS Lett.*, 1984, 167, 79) indicaron que el recubrimiento hidrofílico de partículas de poliestireno con glicoles poliméricos produce semividas en sangre significativamente aumentadas. Los fosfolípidos sintéticos modificados por la unión de grupos carboxílico de polialquilenglicoles (por ejemplo, PEG) se describen por Sears (patentes en EE UU Nos. 4.426.330 y 4.534.899). Klibanov et al. (*FEBS Lett.*, 1990, 268, 235) describieron experimentos que demuestran que liposomas que comprenden fosfatidiletanolamina (PE) derivada con PEG o estearato de PEG tienen aumentos significativos en las semividas de circulación en la sangre. Blume et al. (*Biochimica et Biophysica Acta*, 1990, 1029, 91) extendieron tales observaciones a otros fosfolípidos derivados con PEG, por ejemplo, DSPE-PEG, formados de la combinación de diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) y PEG. Los liposomas que tienen fracciones PEG covalentemente unidas en su superficie externa se describen en la patente europea No. EP 0 445 131 B1 y el documento WO 90/04384 a Fisher. Se describen composiciones de liposomas que contienen del 1-20 por ciento molar de PE derivada con PEG, y métodos de uso de los mismos, por Woodle et al. (patentes en EE UU Nos. 5.013.556 y 5.356.633) y Martin et al. (patente en EE UU No. 5.213.804 y patente europea No. EP 0 496 813 B1). Se divulgan liposomas que comprenden un número de otros conjugados lípido-polímero en el documento WO 91/05545 y la patente en EE UU No. 5.225.212 (ambas a Martin et al.) y en el documento WO 94/20073 (Zalipsky et al.). Se describen liposomas que comprenden lípidos ceramidas modificados con PEG en el documento WO 96/10391 (Choi et al.). La patente en EE UU No. 5.540.935 (Miyazaki et al.) y la patente en EE UU No. 5.556.948 (Tagawa et al.) describen liposomas que contienen PEG que se pueden derivar adicionalmente con fracciones funcionales en sus superficies.

Se conocen en la técnica un número limitado de liposomas que comprenden ácidos nucleicos. El documento WO 96/40062 a Thierry et al., divulga métodos para encapsular ácidos nucleicos de alto peso molecular en liposomas. La patente en EE UU No. 5.264.221 a Tagawa et al., divulga liposomas unidos a proteínas y afirma que el contenido de tales liposomas puede incluir un ARN ARNbc. La patente en EE UU No. 5.665.710 a Rahman et al., describe ciertos

métodos de encapsular oligodesoxinucleótidos en liposomas. El documento WO 97/04787 a Love et al., divulga liposomas que comprenden ARNbc, ARNbc dirigidos al gen raf.

Los transfersomas son aún otro tipo de liposomas, y son agregados de lípidos muy deformables que son candidatos atractivos para vehículos administradores de fármacos. Los transfersomas se pueden describir como gotitas de lípidos que son tan altamente deformables que pueden penetrar fácilmente a través de poros que son menores que la gotita. Los transfersomas son adaptables al medio en que se usan, por ejemplo, son autooptimizantes (adaptativos a la forma de los poros de la piel), autorreparantes, frecuentemente alcanzan sus dianas sin fragmentarse y con frecuencia se autocargan. Para hacer transfersomas es posible añadir activadores del borde de superficie, habitualmente tensioactivos, a una composición liposómica estándar. Los transfersomas se han usado para administrar seroalbúmina a la piel. Se ha mostrado que la administración mediada por transfersomas de seroalbúmina es tan eficaz como la inyección subcutánea de una solución que contiene seroalbúmina.

Los tensioactivos encuentran amplia aplicación en formulaciones tal como emulsiones (incluyendo microemulsiones) y liposomas. La manera más común de clasificar y ordenar las propiedades de muchos tipos diferentes de tensioactivos, tanto naturales como sintéticos, es mediante el uso del equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB). La naturaleza del grupo hidrofílico (también conocido como la "cabeza") proporciona el medio más útil para categorizar los diferentes tensioactivos usados en formulaciones (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, p. 285).

Si la molécula de tensioactivo no se ioniza, se clasifica como tensioactivo no iónico. Los tensioactivos no iónicos encuentran amplia aplicación en productos farmacéuticos y cosméticos y son utilizables en un amplio intervalo de valores de pH. En general sus valores HLB varían desde 2 hasta aproximadamente 18 dependiendo de su estructura. Los tensioactivos no iónicos incluyen ésteres no iónicos tal como ésteres de etilenglicol, ésteres de propilenglicol, ésteres de glicerilo, ésteres de poliglicerilo, ésteres sorbitanos, ésteres de sacarosa y ésteres etoxilados. Las alcanolamidas y éteres no iónicos tal como etoxilatos de alcohol graso, alcohol propoxilados, y polímeros en bloque etoxilados/propoxilados también se incluyen en esta clase. Los tensioactivos de polioxietileno son los miembros más populares de la clase de tensioactivos no iónicos.

Si la molécula de tensioactivo lleva una carga negativa cuando se disuelve o dispersa en agua, el tensioactivo se clasifica como aniónico. Los tensioactivos aniónicos incluyen carboxilatos tal como jabones, lactilatos de acilo, acilamidas de aminoácidos, ésteres de ácido sulfúrico tal como sulfatos de alquilo y sulfatos de alquilo etoxilados, sulfonatos tal como sulfonatos de alquilbenceno, isetionatos de acilo, tauratos de acilo y sulfosuccinatos, y fosfonatos. Los miembros más importantes de la clase de tensioactivos aniónicos son los sulfatos de alquilo y los jabones.

Si la molécula de tensioactivo lleva una carga positiva cuando se disuelve o dispersa en agua, el tensioactivo se clasifica como catiónico. Los tensioactivos catiónicos incluyen sales de amonio cuaternario y aminas etoxiladas. Las sales de amonio cuaternario son los miembros más usados de esta clase.

Si la molécula de tensioactivo tiene la capacidad para llevar bien una carga positiva o negativa, el tensioactivo se clasifica como anfótero. Los tensioactivos anfóteros incluyen derivados de ácido acrílico, alquilamidas sustituidas, N-alquilbetaínas y fosfátidos.

El uso de tensioactivos en productos, formulaciones y emulsiones de fármacos se ha revisado (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, p. 285).

Potenciadores de penetración

En una forma de realización, la presente invención emplea varios potenciadores de penetración para realizar la administración eficaz de ácidos nucleicos, particularmente ARNbc, a la piel de animales. La mayoría de los fármacos están presente en solución tanto en las formas ionizada como no ionizada. Sin embargo, habitualmente solo los fármacos solubles en lípidos o lipofílicos cruzan fácilmente las membranas celulares. Se ha descubierto que incluso fármacos no lipofílicos pueden cruzar las membranas celulares si la membrana que se va a cruzar se trata con un potenciador de penetración. Además de ayudar a la difusión de fármacos no lipofílicos a través de membranas celulares, los potenciadores de penetración también aumentan la permeabilidad de fármacos lipofílicos.

Los potenciadores de penetración se pueden clasificar como pertenecientes a una de cinco categorías amplias, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92). Cada una de las clases mencionadas anteriormente de potenciadores de penetración se describe a continuación en mayor detalle.

Tensioactivos: En relación con la presente invención, tensioactivos (o "agentes activos de superficie") son entidades químicas que, cuando se disuelven en una solución acuosa, reducen la tensión de superficie de la solución o la tensión interfacial entre la solución acuosa y otro líquido, con el resultado de que la absorción de los ARNbc a través de la mucosa aumenta. Además de sales biliares y ácidos grasos, estos potenciadores de penetración incluyen, por

ejemplo, lauril sulfato de sodio, polioxietileno-9-lauril éter y polioxietileno-20 cetil éter) (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92); y emulsiones perfluoroquímicas tal como FC-43 Takahashi et al., J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252).

5 Ácidos grasos: Varios ácidos grasos y sus derivados que actúan como potenciadores de penetración incluyen, por ejemplo, ácido oleico, ácido laurico, ácido cáprico (ácido n-decanoico), ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína (1-monooleil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidónico, 1-monocaprato de glicerol, 1-didecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, ésteres alquílicos de C.sub.1-10 de los mismos (por ejemplo, metilo, isopropilo y t-butilo), y mono- y di-
10 glicéridos de los mismos (es decir, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc.) (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651-654).

15 Sales biliares: El papel fisiológico de la bilis incluye facilitar la dispersión y absorción de lípidos y vitaminas liposolubles (Brunton, Capítulo 38 en: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9ª Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, Nueva York, 1996, pp. 934-935). Varias sales biliares naturales, y sus derivados sintéticos, actúan como potenciadores de penetración. Por tanto, el término "sales biliares" incluye cualquiera de los componentes naturales de la bilis así como cualquiera de sus derivados sintéticos. Las sales biliares de la invención incluyen, por ejemplo, ácido cólico (o sus sal de sodio farmacéuticamente aceptable, colato de sodio), ácido
20 dehidrocólico (dehidracolato de sodio), ácido desoxicólico (desoxicolato de sodio), ácido glucólico (glucolato de sodio), ácido glicólico (glicolato de sodio), ácido glicodesoxicólico (glicodesoxicolato de sodio), ácido taurocólico (taurocolato de sodio), ácido taurodesoxicólico (taurodesoxicolato de sodio), ácido quenodesoxicólico (quenodesoxicolato de sodio), ácido ursodesoxicólico (UDCA), tauro-24,25-dihidro-fusidato de sodio (STDHF), glicodihidrofusidato de sodio y polioxietileno-9-lauril éter (POE) (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, página 92; Swinyard, Capítulo 39 En: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed.,
25 Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, páginas 782-783; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25; Yamashita et al., J. Pharm. Sci., 1990, 79, 579-583).

30 Agentes quelantes: Los agentes quelantes, usados en relación con la presente invención, se pueden definir como compuestos que eliminan iones metálicos de la solución formando complejos con ellos, con el resultado de que la absorción de los ARNbc a través de la mucosa aumenta. Con respecto a su uso como potenciadores de penetración en la presente invención, los agentes quelantes tienen la ventaja añadida de que también sirven como inhibidores de DNasa, ya que la mayoría del ADN nucleasas caracterizadas requieren un ion metálico divalente para la catálisis y
35 por tanto son inhibidas por agentes quelantes (Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315-339). Los agentes quelantes de la invención incluyen pero no están limitados a etilendiaminotetraacetato de sodio (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por ejemplo, salicilato de sodio, 5-metoxisalicilato y homovanilato), derivados N-acilo de colágeno, derivados laureth-9 y N-aminoacilo de beta-dicetonas (enaminas) (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, página 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43-51).

No tensioactivos no quelantes: Como se usa en el presente documento, los compuestos potenciadores de penetración no tensioactivos no quelantes se pueden definir como compuestos que demuestran actividad insignificante como agentes quelantes o como tensioactivos pero que no obstante potencian la absorción de los
45 ARNbc a través de la mucosa alimentaria (Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33). Esta clase de potenciadores de penetración incluye, por ejemplo, ureas cíclicas insaturadas, derivados de 1-alquil- y 1-alquenilazacicloalcanona (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, página 92); y agentes antiinflamatorios no esteroideos tal como diclofenaco sódico, indometacina y fenilbutazona (Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626).

50 También se pueden añadir agentes que potencian la captación de los ARNbc a nivel celular a las composiciones farmacéuticas y otras de la presente invención. Por ejemplo, lípidos catiónicos, tal como lipofectina (Junichi et al., patente en EE UU No. 5.705.188), derivados catiónicos de glicerol, y moléculas policatiónicas, tal como polilisina (Lollo et al., solicitud PCT WO 97/30731), también se sabe que aumentan la captación celular de ARNbc.

55 Se pueden utilizar otros agentes para aumentar la penetración de los ácidos nucleicos administrados, incluyendo glicoles tal como etilenglicol y propilenglicol, pirroles tal como 2-pirrol, azonas, y terpenos tal como limoneno y mentona.

60 Soportes

Ciertas composiciones de la presente invención también incorporan compuestos soporte en la formulación. Como se usa en el presente documento, "compuesto soporte" o "soporte" se puede referir a un ácido nucleico, o análogo del mismo, que es inerte (es decir, no posee actividad biológica por sí) pero se reconoce como un ácido nucleico por
65 procesos in vivo que reduce la biodisponibilidad de un ácido nucleico que tiene actividad biológica, por ejemplo, degradando el ácido nucleico biológicamente activo o fomentando su eliminación de la circulación. La

coadministración de un ácido nucleico y un compuesto soporte, típicamente con un exceso de la última sustancia, puede producir una reducción sustancial de la cantidad de ácido nucleico recuperado en el hígado, riñón u otras reservas extracirculatorias, presumiblemente debido a la competición entre el compuesto soporte y el ácido nucleico para un receptor común. Por ejemplo, la recuperación de un ARNbc parcialmente fosforotioato en tejido hepático se puede reducir cuando se coadministra con ácido polinucleico, sulfato de dextrano, ácido policítico o ácido 4-acetamido-4'-isotiocinao-estilbeno-2,2'-disulfónico (Miyao et al., *DsRNA Res. Dev.*, 1995, 5, 115-121; Takakura et al., *DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177-183).

Excipientes

En contraste a un compuesto soporte, un "soporte farmacéutico" o "excipiente" es un solvente, agente de suspensión farmacéuticamente aceptable o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para administrar uno o más ácidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, con la manera de administración planeada en mente, para que proporcione la masa, consistencia, etc., deseadas cuando se combina con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica determinada. Los soportes farmacéuticos típicos incluyen, pero no están limitados a, agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.), rellenos (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos o hidrogenofosfato de calcio, etc.), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.), disgregantes (por ejemplo, almidón, glicolato sódico de almidón, etc.); y agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio).

También se pueden usar excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para la administración no parenteral que no reaccionan perjudicialmente con ácidos nucleicos para formular las composiciones de la presente invención. Los soportes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitados a, agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Las formulaciones para la administración tópica de ácidos nucleicos pueden incluir soluciones acuosas estériles y no estériles, soluciones no acuosas en solventes comunes tal como alcoholes, o soluciones de ácidos nucleicos en bases oleaginosas líquidas o sólidas. Las soluciones también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. Se pueden usar excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para la administración no parenteral que no reaccionan perjudicialmente con ácidos nucleicos.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no están limitados a, agua, soluciones salinas, alcohol, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Otros componentes

Las composiciones de la presente invención pueden contener además otros componentes adjuntos encontrados convencionalmente en composiciones farmacéuticas, en sus niveles de uso establecidos en la técnica. Por tanto, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos, compatibles adicionales tal como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles en formular físicamente varias formas farmacéuticas de las composiciones de la presente invención, tal como tintes, agentes saborizantes, conservantes, antioxidantes, opacifantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, tales materiales, cuando se añaden, no deben interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones se pueden esterilizar y, si se desea, mezclar con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, saborizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no interactúan perjudicialmente con el/los ácido(s) nucleico(s) de la formulación.

Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

Ciertas formas de realización de la invención proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen (a) uno o más compuestos antisentido y (b) uno u otros más agentes quimioterapéuticos que funcionan por un mecanismo no antisentido. Los ejemplos de tales agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no están limitados a, daunorubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinósido, bis-cloroetilnitrosurea, busulfán, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbrazina, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostazas de nitrógeno, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiaurea, desoxicoformicina, 4-

hidroxiperoxyciclofosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecano, topotecano, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Véase, en general, The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15^a Ed. 1987, pp. 1206-1228, Berkow et al., eds., Rahway, N.J. Cuando se usan con los compuestos de la invención, tales agentes quimioterapéuticos se pueden usar individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido), secuencialmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido por MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno u otros más de tales agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). También se pueden combinar fármacos antiinflamatorios, incluyendo pero no limitados a fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticoesteroides, y fármacos antivirales, incluyendo pero no limitados a ribivirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, en las composiciones de la invención. Véase, en general, The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15^a Ed., pp. 1206-1228, Berkow et al., eds., 1987, Rahway, N.J. páginas 2499-2506 y 46-49, respectivamente). Otros agentes quimioterapéuticos no antisentido también están dentro del ámbito de esta invención. Se pueden usar dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

Se pueden determinar la toxicidad y eficacia terapéutica de tales compuestos por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La proporción de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como el cociente DL50/DE50. Los compuestos que muestran altos índices terapéuticos son preferidos.

Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosis para uso en seres humanos. La dosis de las composiciones de la invención está generalmente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar en este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para alcanzar un intervalo de concentraciones circulantes en plasma del compuesto o, cuando sea apropiado, del producto polipeptídico de una secuencia diana (por ejemplo, alcanzar una concentración disminuida del polipéptido) que incluye la CI50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que alcanza una inhibición semimáxima de los síntomas) determinada en cultivo celular. Tal información se puede usar para determinar de forma más precisa las dosis útiles en seres humanos. Se pueden medir los niveles en plasma, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

Además de su administración individualmente o como una pluralidad, como se ha comentado anteriormente, los ARNbc de la invención se pueden administrar en combinación con otros agentes conocidos eficaces en el tratamiento de procesos patológicos mediados por la expresión de Eg5. En cualquier caso, el médico puede ajustar la cantidad y ritmo de la administración de ARNbc en base a los resultados observados usando medidas estándar de eficacia conocidas en la técnica o descritas en el presente documento.

Métodos para tratar enfermedades causadas por la expresión del gen Eg5

Se describe el uso de un ARNbc o una composición farmacéutica preparada a partir del mismo para el tratamiento de cáncer, por ejemplo, para inhibir el crecimiento tumoral y la metástasis tumoral. Por ejemplo, el ARNbc o una composición farmacéutica preparada a partir del mismo se puede usar para el tratamiento de tumores sólidos, como cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cerebral, cáncer abdominal, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gastrointestinal, glioma, cáncer de hígado, cáncer de lengua, neuroblastoma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, retinoblastoma, tumor de Wilm, mieloma múltiple y para el tratamiento de cáncer de piel, como melanoma, para el tratamiento de linfomas y cáncer de sangre. Se describe además el uso de ARNbc según la invención o una composición farmacéutica preparada a partir del mismo para inhibir la expresión de eg5 y/o para inhibir la acumulación de líquido ascítico y derrame pleural en diferentes tipos de cáncer, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cerebral, cáncer abdominal, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gastrointestinal, glioma, cáncer de hígado, cáncer de lengua, neuroblastoma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, retinoblastoma, tumor de Wilm, mieloma múltiple, cáncer de piel, melanoma, linfomas y cáncer de sangre. Debido al efecto inhibitorio sobre la expresión de eg5, un ARNbc según la invención o una composición farmacéutica preparada a partir del mismo puede aumentar la calidad de vida.

También se describe el uso de un ARNbc o una composición farmacéutica preparada a partir del mismo, por ejemplo, para tratar cáncer o para prevenir metástasis tumoral, en combinación con otros fármacos y/o otros métodos terapéuticos, por ejemplo, con fármacos conocidos y/o métodos farmacéuticos conocidos, tal como, por ejemplo, los que se emplean actualmente para tratar cáncer y/o para prevenir metástasis tumoral. Se da preferencia a una combinación con terapia de radiación y agentes quimioterapéuticos, tal como cisplatino, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, adriamicina, daunorubicina o tamoxifeno. Otras formas de realización incluyen el uso de un segundo ARNbc usado para inhibir la expresión de VEGF.

También se describe un agente de iARN específico, en combinación con otro agente quimioterapéutico anticanceroso, tal como cualquier agente quimioterapéutico convencional, u otro ARNbc usado para inhibir la expresión de VEGF. La combinación de un agente de unión específico con tales otros agentes puede potenciar el protocolo quimioterapéutico. Numerosos protocolos quimioterapéuticos se presentarán ellos mismos en la mente del médico experto como que pueden incorporarse en el método de la invención. Cualquier agente quimioterapéutico se puede usar incluyendo agentes alquilantes, antimetabolitos, hormonas y antagonistas, radioisótopos, así como productos naturales. Por ejemplo, el compuesto de la invención se puede administrar con antibióticos tal como doxorubicina y otros análogos de antraciclina, mostazas de nitrógeno tal como ciclofosfamida, análogos de pirimidina tal como 5-fluorouracilo, cisplatino, hidroxiaurea, taxol y sus derivados naturales y sintéticos, y similares. Como otro ejemplo, en el caso de tumores mixtos, tal como adenocarcinoma de la mama, donde los tumores incluyen células dependientes de gonadotropina e independientes de gonadotropina, el compuesto se puede administrar junto con leuprolida o goserelina (análogos peptídicos sintéticos de LH-RH). Otros protocolos antineoplásicos incluyen el uso de un compuesto tetraciclina con otra modalidad de tratamiento, por ejemplo, cirugía, radiación, etc., también denominado en el presente documento "modalidades neoplásicas adjuntas". Por tanto, el método de la invención se puede emplear con tales pautas convencionales con el beneficio de reducir los efectos secundarios y aumentar la eficacia.

Métodos para inhibir la expresión del gen Eg5

Además se describe un método para inhibir la expresión del gen Eg5 en un mamífero. El método comprende administrar una composición de la invención al mamífero de modo que la expresión del gen diana Eg5 se silencia. Debido a su alta especificidad, los ARNbc de la invención específicamente se dirigen a ARN (primarios o procesados) del gen diana Eg5. Las composiciones y métodos para inhibir la expresión de estos genes Eg5 usando ARNbc se puede realizar como se describe en otro lugar en el presente documento.

Tal método puede comprender administrar una composición que comprende un ARNbc, en donde el ARNbc comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a al menos una parte de un transcrito de ARN del gen Eg5 del mamífero que se va a tratar. Cuando el organismo que se va a tratar es un mamífero tal como un ser humano, la composición se puede administrar por cualquier medio conocido en la técnica incluyendo, pero no limitado a vías oral o parenteral, incluyendo administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, a vías respiratorias (aerosol), nasal, rectal, y tópica (incluyendo yugal y sublingual). Las composiciones se pueden administrar por infusión o inyección intravenosa.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende el experto en la materia a la que pertenece la invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. En caso de conflicto, la presente especificación, incluyendo definiciones, controlará. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solo y no se pretende que sean limitantes.

Ejemplos

Desplazamiento génico del gen Eg5

Conjunto de cribado inicial

Se llevó a cabo diseño de ARNip para identificar ARNip que se dirigen a Eg5 (también conocido como KIF11, HSKP, KNSL1 y TRIP5). Se usaron secuencias de ARNm humanas para Eg5, RfeSeq ID número: NM_004523.

Se diseñaron dúplex de ARNip con reacción cruzada para EG5 humano y de ratón. Se sintetizaron veinticuatro dúplex para el cribado (Tabla 1).

Conjunto de cribado expandido

Se definió un segundo conjunto de cribado con 266 ARNip que se dirigen a EG5 humano, así como su ortólogo de mono rhesus (tabla 2). Se seleccionó un conjunto de cribado expandido con 328 ARNip que se dirigen a EG5 humano, sin necesitar de acertar ningún ARNm de EG5 de otras especies (tabla 3).

Las secuencias para los ARNm de EG5 humana y una parcial de rhesus se descargaron de la base de datos de nucleótidos del NCBI y la secuencia humana además se usó como secuencia de referencia (EG5 humana: NM_004523.2, 4908 pb, y EG5 de rhesus: XM_001087644.1, 878 pb (solo la parte 5' de EG5 humana).

Para la identificación de secuencias de EG5 de rhesus adicionales se realizó una búsqueda mega blast con la secuencia humana en NCBI contra el genoma de referencia de rhesus. La secuencia de rhesus descargada y las regiones acertadas y los ciertos de blast se ensamblaron a una secuencia consenso de rhesus con una identidad de ~92% a EG5 humana sobre la longitud total.

Se extrajeron todos los posibles candidatos 19 meros de la secuencia de ARNm humana, produciendo el conjunto de sitios diana candidatos correspondientes a 4890 (hebra sentido) secuencias de ARNip de EG5 que reaccionan con humano.

La reactividad cruzada humano-rhesus como prerequisite para la selección *in silico* de los ARNip para un cribado inicial clasificó este conjunto de candidatos. Para determinar los ARNip reactivos con rhesus, se buscó la presencia de cada sitio diana de ARNip candidato en la secuencia de rhesus ensamblada. Además, la especificidad pronosticada del ARNip como criterio para la selección de fuera del conjunto de ARNip de reacción cruzada humano-rhesus, se manifestó por direccionamiento a secuencias de ARNm de EG5 humanas, pero no otros ARNm humanos.

La especificidad de un ARNip se puede expresar a través de su potencial para dirigirse a otros genes, que se denominan "genes inespecíficos".

Para pronosticar el potencial inespecífico de un ARNip, se hicieron las siguientes suposiciones:

- 1) el potencial inespecífico de una hebra se puede deducir del número y distribución de los malos apareamientos a un gen inespecífico
- 2) el inespecífico más relevante, es decir, el gen pronosticado que tiene la mayor probabilidad de ser silenciado debido a la tolerancia de malos apareamientos, determina el potencial inespecífico de la hebra
- 3) las posiciones 2 a 9 (contando de 5' a 3') de una hebra (región semilla) pueden contribuir más al potencial inespecífico que el resto de la secuencia (es decir la región no semilla y de sitio de corte)
- 4) las posiciones 10 y 11 (contando de 5' a 3') de una hebra (región del sitio de corte) pueden contribuir más al potencial inespecífico que la región no semilla (es decir posiciones 12 a 18, contando de 5' a 3')
- 5) las posiciones 1 y 19 de cada hebra no son relevantes para las interacciones inespecíficas
- 6) el potencial inespecífico se puede expresar por la puntuación inespecífica del inespecífico más relevante, calculado basado en el número y posición de malos apareamientos de la hebra con la región más homóloga en el gen inespecífico considerando las suposiciones 3 a 5
- 7) el potencial inespecífico de la hebra antisentido y sentido será relevante, mientras el fracaso potencial de la actividad de la hebra sentido por modificaciones internas introducidas es probable.

Los ARNip con bajo potencial inespecífico se definieron como preferibles y se supuso que eran más específicos.

Para identificar ARNip específicos a EG5 humano, se hizo una búsqueda en todos los otros transcritos humanos, que se consideraron todos potenciales inespecíficos, para regiones diana potenciales para secuencias de hebra sentido 19meros con reactividad cruzada humana-rhesus así como hebras antisentido complementarias. Para esto, se usó el algoritmo fastA para determinar la región de acierto más homóloga en cada secuencia de la base de datos RefSeq humana, que se asume representa el transcriptoma humano exhaustivo.

Para clasificar todos los inespecíficos potenciales según las suposiciones 3 a 5, y mediante esto identificar el gen inespecífico más relevante y su puntuación inespecífica, se analizaron los ficheros de salida de fastA adicionalmente con un perl script.

El guión extrajo las siguientes propiedades inespecíficas para cada secuencia de entrada 19mera y cada gen inespecífico para calcular la puntuación inespecífica:

Número de malos apareamientos en la región no semilla

Número de malos apareamientos en la región semilla

Número de malos apareamientos en la región del sitio de corte

La puntuación inespecífica se calculó considerando las suposiciones 3 a 5 como sigue:

Puntuación inespecífica = número de malos apareamientos semilla * 10

+ número de malos apareamientos en sitio de corte * 1,2

+ número de malos apareamientos en no semilla * 1

El gen inespecífico más relevante para cada secuencia 19mera se definió como el gen con la menor puntuación inespecífica. Según esto, la menor puntuación inespecífica se definió como representativa para el potencial inespecífico de una hebra.

Para el conjunto de cribado en la tabla 2, se eligió una puntuación inespecífica de 3 o más para la hebra antisentido y 2 o más para la hebra sentido como prerrequisito para la selección de los ARNip, mientras que todas las secuencias que contenían 4 o más G consecutivas (secuencias poli-G) se excluyeron. Se seleccionaron 266 secuencias con reactividad cruzada humana-rhesus que pasaban el criterio de especificidad basado en este criterio de valoración (véase la tabla 2).

Para la definición del conjunto de cribado expandido la reactividad cruzada a rhesus se pasó por alto, se volvió a calcular la especificidad pronosticada basada en la base de datos RefSeq humana nuevamente disponible y se seleccionaron solo esos 328 ARNip sin poli-G con puntuación inespecífica de 2,2 o más para la hebra antisentido y sentido (véase la tabla 3).

Para las tablas: Clave: A, G, C, U - ribonucleótidos: T - desoxitimidina: u, c - 2'-O-metil nucleótidos: s - enlace fosforotioato

Síntesis de ARNbc

Fuente de reactivos

Donde la fuente de un reactivo no se da específicamente en el presente documento, tal reactivo se puede obtener de cualquier suministrador de reactivos para biología molecular en una calidad/pureza estándar para aplicación en biología molecular.

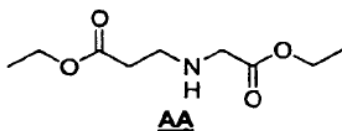
Síntesis de ARNip

Se produjeron los ARN monocatenarios por síntesis en fase sólida en una escala de 1 μ mol usando un sintetizador Expedite 8909 (Applied Biosystems, Applied Deutschland GmbH, Darmstadt, Alemania) y vidrio de poro controlado (CPG, 500 Å, Proligo Biochemie GmbH, Hamburgo, Alemania) como soporte sólido. Se generaron ARN y ARN que contenía 2'-O-metil nucleótidos por síntesis en fase sólida empleando las correspondientes fosforamiditas y 2'-O-metilfosforamiditas, respectivamente (Proligo Biochemie GmbH, Hamburgo, Alemania). Estos bloques estructurales se incorporaron en sitios seleccionados en la secuencia de la cadena de oligonucleótidos usando química de fosforamidita de nucleósidos estándar tal como se describe en Current protocols in nucleic acid chemistry, Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, EE UU. Se introdujeron enlaces fosforotioato por sustitución de la solución oxidante de yodo con una solución del reactivo de Beaucage (Chruachem Ltd, Glasgow, RU) en acetonitrilo (1%). Se obtuvieron reactivos secundarios adicionales de Mallinckrodt Baker (Griesheim, Alemania).

La desprotección y purificación de los oligonucleótidos crudos por HPLC de intercambio aniónico se llevó a cabo según procedimientos establecidos. Se determinaron rendimientos y concentraciones por absorción UV de una solución del ARN respectivo a una longitud de onda de 260 nm usando un fotómetro espectral (DU 640B, Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim, Alemania). Se generó ARN bicatenario mezclando una solución equimolar de hebras complementarias en tampón de hibridación (fosfato de sodio 20 mM, pH 6,8; cloruro de sodio 100 mM), se calentó en un baño de agua a 85-90°C durante 3 minutos y se enfrió a temperatura ambiente durante un periodo de 3-4 horas. La solución de ARN hibridada se almacenó a -20°C hasta su uso.

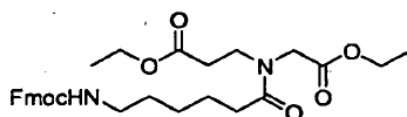
Para la síntesis de ARNip conjugados a 3'-colesterol (en el presente documento denominado -Col-3'), se usó un soporte sólido apropiadamente modificado para la síntesis del ARN. El soporte sólido modificado se preparó como sigue:

Dietil-2-azabutano-1,4-dicarboxilato **AA**



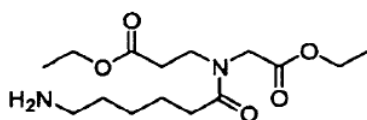
Una solución acuosa 4,7 M de hidróxido de sodio (50 ml) se añadió en un solución agitada, helada de clorhidrato de glicinato de etilo (32,19 g, 0,23 mol) en agua (50 ml). A continuación, se añadió acrilato de etilo (23,1 g, 0,23 mol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que la terminación de la reacción se determinó por TLC. Después de 19 h la solución se repartió con diclorometano (3 x 100 ml). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y evaporó. El residuo se destiló para dar AA (28,8 g, 61%).

Éster etílico del ácido 3-{etoxicarbonilmetil-[6-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonil-amino)-hexanoil]-amino}-propiónico **AB**

**AB**

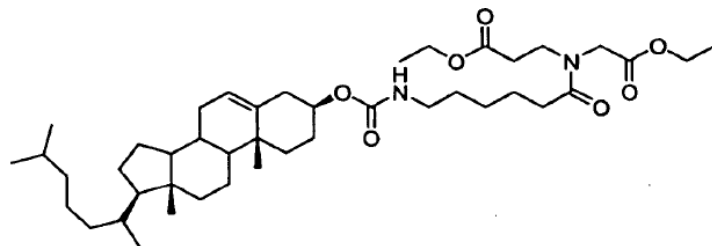
Se disolvió ácido Fmoc-6-amino-hexanoico (9,12 g, 25,83 mmol) en diclorometano (50 ml) y se enfrió con hielo. Se añadió diisopropilcarbodiimida (3,25 g, 3,99 ml, 25,83 mmol) a la solución a 0°C. Después se siguió por la adición de dietil-2-azabutano-1,4-dicarboxilato (5 g, 24,6 mmol) y dimetilaminopiridina (0,305 g, 2,5 mmol). La solución se llevó a temperatura ambiente y se agitó además durante 6 h. La terminación de la reacción se determinó por TLC. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se añadió acetato de etilo para precipitar diisopropilurea. La suspensión se filtró. El filtrado se lavó con ácido clorhídrico acuoso al 5%, bicarbonato de sodio al 5% y agua. La fase orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio y se concentró para dar el producto crudo que se purificó por cromatografía en columna (EtOAc al 50%/hexanos) para dar 11,87 g (88%) de AB.

Éster etílico del ácido 3-[(6-amino-hexanoil)-etoxicarbonilmetil-amino]-propiónico **AC**

**AC**

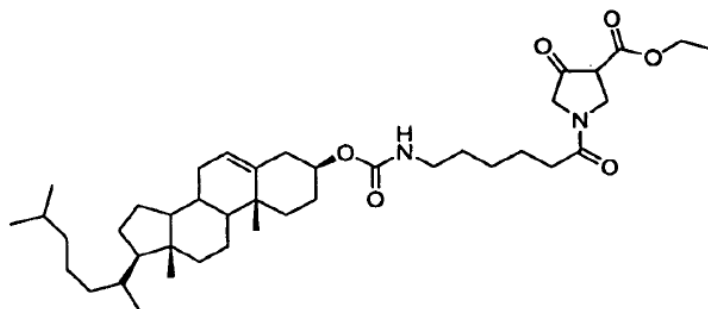
Se disolvió éster etílico del ácido 3-{etoxicarbonilmetil-[6-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-hexanoil]-amino}-propiónico AB (11,5 g, 21,3 mmol) en piperidina al 20% en dimetilformamida a 0°C. La solución se siguió agitando durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío, se añadió agua al residuo, y el producto se extrajo con acetato de etilo. El producto crudo se purificó por conversión a su sal clorhidrato.

Éster etílico del ácido 3-[(6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxicarbonilamino]-hexanoil)-etoxicarbonilmetil-amino]propiónico **AD**

**AD**

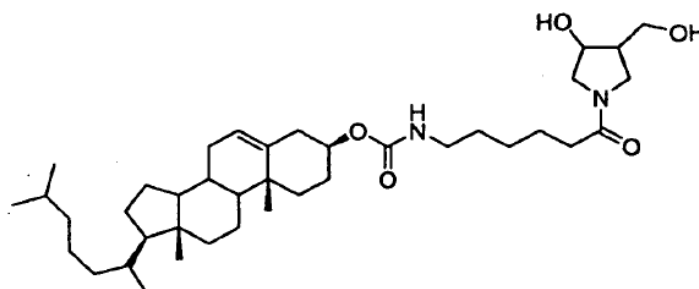
La sal clorhidrato del éster etílico del ácido 3-[(6-amino-hexanoil)-etoxicarbonilmetil-amino]-propiónico AC (4,7 g, 14,8 mmol) se absorbió en diclorometano. La suspensión se enfrió a 0°C en hielo. A la suspensión se añadió diisopropiletilamina (3,87 g, 5,2 ml, 30 mmol). A la solución resultante se añadió clorformiato de colesterilo (6,675 g, 14,8 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y se lavó con ácido clorhídrico al 10%. El producto se purificó por cromatografía rápida (10,3 g, 92%).

Éster etílico del ácido 3-[(6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxicarbonilamino]-hexanoil)-4-oxo-pirrolidina-3-carboxílico **AE**

**AE**

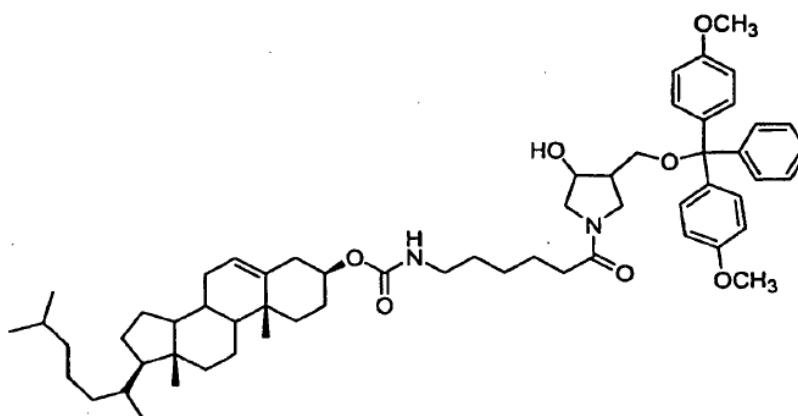
Se hizo una papilla con t-butoxido de potasio (1,1 g, 9,8 mmol) en 30 ml de tolueno anhidro. La mezcla se enfrió a 0°C en hielo y se añadieron 5 g (6,6 mmol) de diéster AD lentamente con agitación en 20 minutos. La temperatura se mantuvo por debajo de 5°C durante la adición. La agitación siguió durante 30 min a 0°C y se añadió 1 ml de ácido acético glacial, inmediatamente seguido por 4 g de NaH₂PO₄·H₂O en 40 ml de agua. La mezcla resultante se extrajo dos veces con 100 ml de diclorometano cada una y los extractos orgánicos combinados se lavaron dos veces con 10 ml de tampón fosfato cada vez, se secaron, y evaporaron a sequedad. El residuo se disolvió en 60 ml de tolueno, se enfrió a 0°C y se extrajo con tres porciones de 50 ml de tampón carbonato pH 9,5 frío. Los extractos acuosos se ajustaron a pH 3 con ácido fosfórico, y se extrajeron con cinco porciones de 40 ml de cloroformo que se combinaron, secaron y evaporaron a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna usando acetato de etilo al 25%/hexano para dar 1,9 de b-cetoéster (39%).

Éster 17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ílico del ácido [6-(3-hidroxi-4-hidroximetil-pirrolidin-1-il)-6-oxo-hexil]carbámico **AF**

**AF**

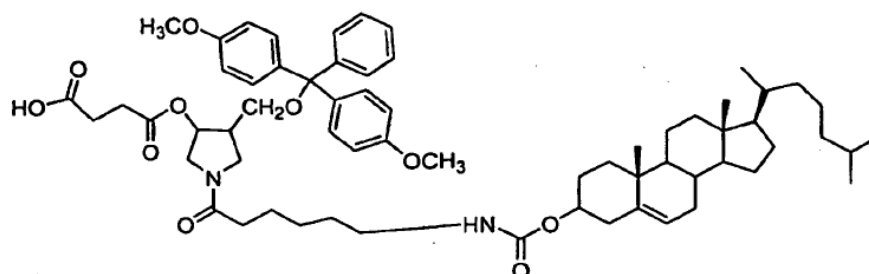
Se añadió metanol (2 ml) gota a gota durante un periodo de 1 h a una mezcla a reflujo del b-cetoéster AE (1,5 g, 2,2 mmol) y borohidruro de sodio (0,226 g, 6 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml). Se siguió agitando a temperatura de reflujo durante 1 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió HCl 1 N (12,5 ml), la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 40 ml). La fase de acetato de etilo combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío para dar el producto que se purificó por cromatografía en columna (MeOH al 10%/CHCl₃) (89%).

Éster 17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ílico del ácido (6-{3-[bis(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetil]-4-hidroxi-pirrolidin-1-il}-6-oxo-carbámico **AG**

**AG**

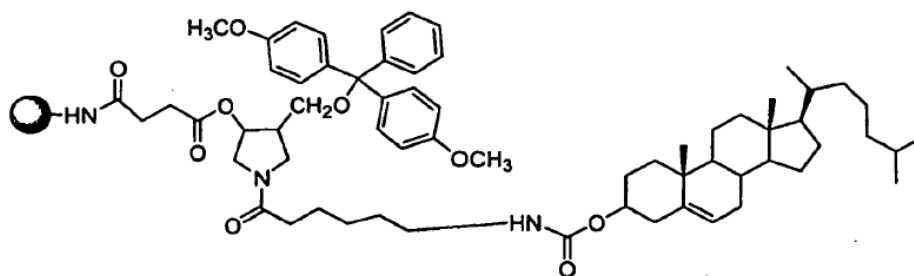
Se secó el diol AF (1,25 g, 1,994 mmol) evaporando con piridina (2 x 5 ml) al vacío. Se añadieron piridina anhidra (10 ml) y cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (0,724 g, 2,13 mmol) con agitación. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se extinguió mediante la adición de metanol. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se añadió diclorometano (50 ml) al residuo. La fase orgánica se lavó con bicarbonato de sodio acuoso 1 M. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró. La piridina residual se eliminó evaporando con tolueno. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna (MeOH al 2%/cloroformo, $R_f = 0,5$ en MeOH al 5%/CHCl₃) (1,75 g, 95%).

Éster mono-(4-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetil]-1-{6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxycarbonilamino]-hexanoil}-pirrolidin-3-ílico) del ácido succínico **AH**

**AH**

El compuesto AG (1,0 g, 1,05 mmol) se mezcló con anhídrido succínico (0,150 g, 1,5 mmol) y DMAP (0,073 g, 0,6 mmol) y se secó al vacío a 40°C durante la noche. La mezcla se disolvió en diclorometano anhidro (3 ml), se añadió trietilamina (0,318 g, 0,440 ml, 3,15 mmol) y la solución se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de argón durante 16 h. Después se diluyó con diclorometano (40 ml) y se lavó con ácido cítrico acuoso helado (al 5% en peso, 30 ml) y agua (2 x 20 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a sequedad. El residuo se usó como tal para el siguiente paso.

CPG modificado con colesterol **AI**

**AI**

El succinato AH (0,254 g, 0,242 mmol) se disolvió en una mezcla de diclorometano/acetonitrilo (3:2, 3 ml). A esa solución se añadieron sucesivamente DMAP (0,0296 g, 0,242 mmol) en acetonitrilo (1,25 ml) y 2,2'-ditio-bis(5-nitropiridina) (0,075 g, 0,242 mmol) en acetonitrilo/dicloroetano (3:1, 1,25 ml). A la solución resultante se añadió trifetilfosfina (0,064 g, 0,242 mmol) en acetonitrilo (0,6 ml). La mezcla de reacción se volvió de color naranja brillante. La solución se agitó brevemente usando un agitador con movimiento de muñeca (5 min). Se añadió alquilamina de cadena larga-CPG (LCAA-CPG) (1,5 g, 61 mM). La suspensión se agitó durante 2 horas. El CPG se filtró a través de un embudo sinterizado y se lavó con acetonitrilo, diclorometano y éter sucesivamente. Los grupos amino sin reaccionar se enmascararon usando anhídrido acético/piridina. La carga alcanzada del CPG se midió tomando medidas de UV (37 mM/g).

La síntesis de los ARNip que llevan un grupo bisdecilamida del ácido 5'-12-dodecanoico (en el presente documento denominado "5'-C32-") o un grupo derivado de 5'-colesterilo (en el presente documento denominado "5'-Col-") se realizó como se describe en el documento WO 2004/065061, excepto que, para el derivado colesterilo, el paso de oxidación se realizó usando el reactivo de Beaucage para introducir un enlace fosforotioato en el extremo 5' de oligómero de ácido nucleico.

Las secuencias de ácidos nucleicos se representan a continuación usando nomenclatura estándar, y específicamente las abreviaturas de la tabla 4.

Tabla 4: Abreviaturas de monómeros de nucleótidos usados en la representación de ácidos nucleicos. Se entenderá que estos monómeros, cuando están presentes en un oligonucleótido, es mutuamente unidos por enlaces 5'-3'-fosfodiéster.

Abreviaturas ^a	Nucleótido(s)
A, a	2'-desoxi-adenosina-5'-fosfato, adenosina-5'-fosfato
C, c	2'-desoxi-citidina-5'-fosfato, citidina-5'-fosfato
G, g	2'-desoxi-guanosina-5'-fosfato, guanosina-5'-fosfato
T, t	2'-desoxi-timidina-5'-fosfato, timidina-5'-fosfato
U, u	2'-desoxi-uridina-5'-fosfato, uridina-5'-fosfato
N, n	cualquier 2'-desoxinucleótido/nucleótido (G, A, C o T, g, a, c o u)
Am	2'-O-metiladenosina-5'-fosfato
Cm	2'-O-metilcitidina-5'-fosfato
Gm	2'-O-metilguanosina-5'-fosfato
Tm	2'-O-metiltimidina-5'-fosfato
Um	2'-O-metiluridina-5'-fosfato
Af	2'-fluoro-2'-desoxi-adenosina-5'-fosfato
Cf	2'-fluoro-2'-desoxi-citidina-5'-fosfato
Gf	2'-fluoro-2'-desoxi-guanosina-5'-fosfato
Tf	2'-fluoro-2'-desoxi-timidina-5'-fosfato
Uf	2'-fluoro-2'-desoxi-uridina-5'-fosfato
<u>A, C, G, T, U, a, c, g, t, u</u>	subrayado: nucleósido-5'-fosforotioato
<u>am, cm, gm, tm, um</u>	subrayado: 2-O-metil-nucleósido-5'-fosforotioato

^a Las letras mayúsculas representan 2'-desoxirribonucleótidos (ADN), las letras minúsculas representan ribonucleótidos (ARN).

Vectores de expresión de ARNbc

En otro aspecto de la invención, moléculas de ARNbc específicas para Eg5 que modulan la actividad de la expresión del gen Eg5 se expresan de unidades de transcripción insertadas en vectores de ADN o ARN (véase, por ejemplo, Couture, A, et al., *TIG*. (1996), 12:5-10; Skille, A., et al., publicación PCT Internacional No. WO 00/22113, Conrad, publicación PCT Internacional No. WO 00/22114, y Conrad, patente en EE UU No. 6.054.299). Estos transgenes se

pueden introducir como una construcción lineal, una plásmido circular, o un vector vírico, que se puede incorporar y heredar como un transgén integrado en el genoma del huésped. El transgén también se puede construir para permitir que se herede como un plásmido extracromosómico (Gassmann, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

Las hebras individuales de un ARNbc se pueden transcribir por promotores en dos vectores de expresión separados y cotransfectar en una célula diana. Alternativamente, cada hebra individual del ARNbc se puede transcribir por promotores que están localizados ambos en el mismo plásmido de expresión. En una forma de realización preferida, un ARNbc se expresa como una repetición invertida unida por una secuencia de polinucleótido enlazador de modo que el ARNbc tenga una estructura de tallo y bucle.

Los vectores de expresión de ARNbc recombinante generalmente son plásmidos de ADN o vectores víricos. Los vectores víricos que expresan ARNbc se pueden construir basados en, pero no limitados a, virus adenoasociados (para una revisión, véase Muzyczka, et al., *Curr. Topics Micro. Immunol.* (1992) 158:97-129); adenovirus (véase, por ejemplo, Berkner, et al., *BioTechniques* (1998) 6:616), Rosenfeld et al. (1991, *Science* 252:431-434), y Rosenfeld et al. (1992), *Cell* 68:143-155); o alfavirus así como otros conocidos en la técnica. Los retrovirus se han usado para introducir una variedad de genes en muchos tipos de células diferentes, incluyendo, células epiteliales, in vitro y/o in vivo (véase, por ejemplo, Eglitis, et al., *Science* (1985) 230:1395-1398; Danos y Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 85:6460-6464; Wilson et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3014-3018; Armentano et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6141-6145; Huber et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8039-8043; Ferry et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-8381; Chowdhury et al., 1991, *Science* 254:1802-1805; van Beusechem et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7640-19; Kay et al., 1992, *Human Gene Therapy* 3:641-647; Dai et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10892-10895; Hwu et al., 1993, *J. Immunol.* 150:4104-4115; patente en EE UU No. 4.868.116; patente en EE UU No. 4.980.286; solicitud PCT WO 89/07136; solicitud PCT WO 89/02468; solicitud PCT WO 89/05345; y solicitud PCT WO 92/07573). Los vectores retrovíricos recombinantes capaces de transducir y expresar genes insertados en el genoma de una célula se pueden producir transfectando el genoma retrovírico recombinante en líneas celulares empaquetadoras adecuadas tal como PA317 y Psi-CRIP (Comette et al., 1991, *Human Gene Therapy* 2:5-10; Cone et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6349). Los vectores adenovíricos recombinantes se pueden usar para infectar una amplia variedad de células y tejidos en huéspedes susceptibles (por ejemplo, rata, hámster, perro, y chimpancé) (Hsu et al., 1992, *J. Infectious Disease*, 166:769), y también tienen la ventaja de no requerir células mitóticamente activas para la infección.

El promotor que dirige la expresión del ARNbc en un plásmido de ADN o vector vírico de la invención puede ser un promotor eucariota de ARN polimerasa I (por ejemplo, promotor de ARN ribosómico), ARN polimerasa II (por ejemplo, promotor temprano de CMV o promotor de actina o promotor de ARNnp U1) o en general de ARN polimerasa III (por ejemplo promotor de ARNnp U6 o ARN 7SK) o un promotor procariota, por ejemplo, el promotor de T7, siempre que el plásmido de expresión también codifique la ARN polimerasa de T7 requerida para la transcripción del promotor de T7. El promotor también puede dirigir la expresión del transgén al páncreas (véase, por ejemplo, la secuencia reguladora de insulina para páncreas (Bucchini et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2511-2515)).

Además, la expresión del transgén se puede regular de forma precisa, por ejemplo, usando una secuencia reguladora y sistemas de expresión inducibles tal como una secuencia reguladora que es sensible a ciertos reguladores fisiológicos, por ejemplo, niveles circulantes de glucosa, u hormonas (Docherty et al., 1994, *FASEB J.* 8:20-24). Tales sistemas de expresión inducibles, adecuados para el control de la expresión del transgén en células o en mamíferos incluyen la regulación por ecdisona, por estrógenos, progesterona, tetraciclina, inductores químicos de dimerización, e isopropil-beta-D1-tiogalactopiranosido (EPTG). Un experto en la materia podría elegir la secuencia reguladora/promotora apropiada basado en el uso pretendido del transgén de ARNbc.

Generalmente, los vectores recombinantes capaces de expresar moléculas de ARNbc se administran como se describe posteriormente, y persisten en las células diana. Alternativamente, se pueden usar vectores víricos que proporcionan expresión transitoria de las moléculas de ARNbc. Tales vectores se pueden administrar repetidamente según sea necesario. Una vez expresados, los ARNbc se unen al ARN diana y modulan su función o expresión. La administración de vectores que expresan ARNbc puede ser sistémica, tal como mediante administración intravenosa o intramuscular, por administración a células diana explantadas del paciente seguido por reintroducción en el paciente, o por cualquier otro medio que permita la introducción en una célula diana deseada.

Los plásmido de ADN de expresión de ARNbc típicamente se transfectan en células diana como un complejo con soportes de lípidos catiónicos (por ejemplo, Oligofectamina) o soportes no basados en lípidos catiónicos (por ejemplo, Transit-TKO™). La invención también contempla múltiples transfecciones con lípidos para silenciamientos mediados por ARNbc que se dirigen a diferentes regiones de un único gen Eg5 o múltiples genes Eg5 durante un periodo de una semana o más. La introducción con éxito de los vectores de la invención en células huéspedes se puede seguir usando varios métodos conocidos. Por ejemplo, la transfección transitoria se puede señalar con un indicador, tal como un marcador fluorescente, tal como la proteína fluorescente verde (GFP). La transfección estable de células ex vivo se puede asegurar usando marcadores que proporcionan a las células transfectadas una

resistencia a factores medioambientales específicos (por ejemplo, antibióticos y fármacos), tal como resistencia a higromicina B.

Las moléculas de ARNbc específicas de Eg5 también se pueden insertar en vectores y usar como vectores de terapia génica para pacientes humanos. Los vectores de terapia génica se pueden administrar a un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase la patente en EE UU No. 5.328.470) o por inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que se embebe el vehículo de administración génica. Alternativamente, donde el vector de administración génica completo se puede producir intacto de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovíricos, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de administración génica.

Cribado in vitro de ARNip de Eg5 a través de proliferación celular

Como se ha mostrado que el silenciamiento de Eg5 produce parada mitótica (Weil, D, et al [2002] Biotechniques 33: 1244-8), se usó un ensayo de viabilidad celular para el cribado de la actividad del ARNip. Se sembraron células HeLa (14000 por pocillo [cribados 1 y 3] o 10000 por pocillo [cribado 2]) en placas de 96 pocillos y se transfectaron simultáneamente con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) a una concentración final de ARNip en el pocillo de 30 nM y a concentraciones finales de 50 nM (1^{er} cribado) y 25 nM (2^o cribado). Se probó un subconjunto de dúplex a 25 nM en un tercer cribado (tabla 5).

Setenta y dos horas después de la transfección, se ensayó la proliferación celular la adición de reactivo WST-1 (Roche) al medio de cultivo, y posterior medida de absorbancia a 450 nm. El valor de absorbancia para células control (sin transfectar) se consideró el 100 por cien, y las absorbancias para los pocillos transfectados con ARNip se compararon al valor control. Se realizaron ensayos en sextuplicado para cada uno de los tres cribados. Un subconjunto de ARNip se probó además en un intervalo de concentraciones de ARNip. Los ensayos se realizaron en células HeLa (14000 por pocillo; el método igual que anteriormente, tabla 5).

	Absorbancia relativa a 450 nm					
	Cribado I		Cribado II		Cribado III	
Dúplex	media	de	media	de	media	de
AL-DP-6226	20	10	28	11	43	9
AL-DP-6227	66	27	96	41	108	33
AL-DP-6228	56	28	76	22	78	18
AL-DP-6229	17	3	31	9	48	13
AL-DP-6230	48	8	75	11	73	7
AL-DP-6231	8	1	21	4	41	10
AL-DP-6232	16	2	37	7	52	14
AL-DP-6233	31	9	37	6	49	12
AL-DP-6234	103	40	141	29	164	45
AL-DP-6235	107	34	140	27	195	75
AL-DP-6236	48	12	54	12	56	12
AL-DP-6237	73	14	108	18	154	37
AL-DP-6238	64	9	103	10	105	24
AL-DP-6239	9	1	20	4	31	11
AL-DP-6240	99	7	139	16	194	43
AL-DP-6241	43	9	54	12	66	19
AL-DP-6242	6	1	15	7	36	8
AL-DP-6243	7	2	19	5	33	13
AL-DP-6244	7	2	19	3	37	13
AL-DP-6245	25	4	45	10	58	9
AL-DP-6246	34	8	65	10	66	13
AL-DP-6247	53	6	78	14	105	20
AL-DP-6248	7	0	22	7	39	12
AL-DP-6249	36	8	48	13	61	7

Tabla 5

Los nueve dúplex de ARNip que mostraron mayor inhibición de crecimiento en la tabla 5 se volvieron a ensayar en un intervalo de concentraciones de ARNip en células HeLa. Las concentraciones de ARNip ensayadas fueron 100 nM, 33,3 nM, 11,1 nM, 3,70 nM, 1,23 nM, 0,41 nM, 0,14 nM y 0,046 nM. Los ensayos se realizaron en sextuplicado, y se calculó la concentración de cada ARNip que produjo inhibición del cincuenta por ciento de la proliferación celular (CI₅₀). Este análisis de dosis y respuesta se realizó entre dos y cuatro veces para cada dúplex. Se dan los valores CI₅₀ medios en la tabla 6.

Dúplex	CI ₅₀ media
AL-DP-6226	15,5
AL-DP-6229	3,4
AL-DP-6231	4,2
AL-DP-6232	17,5
AL-DP-6239	4,4
AL-DP-6242	5,2
AL-DP-6243	2,6
AL-DP-6244	8,3
AL-DP-6248	1,9

Tabla 6

Cribado in vitro de ARNip de Eg5 a través de proliferación celular

5 Directamente antes de la transfección, se sembraron células Hela S3 (número de la ATCC: CCL-2.2, LCG Promochem GmbH, Wesel, Alemania) a $1,5 \times 10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemania) en 75 µl de medio de crecimiento (Ham F12, suero de ternera fetal al 10%, penicilina 100 u/estreptomicina 100 µg/ml, todo de Biochrom AG, Berlín, Alemania). Las transfecciones se realizaron en

10 cuadruplicados. Para cada pocillo se mezclaron 0,5 µl de Lipofectamina2000 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania) con 12 µl de Opti-MEM (Invitrogen) y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Para que la concentración del ARNip fuera 50 nM en los 100 µl del volumen de transfección, se mezclaron 1 µl de ARNip 5 µM con 11,5 µl de Opti-MEM por pocillo, se combinaron con la mezcla Lipofectamina2000-Opti-MEM y de nuevo se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los complejos ARNip-Lipofectamina2000 se aplicaron

15 completamente (25 µl de cada uno por pocillo) a las células y las células se incubaron durante 24 h a 37°C y CO₂ al 5% en un incubador humidificado (Heraeus GmbH, Alemania). Se hizo el cribado de dosis única una vez a 50 nM y 25 nM, respectivamente.

20 Las células se recogieron aplicando 50 µl de mezcla de lisis (contenido del kit QuantiGene bDNA de Genospectra, Fremont, EE UU) a cada pocillo que contenía 100 µl de medio de cultivo y se lisaron a 53°C durante 30 min. Después de ello, se incubaron 50 µl de los lisados con conjuntos de sondas específicas para Eg5 humano y GADPH humana y se siguió según el protocolo del fabricante para QuantiGene. Al final se midió la quimioluminiscencia en un Victor2-Light (Perkin Elmer, Wiesbaden, Alemania) como ULR (unidades de luz relativas) y los valores obtenidos con el conjunto de sondas de hEg5 se normalizaron a los valores de GADPH respectivos para cada pocillo. Los valores

25 obtenidos con ARNip dirigidos contra Eg5 se refirieron al valor obtenido con un ARNip inespecífico (dirigido contra HCV) que se ajustó al 100% (tablas 1, 2 y 3).

Los ARNip eficaces del cribado se caracterizaron adicionalmente por curvas de dosis y respuesta. Se realizaron las transfecciones de las curvas de dosis y respuesta a las siguientes concentraciones: 100 nM, 16,7 nM, 2,8 nM, 0,46 nM, 77 picoM, 12,8 picoM, 2,1 picoM, 0,35 picoM, 59,5 fM, 9,9 fM y control (sin ARNip) y se diluyeron con Opti-MEM a una concentración final de 12,5 µl según el protocolo anterior. El análisis de datos se realizó usando el software complemento de Microsoft Excel XL-fit 4.2 (IDBS, Guildford, Surrey, RU) y aplicando el modelo de dosis y respuesta número 205 (tablas 1, 2 y 3).

30

35 El ARNip inicial AD12115 se analizó además aplicando el ensayo de proliferación WST de Roche (como se ha descrito previamente).

Un subconjunto de 34 dúplex de la tabla 2 que mostraron la mayor actividad se ensayó por transfección en células HeLa a concentraciones finales que variaban desde 100 nM a 10 fM. Las transfecciones se realizaron en cuadruplicado para cada dúplex. Se calculó la concentración que daba el 20% (CI₂₀), 50% (CI₅₀), y el 80% (CI₈₀) de reducción del ARNm de KSP para cada dúplex (tabla 7).

40

Concentraciones dadas en pM

	CI ₂₀		CI ₅₀		CI ₈₀	
Nombre del dúplex	1 ^{er} cribado	2 ^o cribado	1 ^{er} cribado	2 ^o cribado	1 ^{er} cribado	2 ^o cribado
AD12077	1,19	0,80	6,14	10,16	38,63	76,16
AD12078	25,43	25,43	156,18	156,18	ND	ND
AD12085	9,08	1,24	40,57	8,52	257,68	81,26
AD12095	1,03	0,97	9,84	4,94	90,31	60,47
AD12113	4,00	5,94	17,18	28,14	490,83	441,30
AD12115	0,60	0,41	3,79	3,39	23,45	23,45
AD12125	31,21	22,02	184,28	166,15	896,85	1008,11
AD12134	2,59	5,51	17,87	22,00	116,36	107,03
AD12149	0,72	0,50	4,51	3,91	30,29	40,89
AD12151	0,53	6,84	4,27	10,72	22,88	43,01

AD12152	155,45	7,56	867,36	66,69	13165,27	ND
AD12157	0,30	26,23	14,60	92,08	14399,22	693,31
AD12166	0,20	0,93	3,71	3,86	46,28	20,59
AD12180	28,85	28,85	101,06	101,06	847,21	847,21
AD12185	2,60	0,42	15,55	13,91	109,80	120,63
AD12194	2,08	1,11	5,37	5,09	53,03	30,92
AD12211	5,27	4,52	11,37	18,93	26,74	191,07
AD12257	4,56	5,20	21,68	22,75	124,69	135,82
AD12280	2,37	4,53	6,89	20,23	64,80	104,82
AD12281	8,81	8,65	19,68	42,89	119,01	356,08
AD12282	7,71	456,42	20,09	558,00	ND	ND
AD12285	ND	1,28	57,30	7,31	261,79	42,53
AD12292	40,23	12,00	929,11	109,10	ND	ND
AD12252	0,02	18,63	6,35	68,24	138,09	404,91
AD12275	25,76	25,04	123,89	133,10	1054,54	776,25
AD12266	4,85	7,80	10,00	32,94	41,67	162,65
AD12267	1,39	1,21	12,00	4,67	283,03	51,12
AD12264	0,92	2,07	8,56	15,12	56,36	196,78
AD12268	2,29	3,67	22,16	25,64	258,27	150,84
AD12279	1,11	28,54	23,19	96,87	327,28	607,27
AD12256	7,20	33,52	46,49	138,04	775,54	1076,76
AD12259	2,16	8,31	8,96	40,12	50,05	219,42
AD12276	19,49	6,14	89,60	59,60	672,51	736,72
AD12321	4,67	4,91	24,88	19,43	139,50	89,49

(ND - no determinado)

Tabla 7

5 Silenciamiento de Eg5/KSP en hígado en ratas jóvenes después de administración embolada única de ARNip formulado con LNP01

Desde el nacimiento hasta aproximadamente 23 días de edad, la expresión de Eg5/KSP se puede detectar en el hígado de rata en crecimiento. Se evaluó el silenciamiento dirigido con un ARNip de Eg5/KSP formulado en ratas jóvenes.

Dúplex de KSP probado

Dúplex ID	Diana	Sentido	Antisentido
AD6248	KSP	AccGAAGuGuuGuuuGuccTtT (SEQ ID NO:1238)	GGAcAAAcAAcACUUCGGUTtT (SEQ ID NO:1239)

15 Métodos

Dosificación de los animales. Se administraron a ratas Sprague-Dawley jóvenes, machos (19 días de edad) dosis únicas de ARNip formulado con lipidoide ("LNP01") a través de inyección en la vena de la cola. Grupos de diez animales recibieron dosis de 10 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso corporal bien de AD6248 o un ARNip inespecífico. Nivel de dosis se refiere a la cantidad de dúplex de ARNip administrada en la formulación. Un tercer grupo recibió solución salina tamponada con fosfato. Los animales se sacrificaron dos días después de la administración del ARNip. Los hígados se disecaron, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se pulverizaron en polvos.

Medidas de ARNm. Se midieron los niveles del ARNm de Eg5/KSP en hígados de todos los grupos de tratamiento. Se homogenizaron muestras de cada polvo de hígado (aproximadamente diez miligramos) en tampón de lisis de tejido que contenía proteinasa K. Se midieron niveles del ARNm de Eg5/KSP y GADPH en triplicado para cada muestra usando el ensayo de ADN ramificado Quantigene (GenoSpectra). Se normalizaron los valores medios para Eg5/KSP respecto a los valores medios de GADPH para cada muestra. Se determinaron medias de grupo y se normalizaron respecto al grupo de PBS para cada experimento.

Análisis estadístico. Se determinó la significancia por ANOVA seguido por la prueba de Tukey post-hoc.

35 Resultados

Resumen de datos

Se dan los valores medios ($\pm$ desviación estándar) para el ARNm de Eg5/KSP. Se muestra la significación estadística (valor de p) frente al grupo de PBS (ns, no significativo [$p > 0,05$]).

Experimento 1

	VEGF/GADPH	valor de p
PBS	1,0 $\pm$ 0,47	
AD6248 10 mg/ml	0,47 $\pm$ 0,12	<0,001
inespecífico 10 mg/ml	1,0 $\pm$ 0,26	ns

Se obtuvo una reducción estadísticamente significativa en el ARNm de Eg5/KSP en hígado después del tratamiento con AD6248 formulado a una dosis de 10 mg/kg.

Silenciamiento de VEGF de hígado de rata después de infusión intravenosa de dúplex de ARNip formulados con LNP01

Se administró una formulación "lipidoide" que comprendía una mezcla equimolar de dos ARNip a ratas. Un ARNip (AD3133) se dirigía hacia VEGF. El otro (AD12115) se dirigía hacia Eg5/KSP. Puesto que la expresión de Eg5/KSP es casi indetectable en el hígado de rata adulta, solo se midieron niveles de VEGF después del tratamiento con ARNip.

Dúplex de ARNip administrados

Dúplex ID	Diana	Sentido	Antisentido
AD12115	Eg5/KSP	ucGAGAAucAAAcuAAcuTsT (SEQ ID NO:1240)	AGUuAGUuUuAGAUUCUCGATsT (SEQ ID NO: 1241)
AD3133	VEGF	GcAcAuAGGAGAGAUgAGCUsU (SEQ ID NO:1242)	AAGCUcAUCUCUCCuAuGuGCUsG (SEQ ID NO:1243)

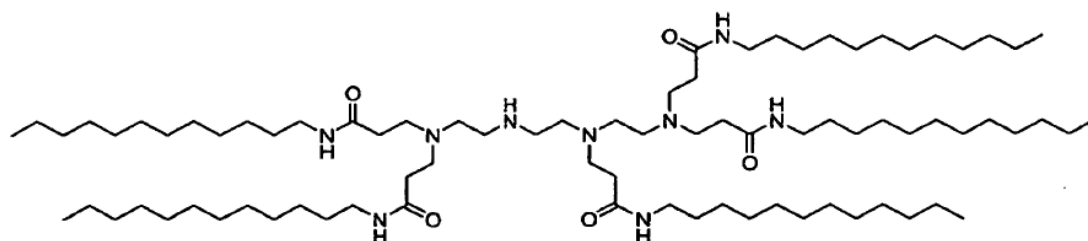
Clave: A, G, C, U - ribonucleótidos; c, u - 2'-O-Me-ribonucleótidos; s - fosforotioato.

Métodos

Dosificación de los animales. Se administró a ratas Sprague-Dawley hembras, adultas ARNip formulados con lipidoide ("LNP01") mediante una infusión de dos horas en la vena femoral. Grupos de cuatro animales recibieron dosis de 5, 10 y 15 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso corporal de ARNip formulado. Nivel de dosis se refiere a la cantidad de dúplex de ARNip administrada en la formulación. Un cuarto grupo recibió solución salina tamponada con fosfato. Los animales se sacrificaron 72 horas después del final de la infusión del ARNip. Los hígados se disecaron, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se pulverizaron en polvos.

Procedimiento de formulación

Se usaron el lipidoide ND98-4HCl (MW 1487) (Fórmula 1), colesterol (Sigma-Aldrich), y PEG-ceramida (Avanti Polar Lipids) para preparar nanopartículas de lípido-ARNip. Se prepararon soluciones madre de cada uno en etanol: ND98, 133 mg/ml; colesterol, 25 mg/ml; PEG-ceramida C16, 100 mg/ml. Las soluciones madre de ND98, colesterol y PEG-ceramida C16 se combinaron después en una proporción molar 42:48:10. La solución de lípidos combinados se mezcló rápidamente con ARNip acuoso (en acetato de sodio pH 5) de modo que la concentración final de etanol fue 35-45% y la concentración final de acetato fue 100-300 mM. Las nanopartículas lípido-ARNip se formaron espontáneamente al mezclar. Dependiendo de la distribución del tamaño de partícula deseada, la mezcla de nanopartículas resultante en algunos casos se extruyó a través de una membrana de policarbonato (límite de 100 nm) usando un extrusor térmico (Lipex Extruder, Northern Lipids, Inc). En otros casos, el paso de extrusión se omitió. La eliminación del etanol y el intercambio simultáneo de tampón se logró bien por diálisis o filtración de flujo tangencial. El tampón se intercambió a solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,2.



Fórmula 1

Caracterización de las formulaciones

Las formulaciones preparadas bien por el método estándar o sin extrusión se caracterizan de una manera similar. Las formulaciones se caracterizan primero por inspección visual. Deben ser soluciones translúcidas blanquecinas sin agregados o sedimento. El tamaño de partícula y la distribución del tamaño de partícula de las nanopartículas de lípidos se miden por dispersión de luz dinámica usando un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, EE UU). Las partículas deben tener 20-300 nm, e idealmente, 40-100 nm de tamaño. La distribución del tamaño de partícula debe ser unimodal. La concentración de ARNip total en la formulación, así como la fracción atrapada, se estima usando un ensayo de exclusión de colorante. Una muestra del ARNip formulado se incuba con el colorante que se une a ARN Ribogreen (Molecular Probes) en presencia o ausencia de un tensioactivo que altera la formulación, Triton X-100 al 0,5%. El ARNip total en la formulación se determina por la señal de la muestra que contiene el tensioactivo, relativo a una curva estándar. Se determina la fracción atrapada restando el contenido de ARNip "libre" (medido por la señal en ausencia de tensioactivo) del contenido total de ARNip. El porcentaje de ARNip atrapado es típicamente >85%.

Medidas de ARNm. Se homogenizaron muestras de cada polvo de hígado (aproximadamente diez miligramos) en tampón de lisis de tejido que contenía proteinasa K. Se midieron niveles del ARNm de VEGF y GADPH en triplicado para cada muestra usando el ensayo de ADN ramificado Quantigene (GenoSpectra). Se normalizaron los valores medios para VEGF respecto a los valores medios de GADPH para cada muestra. Se determinaron medias de grupo y se normalizaron respecto al grupo de PBS para cada experimento.

Medidas de proteína. Se homogenizaron muestras de cada polvo de hígado (aproximadamente 60 miligramos) en 1 ml de tampón RIPA. Se determinaron las concentraciones totales de proteína usando el kit de ensayo de proteína BCA (Pierce). Se usaron muestras de proteína total de cada animal para determinar los niveles de proteína VEGF usando un ensayo ELISA de VEGF (R&D systems). Se determinaron medias de grupo y se normalizaron respecto al grupo de PBS para cada experimento.

Análisis estadístico. Se determinó la significancia por ANOVA seguido por la prueba de Tukey post-hoc.

Resultados

Resumen de datos

Se muestran los valores medios ($\pm$ desviación estándar) para el ARNm (VEGF/GADPH) y proteína (VEGF rel.) para cada grupo de tratamiento. Se muestra la significación estadística (valor de p) frente al grupo de PBS para cada experimento

	VEGF/GADPH	valor de p	VEGF rel	valor de p
PBS	1,0 $\pm$ 0,17		1,0 $\pm$ 0,17	
5 mg/kg	0,74 $\pm$ 0,12	<0,05	0,23 $\pm$ 0,03	<0,001
10 mg/kg	0,65 $\pm$ 0,12	<0,005	0,22 $\pm$ 0,03	<0,001
15 mg/kg	0,49 $\pm$ 0,17	<0,001	0,20 $\pm$ 0,04	<0,001

Se midieron reducciones estadísticamente significativas en el ARNm y proteína de VEGF en hígado en los tres niveles de dosis de ARNip.

TABLA 1

posición en # de acceso humano	secuencia de sitio diana 23mero total	SEQ 1 secuencia sentido (5'-3')	SEQ 1: secuencia antisentido (5'-3')	nombre del dúplex	cribado de dosis única @ 25 nM (% de ARNm residual)	2º cribado de DU (entre cuadru plicados)
385-407	ACCGAAGUGUUGUUGUCCAAAU	1 CGAAGUGUUGUUGUCCAAATST	2 UUGGACAAACACACACUCGTST	AL-DP-6226	23%	3%
347-369	UAUGGUGUUGGAGCAUCUACUA	3 UGGUGUUGGAGCAUCUACTST	4 GUAGUUGUCCAAACACACTST	AL-DP-6227	69%	10%
1078-1100	AAUCUAAACUACUAGAUCCUC	5 UCUAAACUACUAGAUCCUACTST	6 GGAUUCUAGUUAAGUUAAGATST	AL-DP-6228	33%	2%
1067-1089	UCCUUAUCGAGAAUCUAAACUA	7 CUUAUCGAGAAUCUAAACUACTST	8 AGUUAAGAUUUCGAAUAAATST	AL-DP-6229	2%	2%
374-396	GAUUGAUGUUUACCGAAGUGUUG	9 UUGAUGUUUACCGAAGUGUACTST	10 ACACUUCGGUAAACAUCAATST	AL-DP-6230	66%	11%
205-227	UGGUGAGAUCCAGACCAUUUAU	11 GUGAGAUUGAGACCAUUUAATST	12 UAAUUGGUCUGCAUCUACTST	AL-DP-6231	17%	1%
1176-1198	ACUCUGAGUACAUUGGAAUUGC	13 UCUGAGUACAUUGGAAUUAATST	14 AUAUUCCAUUGUACUCAGATST	AL-DP-6232	9%	3%
386-408	CCGAGUGUUGUUGUCCAAUUC	15 GAAAGUGUUGUUGUCCAAUACTST	16 AUUGGACAAACACACUUCTST	AL-DP-6233	24%	6%
416-438	AGUUAUUAUGGCUUAUAUUGCA	17 UUAUUAUGGCUUAUAUUGACTST	18 CAUUAUAGCCCAUUAUUAATST	AL-DP-6234	91%	2%
485-507	GGAGGUGAAAGGUCACCUAAUG	19 AAGGUGAAAGGUCACCUAAATST	20 UAAGGUGACCUUUCACCUUATST	AL-DP-6235	112%	4%
476-498	UUUUAUAUGGAGGUGAAAGGU	21 UUAUAUAUGGAGGUGAAAGUACTST	22 CUUUCACCUUCCAUUGUAATST	AL-DP-6236	69%	4%
486-508	GAAGGUGAAAGGUCACCUAAUGA	23 AGGUGAAAGGUCACCUAAUATST	24 AUAGGUGACCUUUCACCUUATST	AL-DP-6237	42%	2%
487-509	AAGGUGAAAGGUCACCUAAUGAA	25 GGUGAAAGGUCACCUAAUATST	26 CAUUAAGGUGACCUUUCACCTST	AL-DP-6238	45%	2%
1086-1088	UUCUUAUCGAGAAUCUAAACUA	27 CCUUAUCGAGAAUCUAAACTST	28 GUUAAGAUUUCGAAUAGGTST	AL-DP-6239	2%	1%
1256-1278	AGCUCUUAUUAAGGAGUAUACGG	29 CUCUUAUUAAGGAGUAUACTST	30 GUUAACUCCUUAUAAAGAGTST	AL-DP-6240	48%	2%
2329-2351	CAGAGAGAUUCUGUCUUGGAG	31 GAGAGAUUCUGUCUUGGACTST	32 CCAAGACACAGAAUUCUUCTST	AL-DP-6241	41%	2%
1077-1099	GAUCUAAACUACUAGAAUCCU	33 AUCUAAACUACUAGAAUACTST	34 GAUUCUAGUUAUUAAGUATST	AL-DP-6242	8%	2%
1244-1266	ACUCACCAAAAGCUCUUAUUA	35 UCACCAAAAGCUCUUAUATST	36 AUAAGAGCUUUUUGUGUATST	AL-DP-6243	7%	1%
637-659	AAGAGCUUUUUGAUUCUUAUAU	37 GAGCUUUUUGAUUCUUAUATST	38 UAAGAAGAUCAAAAAGCUCTST	AL-DP-6244	6%	2%
1117-1139	GGCGUACAAAGAACUUAUAUU	39 GGUACAAAGAACUUAUAATST	40 UUAUAGAUUUCUUAAGUATST	AL-DP-6245	12%	2%
373-395	AGAUAUGUUUUAACGAGUGUU	41 AUAUAUGUUUUAACGAGUACTST	42 CACUUGGUAACAUCAUATST	AL-DP-6246	28%	3%
1079-1101	AUCUAAACUACUAGAAUCCUC	43 CUAAACUACUAGAAUCCUACTST	44 AGGAUUCUAGUUAAGUUAAGTST	AL-DP-6247	71%	4%
383-405	UUACGAGUGUUGUUGUCCAA	45 ACCGAGUGUUGUUGUCCUACTST	46 GGACAAACACACUUCGGUATST	AL-DP-6248	5%	2%
200-222	GGUGGUGGAGAGUAGCAACCAU	47 UGGUGGUGAGAGUAGCAACTST	48 GGUCUGCAUCUACACCACTST	AL-DP-6249	28%	3%

TABLA 2

posición en # de acceso humano	secuencia de sitio diana 19mero total	seqID	secuencia sentido (5'-3')	seqID	secuencia antisentido (5'-3')	nombre del duplex	1er cribado de dosis única @ 50 nM (% de ARNm residual)	1er cribado de dosis única @ 25nM (% residual)	2º cribado de DU (entre cuadru plicados)	3er cribado de dosis única @ 25nM	3er cribado de DU (entre cuadru plicados)
829-847	CAUACUCUAGUGUCCCA	49	CAUACUCUAGUGUCCCAT	50	UGGGAACGACAGAGUAGT	AD-12072	65%	2%	5%		
246-264	AGCGCCCAUUCAGUAG	51	AGCGCCCAUUCAGUAGT	52	CUACUUAUUGGCGGCT	AD-12073	84%	1%	6%		
238-256	GGAAGCAGCGCCCAUUC	53	GGAAGCAGCGCCCAUUC	54	GAUUGGCGGAGCUUUCCT	AD-12074	51%	3%	9%		
239-257	GAAAGCAGCGCCCAUUC	55	GAAAGCAGCGCCCAUUC	56	UGAUGGCGGAGCUUUCCT	AD-12075	56%	4%	4%		
878-896	AGAAACUACGUAUUGGA	57	AGAAACUACGUAUUGGAT	58	UCCAUCAUUGGUAUUCCT	AD-12076	21%	4%	3%		
1064-1082	UGUUCUUAUCGAGAUUCU	59	UGUUCUUAUCGAGAUUC	60	AGAUUCUGUAAGGAACT	AD-12077	11%	2%	1%		
3278-3296	CAGAUUACCUUCGCGCC	61	CAGAUUACCUUCGCGCT	62	GGCUGGAGGUAUUCGCT	AD-12078	22%	3%	2%		
247-265	GGCCCAUUCAGUAGUA	63	GCGCCCAUUCAGUAGAT	64	UCUACUUAUGAUGGCGCT	AD-12079	22%	10%	7%		
434-452	UUGCACAUCUUUGGUU	65	UUGCACAUCUUUGGUAT	66	AUACGCAAGUAGUGAAT	AD-12080	68%	4%	52%	13%	
232-250	CAGAGCGGAAGCGGCG	67	CAGAGCGGAAGCGGCT	68	GGCGAGCUUCCGCGUCCT	AD-12081	34%	8%	35%	24%	
1831-1849	AGACCUUAUUGGUUAUCU	69	AGACCUUAUUGGUUAUC	70	AGUUACCAUAAGGUCCT	AD-12082	20%	2%	92%	5%	
1105-1123	AUUCUCUUGGAGCGUAC	71	AUUCUCUUGGAGCGUACT	72	GUAGCCCUCCAAAGAUAT	AD-12083	85%	6%	63%	10%	
538-554	GGCUGGUUAUUAUCCAGU	73	GGCUGGUUAUUAUCCAG	74	ACGUGGAUUAUACCGCT	AD-12084	18%	6%	17%	4%	
236-254	GCGGAAGCAGCGCCCAU	75	GCGGAAGCAGCGCCCAU	76	AUGGCGCAGCUUUCGCT	AD-12085	13%	4%	12%	4%	
435-453	UGCACUAUUCUUGGUAUG	77	UGCACUAUUCUUGGUAUG	78	CAUACGCAAGUAUGGAT	AD-12086	26%	5%	17%	3%	
541-559	GUUAUAUCCAGUACCU	79	GUUAUAUCCAGUACCU	80	AGGGAUGGUAUUAUACT	AD-12087	95%	4%	80%	4%	
1076-1094	AGAAUCUAAACUAACUAGA	81	AGAAUCUAAACUAACUAG	82	UCUAGUAUUAUAGAUUC	AD-12088	29%	6%	29%	2%	
1432-1450	AGAGGCUAGUUGGUUAC	83	AGAGGCUAGUUGGUUACT	84	GUAAACCUUAUAGCUCCT	AD-12089	69%	5%	64%	7%	
1821-1839	GAAGUACUAUAGACCUU	85	GAAGUACUAUAGACCUU	86	AUAAGGCUUAUAGUACU	AD-12090	46%	15%	34%	5%	
2126-2144	GACAGUGGCGGAUAGUA	87	GACAGUGGCGGAUAGUA	88	UAUUCUUAUUGGCGGCT	AD-12091	16%	6%	17%	3%	
2373-2391	AAACCAUAGUAGUUGCC	89	AAACCAUAGUAGUUGCT	90	GGACACUACUAGUGGUU	AD-12092	82%	26%	63%	5%	
4026-4044	UCCUAGACUCCCUUUU	91	UCCUAGACUCCCUUUU	92	AAUAGGGAUAGUAGGAT	AD-12093	84%	4%	70%	4%	
4030-4048	UAGACUCCCUUUUCCU	93	UAGACUCCCUUUUCCU	94	AGCGAAUAGGGAUACU	AD-12094	46%	3%	34%	1%	
144-162	GCGUCGACGCAAAUUGU	95	GCGUCGACGCAAAUUG	96	ACGAUUGGCGGCGGCT	AD-12095	14%	2%	13%	1%	
242-260	AGUAGCGCCCAUUAUA	97	AGUAGCGCCCAUUAUA	98	UAUUGAAUUGGCGGCT	AD-12096	26%	11%	17%	1%	
879-897	GAACUACGUAUUGGAG	99	GAACUACGUAUUGGAG	100	CUCAUCUACUAGUUCCT	AD-12097	23%	2%	21%	1%	
2134-2152	CCGUAAGUAAGUAUCA	101	CCGUAAGUAAGUAUCA	102	UGAUUCUACUUAUCGCT	AD-12098	41%	14%	17%	3%	
245-263	UAGCGCCCAUUAUAGUA	103	UAGCGCCCAUUAUAGUA	104	UAUAUUAUAGGCGGCT	AD-12099	57%	2%	48%	6%	
444-462	UUUGCGUAUUGGCAACUG	105	UUUGCGUAUUGGCAACU	106	CAGUUUGGCAUACGCAAT	AD-12100	101%	11%	98%	8%	
550-568	CACGUACCCCUCAUAAU	107	CACGUACCCCUCAUAAU	108	AUUUGAUAAGGUAUGGCT	AD-12101	46%	7%	32%	2%	
442-460	UCUUGCGUAUGGCAAC	109	UCUUGCGUAUGGCAAC	110	GUUUGGCAUACGCAAGAT	AD-12102	96%	17%	88%	18%	
386-404	CCGAAGUGUUGUUGCCA	111	CCGAAGUGUUGUUGCCA	112	UGCAAAACAAACUUCGCT	AD-12103	19%	5%	20%	2%	

TABLE 2

233-251	AGAGCGGAAGCUAGCGCC	113	AGAGCGGAAGCUAGCGCTsT	114	GGCGGAGCUUUCGCGCUTsT	AD-12104	40s	8s	24s	2s	
243-261	GCUAGCGCCAUUCRAUAG	115	GCUAGCGCCAUUCRAUAGTsT	116	CUUUGAUAUGGCGCGUAGCTsT	AD-12105	39s	2s	36s	10s	
266-304	AAGUUAUGUAGCGACUUGG	117	AAGUUAUGUAGCGACUUGGTsT	118	CCAGUUGCUAGCAUACUUTsT	AD-12106	87s	6s	79s	19s	
294-312	GUACGAUCUGGAGGAUUGG	119	GUACGAUCUGGAGGAUUGGTsT	120	CCAAUUCUCCAGUUGUAGCTsT	AD-12107	29s	2s	32s	16s	
286-314	ACGAACUGGAGGAUUGGU	121	ACGAACUGGAGGAUUGGUtTsT	122	AGCCAAUCCUCCAGUUGCUTsT	AD-12108	38s	4s	39s	8s	
373-391	AGAUUGAUUUUAACCGAAG	123	AGAUUGAUUUUAACCGAAGTsT	124	CUUCGGUAACAUCAUUCUTsT	AD-12109	49s	3s	44s	10s	
422-440	UAUGGGCUAUAUUUGCACU	125	UAUGGGCUAUAUUUGCACuTsT	126	AGUGCAUAUAUAGCCCAUATsT	AD-12110	85s	5s	80s	14s	
441-459	AUCUUUGCUUUGGCCMAA	127	AUCUUUGCUUUGGCCMAATsT	128	UUUGGCCAAUACGCAAAUATsT	AD-12111	64s	6s	71s	18s	
832-850	ACUCUAGUCUUCUCCACUC	129	ACUCUAGUCUUCUCCACuTsT	130	GAGUGGCAACGACUAGAGUTsT	AD-12112	48s	4s	41s	5s	
881-899	AACUACGAUUGAUGGAGAA	131	AACUACGAUUGAUGGAGATsT	132	UUUCUCCAUCAUUCGUGAGUTsT	AD-12113	13s	0s	14s	3s	
975-993	GAUAAGAGAGCUCGGGAG	133	GAUAAGAGAGCUCGGGAGTsT	134	UUUCCCGGCUUCUUAUATsT	AD-12114	32s	6s	16s	4s	
1073-1091	UCGACAUCUUAACUACU	135	UCGACAUCUUAACUACuTsT	136	AGUUAUUUAAGAUUCUGATsT	AD-12115	8s	4s	7s	5s	
1084-1102	AACUAAUCUAGAUCCUCCA	137	AACUAAUCUAGAUCCUCCATsT	138	UGGAGGAUUCUAUUGUAGUTsT	AD-12116	74s	5s	61s	7s	
1691-1709	GGUUCGUAGAGGCGAGUU	139	GGUUCGUAGAGGCGAGuTsT	140	AACUGCCUUCUUAUCGACUTsT	AD-12117	21s	4s	20s	2s	
1693-1711	AUCGUAGAGAGCGUUGA	141	AUCGUAGAGAGCGUUGATsT	142	UCUACUGCCUUCUUAACUATsT	AD-12118	44s	4s	42s	6s	
1702-1720	AGGCAGUUGACCAACAA	143	AGGCAGUUGACCAACAcTsT	144	UUUGUUGUGCAACUGCUTsT	AD-12119	37s	4s	24s	3s	
2131-2149	UGGCGGAUAGAGUAGAGA	145	UGGCGGAUAGAGUAGAGATsT	146	UUUCUUAUCUUAUCGGCCATsT	AD-12120	22s	2s	15s	4s	
2412-2430	UCUAAGGAUAUUGCAACA	147	UCUAAGGAUAUUGCAAcTsT	148	UCUUGACUAUUCUUAUAGATsT	AD-12121	32s	1s	22s	2s	
2859-2877	ACUAGCUUAUUGCUUUC	149	ACUAGCUUAUUGCUUUCuTsT	150	GAAGCAUAUUAAGCUUAAGUTsT	AD-12122	36s	16s	19s	5s	
3294-3312	GCCAGAUACACCUUAU	151	GCCAGAUACACCUUAuTsT	152	AUUAAGGUUGAUUCUGGGCTsT	AD-12123	28s	1s	16s		
223-241	UUUAUUUGGCGAGGCGAA	153	UUUAUUUGGCGAGGCGATsT	154	UUCCGCUUGCCAAUUAATsT	AD-12124	28s	2s	16s		
1070-1088	UUUUCGAGAUUCUUAACUA	155	UUUUCGAGAUUCUUAACuTsT	156	UAGUUUAAGAUUCUUAUATsT	AD-12125	15s	1s	14s		
244-262	CUAGCGCCAUUCUAUUGU	157	CUAGCGCCAUUCUAUUGuTsT	158	ACUAUAUUAUUGGCGCAGTsT	AD-12126	51s	22s	27s		
257-275	AAUAGUAAGAUUGUAUCCU	159	AAUAGUAAGAUUGUAUCCuTsT	160	AGGAUUAUAUUCUAUUAUTsT	AD-12127	54s	4s	42s	9s	
277-295	UAUGAAGAGAUUAGUGU	161	UAUGAAGAGAUUAGUGuTsT	162	ACUAUAUUAUUCUUAUUGATsT	AD-12128	29s	1s	20s	2s	
284-302	AGAGUUAUGUGUACGAUCU	163	AGAGUUAUGUGUACGAUCuTsT	164	AGUUGCUACACUAACUUCUTsT	AD-12129	22s	3s	19s	3s	
366-384	ACUAAACAGAUUGAUUUU	165	ACUAAACAGAUUGAUUUuTsT	166	AAACUAUAUUCUGUUAUAGUTsT	AD-12130	53s	6s	42s	7s	
443-461	CUUUGGUAUGGCGCAACU	167	CUUUGGUAUGGCGCAACuTsT	168	AGUUUGGCAUAACGCAAGTsT	AD-12131	28s	5s	22s	3s	
504-522	AUUGAAGAUUAUCCUGGG	169	AUUGAAGAUUAUCCUGGTsT	170	CCAGGAUAUUCUUAUUGATsT	AD-12132	88s	2s	90s	18s	
543-561	AUAUUCCAGUACCCUUC	171	AUAUUCCAGUACCCUUCtTsT	172	GAAGGUAUCUGGUAUUAUTsT	AD-12133	34s	2s	26s	6s	
551-569	ACGUACCCUUCUUAUCAAUU	173	ACGUACCCUUCUUAUCAAuTsT	174	AAUUUGAUAAGGUAUAGUTsT	AD-12134	18s	3s	14s	2s	
552-570	CGUAUCCUUCUUAUCAAUU	175	CGUAUCCUUCUUAUCAAuTsT	176	AAUUUGAUAAGGUAUAGUTsT	AD-12135	50s	6s	37s	4s	
553-571	GUACCUUUCUUAUCAAUUU	177	GUACCUUUCUUAUCAAUUuTsT	178	ABAAUUUAUUAAGGUAUAGTsT	AD-12136	42s	19s	22s	2s	
577-595	AACUUAUGUAUAUGUAC	179	AACUUAUGUAUAUGUAcTsT	180	GUACCAUAUUAAGGUAUAGUTsT	AD-12137	85s	12s	92s	4s	
602-620	UUCAGUUAUUGUGUCUUG	181	UUCAGUUAUUGUGUCUUGtTsT	182	CAGAGACAUUUAAGUAGATsT	AD-12138	47s	6s	49s	1s	
652-670	UUUUAUUAUUAUUAUUA	183	UUUUAUUAUUAUUAUUAuTsT	184	UUAUAUAUUAUUAUUAUATsT	AD-12139	80s	5s	72s	4s	
747-765	ACAGUACACACACAGGAG	185	ACAGUACACACACAGGAGTsT	186	CNUCCUUAUUAUUAUUAUATsT	AD-12140	97s	22s	67s	9s	
877-895	AAGAAUUAUUAUUAUUAU	187	AAGAAUUAUUAUUAUUAuTsT	188	CCAUCAUUAUUAUUAUUAUTsT	AD-12141	120s	4s	107s	10s	
880-898	AAUUAUUAUUAUUAUUAU	189	AAUUAUUAUUAUUAUUAuTsT	190	UCUUAUUAUUAUUAUUAUTsT	AD-12142	55s	8s	33s	4s	
965-983	UGGAGCUUGUAUAGAGAG	191	UGGAGCUUGUAUAGAGATsT	192	UCUUAUUAUUAUUAUUAUTsT	AD-12143	64s	34s	19s	2s	

TABLA 2

1086-1104	CUAACUAGAAUCCUCCAGG	193	GUAAcUAGAAUcUcUcAGGTsT	194	CCUGAGGAAUcUcUcUAGTST	AD-12144	58s	29s	17s	2s	
1191-1208	GAUUAUCCUUAUAGAGCA	195	GAUUAUcUcUcUAGAGcATST	196	UUGCUUAUAGGAAUUAUcTST	AD-12145	27s	8s	18s	2s	
1195-1213	AUGCUUAUAGAGCAAGAA	197	AUGCUUAUAGAGcAAAGATST	198	UUCUUAUcUcUcUAGAGcAUTST	AD-12146	19s	20s	15s	1s	
1412-1430	AAAAUUGUGUUGUAG	199	AAAAUUGUGUUGUAGATST	200	CUCACAGcACcAAUUAUUTST	AD-12147	29s	9s	35s	3s	
1431-1449	GAGGAGCUGAAUAGGGUUA	201	GAGGAGCUGAAUAGGGUUAUTST	202	UAACCCUUAUcAGCUCUcTST	AD-12148	30s	3s	56s	5s	
1433-1451	GGAGCUGAAUAGGGUUA	203	GGAGCUGAAUAGGGUUAUTST	204	UGUAACCCUUAUcAGCUCUcTST	AD-12149	8s	2s	12s	3s	
1434-1452	GAGCUGAAUAGGGUUA	205	GAGCUGAAUAGGGUUAUTST	206	CUGUAACCCUUAUcAGCUCUcTST	AD-12150	31s	2s	31s	7s	
1435-1453	AGCUGAAUAGGGUUA	207	AGCUGAAUAGGGUUAUTST	208	UCUGUAACCCUUAUcAGCUCUcTST	AD-12151	9s	5s	14s	2s	
1436-1454	GUUGAAUAGGGUUA	209	GUUGAAUAGGGUUAUTST	210	UCUGUAACCCUUAUcAGCUCUcTST	AD-12152	3s	3s	23s	3s	
1684-1702	CCAAUUGGUAUAGAA	211	CCAAUUGGUAUAGAAUTST	212	UUCUUAAGGUAUcUUAUcTST	AD-12153	20s	6s	34s	4s	
1692-1710	GAUGUAAGGUAUAGAA	213	GAUGUAAGGUAUAGAAUTST	214	CAACUGGUAUcUUAUcTST	AD-12154	24s	7s	44s	3s	
1833-1851	ACCUUAUUGGUAUUGG	215	ACCUUAUUGGUAUUGGUTST	216	GCAGUAUcCAGAAUAGGUTST	AD-12155	33s	6s	53s	11s	
1872-1890	UUAUAGGUAUAGGUA	217	UUAUAGGUAUAGGUAUTST	218	CUGUAUAGGUAUcUUAUcTST	AD-12156	35s	5s	40s	5s	
1876-1894	AUACCUUAUAGGUA	219	AUACCUUAUAGGUAUTST	220	GUUAUAGGUAUcUUAUcTST	AD-12157	8s	3s	23s	4s	
1883-1901	UUAUAGGUAUAGGUA	221	UUAUAGGUAUAGGUAUTST	222	UCAAUAGGUAUcUUAUcTST	AD-12158	13s	2s	22s	5s	
1987-2005	AAAGUAUAGGUAUAGGUA	223	AAAGUAUAGGUAUAGGUAUTST	224	UGUAUAGGUAUcUUAUcTST	AD-12159	34s	6s	46s	5s	
2022-2040	CUAAGGUAUAGGUA	225	CUAAGGUAUAGGUAUTST	226	UUAAGGUAUcUUAUcTST	AD-12160	15s	3s	31s	4s	
2124-2142	UUGAGGUAUAGGUA	227	UUGAGGUAUAGGUAUTST	228	UCUUAUAGGUAUcUUAUcTST	AD-12161	88s	4s	83s	7s	
2125-2143	UGAGGUAUAGGUA	229	UGAGGUAUAGGUAUTST	230	AUCUUAUAGGUAUcUUAUcTST	AD-12162	26s	7s	32s	7s	
2246-2264	GAUUGGUAUAGGUA	231	GAUUGGUAUAGGUAUTST	232	AGUUAUAGGUAUcUUAUcTST	AD-12163	55s	9s	40s	3s	
2376-2394	CCAGGUAUAGGUA	233	CCAGGUAUAGGUAUTST	234	CCUGGUAUcUUAUcTST	AD-12164			21s	3s	
2504-2522	AGAAGGUAUAGGUA	235	AGAAGGUAUAGGUAUTST	236	AAACAAUUAUAGGUAUcTST	AD-12165	30s	3s	41s	4s	
2852-2870	UGUUAUAGGUAUAGGUA	237	UGUUAUAGGUAUAGGUAUTST	238	AUAAAGGUAUcUUAUcTST	AD-12166	9s	10s	22s	9s	
2853-2871	GUUUAUAGGUAUAGGUA	239	GUUUAUAGGUAUAGGUAUTST	240	AUUAAGGUAUcUUAUcTST	AD-12167	26s	3s	30s	2s	
3110-3128	UCUUAUAGGUAUAGGUA	241	UCUUAUAGGUAUAGGUAUTST	242	AGUUAUAGGUAUcUUAUcTST	AD-12168	54s	4s	59s	20s	
3764-3782	UCUUAUAGGUAUAGGUA	243	UCUUAUAGGUAUAGGUAUTST	244	AAAGGUAUcUUAUcTST	AD-12169	41s	4s	51s	16s	
3765-3783	CAUUAUAGGUAUAGGUA	245	CAUUAUAGGUAUAGGUAUTST	246	AAAGGUAUcUUAUcTST	AD-12170	43s	4s	52s	20s	
4027-4045	CCUUAUAGGUAUAGGUA	247	CCUUAUAGGUAUAGGUAUTST	248	GAUUAUAGGUAUcUUAUcTST	AD-12171	67s	3s	73s	25s	
4031-4049	AGCUUAUAGGUAUAGGUA	249	AGCUUAUAGGUAUAGGUAUTST	250	AAAGGUAUcUUAUcTST	AD-12172	53s	15s	37s	2s	
4082-4100	UCACCUUAUAGGUA	251	UCACCUUAUAGGUAUTST	252	UCUUAUAGGUAUcUUAUcTST	AD-12173	39s	0s	39s	0s	
4272-4290	UCCUUAUAGGUAUAGGUA	253	UCCUUAUAGGUAUAGGUAUTST	254	AGUUAUAGGUAUcUUAUcTST	AD-12174	41s	5s	27s	0s	
4275-4293	UUAUAGGUAUAGGUA	255	UUAUAGGUAUAGGUAUTST	256	AUUAAGGUAUcUUAUcTST	AD-12175	29s	0s	38s	14s	
4276-4294	UUAUAGGUAUAGGUA	257	UUAUAGGUAUAGGUAUTST	258	AUUAAGGUAUcUUAUcTST	AD-12176	43s	2s	56s	25s	
4282-4300	GGCUUAUAGGUAUAGGUA	259	GGCUUAUAGGUAUAGGUAUTST	260	AGGUAUcUUAUcTST	AD-12177	68s	6s	74s	30s	
4571-4589	UGUUAUAGGUAUAGGUA	261	UGUUAUAGGUAUAGGUAUTST	262	UGCUUAUAGGUAUcUUAUcTST	AD-12178	41s	4s	41s	6s	
4677-4695	AGUUAUAGGUAUAGGUA	263	AGUUAUAGGUAUAGGUAUTST	264	AAAUUAUAGGUAUcUUAUcTST	AD-12179	53s	5s	44s	5s	
152-170	GCACUUAUAGGUA	265	GCACUUAUAGGUAUTST	266	CUUUAUAGGUAUcUUAUcTST	AD-12180	16s	2s	13s	4s	
156-174	AUUAUAGGUAUAGGUA	267	AUUAUAGGUAUAGGUAUTST	268	UUAUAGGUAUcUUAUcTST	AD-12181	19s	3s	14s	2s	
491-509	UGAAAGGUAUAGGUA	269	UGAAAGGUAUAGGUAUTST	270	UUAUAGGUAUcUUAUcTST	AD-12182	16s	4s	18s	8s	
215-233	CAGACCUUAUAGGUA	271	CAGACCUUAUAGGUAUTST	272	UGCUUAUAGGUAUcUUAUcTST	AD-12183	26s	3s	19s	4s	

TABLE 2

216-234	AGACCAUUAUUUUGGCG	273	AGACCAUUAUUUUGGCGTST	274	CUUGCAAAUUAUUUUGGUCUTST	AD-12184	548	28	778	88
416-434	AGUUAUUUUGGCGUUAUU	275	AGUUAUUUUGGCGUUAUUTST	276	AUUUAGCCCAUUAUUUACUTST	AD-12185	88	18	98	18
537-555	GCUGGUUAUUUCCACGUA	277	GCUGGUUAUUUCCACGUATST	278	UACGUGGAUUUAUACCGCTST	AD-12186	368	38	418	68
221-239	AUUUAUUUUGGCGAGCGG	279	AUUUAUUUUGGCGAGCGTST	280	CGGUCUCUGCAAAUUAUUTST	AD-12187	348	178	278	18
222-240	UUUAUUUUGGCGACGCGGA	281	UUUAUUUUGGCGACGCGTST	282	UCCGUCUCUGCAAAUUAUATST	AD-12188	308	38	278	48
227-245	UUUGGCGAGCGGGAAGCU	283	UUUGGCGAGCGGGAAGCUST	284	AGCUUUCGUCUGCGCAATST	AD-12189	518	48	488	58
476-494	UUUUAUUUUGGAGGUGAA	285	UUUUAUUUUGGAGGUGAATST	286	UUUACCUUCCAUUGUAUATST	AD-12190	338	28	268	48
482-500	AUUGGAGGUGAAGGUGUA	287	AUUGGAGGUGAAGGUGUATST	288	UACCUUUCUCCUUCUATST	AD-12191	208	28	138	08
208-226	UGAGAUGGAGACCAUUA	289	UGAGAUGGAGACCAUUAATST	290	UUUAUUGGUCUGCAUUTST	AD-12192	218	18	238	108
147-165	UCCGAGGCAAUUUGGUCUG	291	UCCGAGGCAAUUUGGUCUTST	292	CAGACGAUUUUGGUCGATST	AD-12193	648	88	988	68
428-444	GGCUAUAUUUGCAUUAU	293	GGCUAUAUUUGCAUUAUTST	294	AGAUAUGCAUUAUAGCCTST	AD-12194	88	28	158	48
2123-2141	AUUGACAGUGGCGCAUAG	295	AUUGACAGUGGCGCAUAGTST	296	CUUAUUGGCAUUGUUAUTST	AD-12195	348	28	488	38
4028-4047	CUAGACUUCUUAUUUCCG	297	CUAGACUUCUUAUUUCCGCTST	298	GGCAAAUAGGGAAGUCAGTST	AD-12196	348	28	518	38
438-456	ACUUAUUUUGGUAUUGGCC	299	ACUUAUUUUGGUAUUGGCCCTST	300	GGCCAAUAGCAAGAUAGUTST	AD-12197	758	48	938	68
830-848	AUACUUAUGUGUUCAC	301	AUACUUAUGUGUUCACCTST	302	GUGGAAACGCAUAGAGUATST	AD-12198	558	58	488	28
876-894	AAAGAAACUAGUUAUG	303	AAAGAAACUAGUUAUGTST	304	CUAUAUUGCAUUAUUTST	AD-12199	1028	68	1188	98
115-133	GCUUAUUUUGGCGG	305	GCUUAUUUUGGCGGCTST	306	CCCGCAAAAUUAGGCTST	AD-12200	758	68	608	128
248-266	CGCCAUUAUUAUAGAA	307	CGCCAUUAUUAUAGAACTST	308	UUUAUUAUUAUAGGCTST	AD-12201	428	38	168	48
1834-1852	CCUUAUUUUGGUAUUCUGU	309	CCUUAUUUUGGUAUUCUGUTST	310	AGCAUUAUUAUAGGCTST	AD-12202	298	48	98	38
3050-3068	AGACAAUUCGCAUUG	311	AGACAAUUCGCAUUGTST	312	CACAUUGCAUUAUUTST	AD-12203	1148	148	898	208
4705-4723	UGACUUAUUAUAGUUAUU	313	UGACUUAUUAUAGUUAUTST	314	AAUUAUUAUUAUAGUATST	AD-12204	648	78	268	58
229-247	UUGGAGAGCGGAAGCUG	315	UUGGAGAGCGGAAGCUTST	316	CUAGCUUUCGUCUGCCTST	AD-12205	668	128	358	48
234-252	GAGCGGAAGCUGGCGCC	317	GAGCGGAAGCUGGCGCTST	318	GGGCGUAGUUAUUCGCTST	AD-12206	468	38	328	128
282-300	AAAGAAGUUAUUAUAGAA	319	AAAGAAGUUAUUAUAGAACTST	320	UUUUAUUAUUAUAGUATST	AD-12207	578	58	408	68
433-451	AUUGCAUUAUUAUUGGUA	321	AUUGCAUUAUUAUUGGUAUTST	322	UACGAAAGAUUAUAGUATST	AD-12208	308	88	108	58
540-558	GGUUAUAUUAUUAUAGCC	323	GGUUAUAUUAUUAUAGCCCTST	324	GGGUAUUAUUAUUAUAGCTST	AD-12209	1018	68	1028	238
831-849	UACUUAUUAUUAUUAUAGU	325	UACUUAUUAUUAUUAUAGUTST	326	AGUGGGAACGCAUAGUATST	AD-12210	388	118	278	148
872-890	UUAAGAAGAAUUAUUAUAG	327	UUAAGAAGAAUUAUUAUAGTST	328	AAUGGUAUUAUUAUUAUAGTST	AD-12211	168	68	108	58
1815-1833	AUGGAAAGAAUUAUUAUAG	329	AUGGAAAGAAUUAUUAUAGTST	330	UUAUAUUAUUAUUAUAGTST	AD-12212	598	88	658	58
1822-1840	AAGUAUAUUAUUAUUAUAG	331	AAGUAUAUUAUUAUUAUAGTST	332	AAUUAUUAUUAUUAUAGTST	AD-12213	248	98	128	28
3002-3020	ACAGCCUAGCUGUUAUAG	333	ACAGCCUAGCUGUUAUAGTST	334	CAGUAUAUUAUUAUUAUAGTST	AD-12214	678	148	708	128
3045-3063	AAAGAAGAAUUAUUAUAG	335	AAAGAAGAAUUAUUAUAGTST	336	CGGAAUUAUUAUUAUUAUAGTST	AD-12215	298	138	138	48
3224-3242	CACACUAGGAGGUCUUA	337	CACACUAGGAGGUCUUAATST	338	UUUAAGCUCUUAUUAUAGTST	AD-12216	368	48	138	18
3228-3244	CACUGAGAGGUCUUAAGU	339	CACUGAGAGGUCUUAAGUTST	340	ACUUAUUAUUAUUAUUAUAGTST	AD-12217	368	98	118	28
3227-3245	ACUGGAGAGGUCUUAAGU	341	ACUGGAGAGGUCUUAAGUTST	342	CACUUAUUAUUAUUAUUAUAGTST	AD-12218	358	58	178	38
145-163	CGUCCAGCCAAUUAUUGU	343	CGUCCAGCCAAUUAUUGUTST	344	GAGCAUUAUUAUUAUUAUAGTST	AD-12219	418	98	148	18
1700-1718	GAAGGAGUUAUUAUUAUAG	345	GAAGGAGUUAUUAUUAUAGTST	346	GUGUUAUUAUUAUUAUUAUAGTST	AD-12220	378	58	238	38
4291-4309	CAUUCACCCUAGCAGAUU	347	CAUUCACCCUAGCAGAUTST	348	AACUCUGCAGGUGAAUAGTST	AD-12221	588	78	398	68
4278-4296	AAGAGCCUUAUUAUUAUAG	349	AAGAGCCUUAUUAUUAUAGTST	350	UGAAUUAUUAUUAUUAUAGTST	AD-12222	748	98	538	38
3051-3069	GAGCAUUAUUAUUAUUAUAG	351	GAGCAUUAUUAUUAUUAUAGTST	352	CCACAUUAUUAUUAUUAUAGTST	AD-12223	748	108	678	78

TABLA 2

3058-3076	UUCGGAGUUGGAGUAGA	353	UUCGGAGUUGGAGUAGATST	354	UCACAUCCACAUCCGGATST	AD-12224	24%	11%	2%	2%
241-259	AGCUAGCGCCCAUUCAU	355	AGCUAGCGCCCAUUCAUTST	356	AUUGAAUGCGCGCAUUCUTST	AD-12225	75%	5%	76%	14%
285-303	GAAGUAGUGUAGCAACUG	357	GAAGUAGUGUAGCAACUTST	358	CAGUUCGACGACACUUCUTST	AD-12226	45%	8%	40%	3%
542-560	UAUAUCCCAAGUACCCUU	359	UAUAUCCCAAGUACCCUUTST	360	PAGGGUAGUGGAUUAUAUTST	AD-12227	61%	6%	47%	5%
2127-2145	ACAGUUGCGGAGUAGUAG	361	ACAGUUGCGGAGUAGUAGTST	362	CUAUUUUAUUGCGCACUGUTST	AD-12228	28%	3%	25%	5%
3780-3778	UCUGUACUCCUUAUAGUIC	363	UCUGUACUCCUUAUAGUICUTST	364	GAACUAUAGGGAUACAGATST	AD-12229	54%	13%	37%	6%
3993-4011	UUCUUGCUUUGACUUGUGU	365	UUCUUGCUUUGACUUGUGUTST	366	ACACAGUUAUAGCAAGATST	AD-12230	70%	17%	65%	4%
1686-1714	GUAGAGGCGAGUUGACCA	367	GUAGAGGCGAGUUGACCATST	368	UGGUGACUUGCCUUCUUAUTST	AD-12231	32%	12%	22%	6%
2122-2140	CAUUGACUGGCGGUAUA	369	CAUUGACUGGCGGUAUATST	370	UUUAUGCGCCACUGUUAUTST	AD-12232	30%	3%	17%	2%
2371-2389	AGAAACCAUUAUAGUUGU	371	AGAAACCAUUAUAGUGUTST	372	ACACUACUAGUGUUCUUTST	AD-12233	38%	2%	32%	3%
3143-3161	GGAUUGUUAUCAAUUGGC	373	GGAUUGUUAUCAAUUGGCTST	374	GCACAUUGAUAACAUCUTST	AD-12234	90%	5%	95%	7%
4277-4295	UAAGAGGCUUAUCUUAUC	375	UAAGAGGCUUAUCUUAUCUTST	376	GAUAGUUAUGCCUUAUTST	AD-12235	57%	7%	46%	3%
287-305	AGUUAUGUUAAGCAUGGA	377	AGUUAUGUUAAGCAUGGATST	378	UCCAGUUCGUAACUAUCUTST	AD-12236	34%	8%	16%	2%
1823-1841	AGUACUAUAGACCUUAUUU	379	AGUACUAUAGACCUUAUUUTST	380	AAUAUAGGUCUUAUGUACUTST	AD-12237	42%	9%	32%	8%
3379-3397	UGAGCCUUGUGUUAUAGAU	381	UGAGCCUUGUGUUAUAGAUUTST	382	AUCUUAUAACAAGGCUACATST	AD-12238	42%	6%	34%	6%
4273-4291	CCUUAUAGGCGCUUAUCUC	383	CCUUAUAGGCGCUUAUCUTST	384	GAGUUAUGCCUUAUAGATST	AD-12239	42%	3%	40%	4%
2375-2393	ACCACUUAUAGUUGUCCAG	385	ACCACUUAUAGUUGUCCAGTST	386	CUGGACACUAUAAGUGUTST	AD-12240	47%	6%	36%	5%
4439-4457	GAACUUCACAAUUAUGUCU	387	GAACUUCACAAUUAUGUCUTST	388	AGACUAUAUUGGAAGUUCUTST	AD-12241	69%	5%	70%	8%
827-845	UGCAUUCUUAUGUUGUCC	389	UGCAUUCUUAUGUUGUCCUTST	390	GGACGACUAAGAUUGCATST	AD-12242	61%	2%	47%	3%
1689-1717	AGAAAGGAGUUGACCAACA	391	AGAAAGGAGUUGACCAACATST	392	UGUUGGUCACUUGCCUUCUTST	AD-12243	26%	7%	15%	1%
1824-1842	GUACUAUAGACCUUAUUUG	393	GUACUAUAGACCUUAUUUGTST	394	CAAAUAAGGUCUUAUGUACUTST	AD-12244	25%	6%	15%	1%
429-447	UAUAUUGCAUAUUCUUG	395	UAUAUUGCAUAUUCUUGTST	396	CAAAAGAUUGCAUAUAUAUTST	AD-12245	65%	6%	83%	13%
856-874	UCUCUUAUACUAUACUAU	397	UCUCUUAUACUAUACUAUTST	398	AUAUAUUAUUAACAAGATST	AD-12246	29%	7%	31%	6%
1184-1212	UAUGUCUUAUACGCAAGA	399	UAUGUCUUAUACGCAAGATST	400	UCUUAUGGUCUAUGGCAUATST	AD-12247	57%	13%	50%	3%
392-410	UGUUGUUGUCCAAUUCUG	401	UGUUGUUGUCCAAUUCUTST	402	CAGAAUUGGCAACAACATST	AD-12248	36%	8%	20%	3%
1085-1103	ACUAACUAAGAUUCCUCCAG	403	ACUAACUAAGAUUCCUCCAGTST	404	CUGGAGAUUCUUAUAGUTST	AD-12249	44%	3%	70%	11%
2089-2087	UGUGUGUUAUACUGAAA	405	UGUGUGUUAUACUGAAATST	406	UUUUGAUUAACAACCAATST	AD-12250	47%	5%	18%	5%
4341-4359	UAUAUUGGAGACCAACCA	407	UAUAUUGGAGACCAACCATST	408	UGGUGGUCUCCCAUAUAUTST	AD-12251	121%	28%	35%	8%
759-777	AAAGAUAGAUUAUCANA	409	AAAGAUAGAUUAUCAATST	410	UUUGAUAGAUUAUCAUUCUTST	AD-12252	94%	19%	8%	3%
973-991	UUGAUAGAAGAGUCUGGGA	411	UUGAUAGAAGAGUCUGGATST	412	UCCCGAGUCUUAUAUATST	AD-12253	94%	33%	42%	8%
1083-1081	AUGUUCUUAUUGGAGAU	413	AUGUUCUUAUUGGAGAUUTST	414	GAUUCUUAUAGGACAUATST	AD-12254	101%	58%	70%	5%
1190-1208	GGAAUUGCUUAUAGAGCA	415	GGAAUUGCUUAUAGAGCATST	416	UAUUCUAUAGCAUAUUCCTST	AD-12255	163%	27%	28%	6%
1679-1687	CCAUUCCAAACUGGAUCGU	417	CCAUUCCAAACUGGAUCGUTST	418	ACCAUCCAGUUAUGGAUGTST	AD-12256	112%	62%	18%	3%
1703-1721	GGCAGUAGCAACACAAU	419	GGCAGUAGCAACACAAUTST	420	AUUGUUAUGGUAACUCCCTST	AD-12257	10%	4%	9%	2%
1814-1832	CAUUGUAGUUAUUAUAG	421	CAUUGUAGUUAUUAUAGTST	422	CUUAUUGACUUAAGCAUUTST	AD-12258	27%	9%	18%	3%
1818-1836	CUAGAAGUUAUUAAGACCU	423	CUAGAAGUUAUUAAGACCUUTST	424	AGGUCUUAUUAUUAUAGTST	AD-12259	20%	5%	12%	2%
1897-1915	UUGGAUUCUUAUUAUUAU	425	UUGGAUUCUUAUUAUUAUTST	426	AUAUAUUGAGAGUUAUATST	AD-12260	22%	7%	81%	7%
2086-2084	ACUUGUGUGUUAUUAUAC	427	ACUUGUGUGUUAUUAUACUTST	428	CAGUAUAAGACACAGUUTST	AD-12261	122%	11%	56%	7%
2121-2139	UCAUUGACAGUGGCGGAUA	429	UCAUUGACAGUGGCGGAUTST	430	UAUUGGCGCACUGUUAUAGATST	AD-12262	97%	30%	33%	6%
2280-2298	AUAUAGCAGACCAUUCUCC	431	AUAUAGCAGACCAUUCUCCUTST	432	GGGAUUGGCGUUAUUAUTST	AD-12263	177%	57%	85%	11%
										15%

TABLA 2

2369-2387	ACAGAAACCAUUAUAGU	433	ACAGAAACCAUUAUAGUTST	434	ACUACUAAAGUGGUUUCUGUTST	AD-12264	378	66	108	18	108	108	41
2372-2390	GAACACCAUUAUAGUAGUC	435	GAACACCAUUAUAGUAGUCTST	436	GA-CACUACUAAAGUGGUUUCTST	AD-12265	408	88	178	18	208	208	101
2409-2427	AAAUUCUAGGAUUAUAGUCA	437	AAAUUCUAGGAUUAUAGUCATST	438	UG-CUUAUCCUUAAGAUUUTST	AD-12266	338	98	98	18	88	48	48
2833-2851	UUUUUUUAUACCCUACACACA	439	UUUUUUUAUACCCUACACATST	440	UGUUGAUGGUUAUAUAUATST	AD-12267	348	138	118	18	68	28	28
3211-3229	ACAGAGCCAUUAUACACACU	441	ACAGAGCCAUUAUACACATST	442	AGUGUGUUAUUGCCUUCUGUTST	AD-12268	348	68	118	18	98	28	28
3223-3241	ACACUUGGAGAGGUCUUA	443	ACACUUGGAGAGGUCUATST	444	UGUACCCUUCUACAGUGUGUTST	AD-12269	548	68	338	48	298	78	78
3225-3243	ACACUUGGAGGUCUUAAG	445	ACACUUGGAGGUCUUAAGTST	446	CUUUGACCCUUCUACAGUGUTST	AD-12270	528	58	298	48	278	68	68
3291-3309	CGAGCCCAUUAUACCAUUCU	447	CGAGCCCAUUAUACCAUUCUTST	448	AAAGUUGUACUUCGCGUCUTST	AD-12271	538	78	278	38	198	68	68
4038-4054	UCCCUUAUUCGUUUCUUC	449	UCCCUUAUUCGUUUCUUCST	450	GGAGAACCCGAAUAAGGATST	AD-12272	858	158	578	78	518	168	168
4180-4198	UCUUAUAUACUUGUACACA	451	UCUUAUAUACUUGUACATST	452	UGUUGACAGUUAUUAUATST	AD-12273	368	68	268	28	308	58	58
151-169	AGCCAAUUCGUCUGCGAA	453	AGCCAAUUCGUCUGCGAATST	454	UUCGCGAGAGAUUUGGCUUUTST	AD-12274	758	218	408	28	508	198	198
250-268	CCCAUUCAAUAGUAGAAUG	455	CCCAUUCAAUAGUAGAAUGTST	456	CAUUCUACUUAUUGAUUGGCTST	AD-12275	298	98	88	18	88	48	48
821-839	GAUGAUGCAUUAUCUUAU	457	GAUGAUGCAUUAUCUUAUGTST	458	ACUAGUAUUGCUUAUUAUUTST	AD-12276	458	198	158	28	168	128	128
1060-1078	CUAUUGUUCUUAUUCGAGGA	459	CUAUUGUUCUUAUUCGAGTST	460	UUCGUAUAAGCAUUAUGCTST	AD-12277	588	178	328	28	558	148	148
1075-1093	GAGAAUUCUAAUUAUUAU	461	GAGAAUUCUAAUUAUUAUGTST	462	CUAGUUAUUAUUAUUAUUTST	AD-12278	1208	358	968	108	1248	388	388
1819-1837	UAGAAGUACAUUAAGACCU	463	UAGAAGUACAUUAAGACCUUTST	464	AAGGUCUUAUUGUACUUAUUTST	AD-12279	478	298	178	18	128	48	48
3003-3021	CAGCCUAGCUCUUAUUAU	465	CAGCCUAGCUCUUAUUAUGTST	466	UCUUAUAAGCUACAGGCUUUTST	AD-12280	28	08	38	18			
3046-3064	AAGAAGAGACAUUCCGGA	467	AAGAAGAGACAUUCCGGATST	468	UCCGGAUUAUUGUCUUAUUTST	AD-12281	28	08	58	28			
3134-3152	UGCUGUGUGGAUUAUUAU	469	UGCUGUGUGGAUUAUUAUGTST	470	UGAACAUUCCACACACAGATST	AD-12282	38	08	258	58			
155-173	AAAUUCGUCUGGAAGAAAG	471	AAAUUCGUCUGGAAGAAAGTST	472	CUUCUUCGAGAGCAUUAUUTST	AD-12283	38	18	358	48			
4596-4614	UUUCUGGAAGUUAUUAU	473	UUUCUGGAAGUUAUUAUGTST	474	ACAUUCUACUUCUACAGATST	AD-12284	58	28	498	88			
365-383	UUCUAAACAGAUUAUUAU	475	UUCUAAACAGAUUAUUAUGTST	476	AACAUCAUUCUGUUAUUAUUTST	AD-12285	78	78	218	268			
374-392	GAUUGAUGUUAUCCGAAUG	477	GAUUGAUGUUAUCCGAAUGTST	478	ACUUGGUAACAUCAUUAUTST	AD-12286	288	348	128	78			
436-454	GCACUUAUUCUGGUUUGG	479	GCACUUAUUCUGGUUUGGUTST	480	CACUACGCAAGAUAGUGCTST	AD-12287	408	218	518	238			
539-557	UGGUUAUUAUCCACGUACC	481	UGGUUAUUAUCCACGUACCTST	482	GGUACUGGAAUUAUAUACATST	AD-12288	268	78	1558	1468			
1629-1647	AGCAAGCUCUUAUACACAG	483	AGCAAGCUCUUAUACACAGTST	484	CUGUGUUAAGCAGCUGGCUUUTST	AD-12289	438	218	2208	1318			
2370-2388	CAGAAACCAUUAUAGUAG	485	CAGAAACCAUUAUAGUAGTST	486	CACUACUUAAGUGGUUUCUGTST	AD-12290	28	18	818	238			
2678-2696	ACUUAUUGGAGGUUGUUA	487	ACUUAUUGGAGGUUGUUAATST	488	UCUACACCUUCAUUAUUAUUTST	AD-12291	48	18	708	38			
3228-3246	CAGGAGGUCUUAUUAUUGG	489	CAGGAGGUCUUAUUAUGGUTST	490	UCACUUAAGACCUUACAGTST	AD-12292	28	18	68	28			
3703-3721	AAAAAGAUUAUAGCGAGU	491	AAAAAGAUUAUAGCGAGTST	492	ACUGCCUUAUUCUUAUUAUUTST	AD-12293	48	28	368	38			
3737-3755	GAAUUUUGAAUUAUURCCA	493	GAAUUUUGAAUUAUURCCATST	494	UGGGUAGAUUAUCAAUAUUTST	AD-12294	108	68	388	38			
4573-4591	GUUUUUUUGUUCUGGCAC	495	GUUUUUUUGUUCUGGCACCTST	496	GUUGCCACAUUCAAUAUACTST	AD-12295	298	318	378	38			
526-544	AGGAUCCUUGGUGUGUUA	497	AGGAUCCUUGGUGUGUAUTST	498	AUACACGCGAAGGGAUCCUUTST	AD-12296	828	48	898	28			
527-545	GGAUCCCUUGGUGUGUUA	499	GGAUCCCUUGGUGUGUAUATST	500	UUAUACCGCCAAGGGAUCCCTST	AD-12297	758	38	658	28			
256-274	CAAUUGUAUGUAUUAUCC	501	CAAUUGUAUGUAUUAUCCCTST	502	GGAUACACAUUCUUAUUAUUTST	AD-12298	738	48	608	38			
427-445	CGUUAUUAUUAUUAUUCU	503	CGUUAUUAUUAUUAUUCUTST	504	AGCAUAGUGCAUUAUAUAGCTST	AD-12299	768	48	668	48			
554-572	UAUCCUUAUUAUUAUUAU	505	UAUCCUUAUUAUUAUUAUUTST	506	AAAAUUUUGAUUAAGGGAUUTST	AD-12300	368	48	158	18			
1210-1228	AGAACAUUAUUAUUAAGCC	507	AGAACAUUAUUAUUAAGCTST	508	GGCUUAUUAUUAUUAUUCUUTST	AD-12301	338	48	188	28			
1414-1432	AAAUUGGUGUGUUGAGGA	509	AAAUUGGUGUGUUGAGGATST	510	UCCUACACAGCACCAUUAUUTST	AD-12302	668	58	658	38			
1438-1456	UGAAUAGGCUUAUACAGUU	511	UGAAUAGGCUUAUACAGUUTST	512	AACUCUGUAACCCUUAUUAUUTST	AD-12303	358	68	178	28			

TABLA 2

1516-1534	AAGAAUUGAAGACCAUCA	513	AAGAAUUGAAGACCAUCA	514	UGAGUGGUUUAGAGUUCUUTST	AD-12304	708	88	708	68	
2279-2287	AUUAAGCAGACCCAUUCC	515	AUUAAGCAGACCCAUUCC	516	GGAAUGGUGUUCUUAUUTST	AD-12305	638	88	808	78	
2939-2957	AUACCAUACACUUGUA	517	AUACCAUACACUUGUA	518	UACACAGUUGAGUGGUUTST	AD-12306	238	68	208	38	
3142-3160	UGGAUUGUUCACAAUUG	519	UGGAUUGUUCACAAUUG	520	CGAAUUGAAGAAUCCATST	AD-12307	788	108	588	58	
3229-3247	UGGAGAGUUCUAAAGUGA	521	UGGAGAGUUCUAAAGUGA	522	UCCACUUAAGACCUUCATST	AD-12308	278	88	158	28	
3763-3781	GUAUCCCUUAAGUUCACU	523	GUAUCCCUUAAGUUCACU	524	AGUAGACUUAAGGAGUACUUTST	AD-12309	588	118	428	38	
4801-4819	AUAUUGCUUAUUAUUC	525	AUAUUGCUUAUUAUUC	526	GAGAAUUAUAGCCAUUUTST	AD-12310	1068	238	808	24	
529-547	AUCCUUGGUGUUAUAU	527	AUCCUUGGUGUUAUAU	528	AUUAUACAGCAAGGAGUUTST	AD-12311	738	128	608	28	
425-443	GGGCUUAUAUUGCAUUC	529	GGGCUUAUAUUGCAUUC	530	GAUAGUGCAUUAUAGCCUUTST	AD-12312	398	38	368	38	
1104-1122	GAUUCUUCUUGAGGGGUA	531	GAUUCUUCUUGAGGGGUA	532	UAGCCCUUCAGAGAGUUTST	AD-12313	648	98	498	68	
1155-1173	GCAUCUCUUAUUCUUGAGG	533	GCAUCUCUUAUUCUUGAGG	534	CCUAGAGUUGAGAGAGUUTST	AD-12314	288	78	148	68	
2403-2421	CAGCAGAAUUAAGGAUA	535	CAGCAGAAUUAAGGAUA	536	UAUCCUUAAGUUCUGUGUTST	AD-12315	318	78	138	28	
3115-3133	GUCAGAGCCUUCUGUAGA	537	GUCAGAGCCUUCUGUAGA	538	UCUACAGAUUGCCUUCUAGCTST	AD-12316	428	58	148	28	
3209-3227	AAACAGAGGUAUAACACA	539	AAACAGAGGUAUAACACA	540	UGUUAUAUUGCCUUCUUAUTST	AD-12317	348	98	158	58	
3293-3311	AGCCAGAGUACCUUUAUA	541	AGCCAGAGUACCUUUAUA	542	UUAAGGUUGAGUUGGCUUTST	AD-12318	468	48	288	48	
4574-4592	UAUUUUUGAUCUGGCAACC	543	UAUUUUUGAUCUGGCAACC	544	GGUUGCCAGAUCAAAUUTST	AD-12319	778	38	568	48	
352-370	UGUUUGGCGUUCUACUAA	545	UGUUUGGCGUUCUACUAA	546	UUAAGUAGUUGCUCCAAUUTST	AD-12320	558	78	418	38	
741-759	GAUAUAACAGUACACARCA	547	GAUAUAACAGUACACARCA	548	UGUUUGUUAUUGUAUUAUTST	AD-12321	218	38	108	28	
1478-1496	ACUUGACAGUGUAUAUCU	549	ACUUGACAGUGUAUAUCU	550	AGAUUAACUUGUUCAGUUTST	AD-12322	278	88	308	128	
1483-1501	ACCAGUGUAUUCUGACCU	551	ACCAGUGUAUUCUGACCU	552	AGGUACAGUUAUACUUGUTST	AD-12323	268	78	358	188	
1967-1985	AGAACAUAUUGCAGCA	553	AGAACAUAUUGCAGCA	554	UGCUUGUAUUGAUUUGUUTST	AD-12324	278	88	278	148	
2247-2265	CAGUUGGAAACCUAACUG	555	CAGUUGGAAACCUAACUG	556	CAGUAGGUUUCACAUUGUTST	AD-12325	328	128	328	228	
2500-2518	ACCAGAGAGGUACAAAUU	557	ACCAGAGAGGUACAAAUU	558	AUUUUGUACCUUCUUGUTST	AD-12326	428	228	458	418	
2508-2526	GGUACAAAUUGGUUAG	559	GGUACAAAUUGGUUAG	560	CUUACACCAUUAUUGUACCTST	AD-12327	368	148	378	328	
3138-3156	GGUGUGAUUGUUCAUCAA	561	GGUGUGAUUGUUCAUCAA	562	UUGAUGAUAUUGCAUCCATST	AD-12328	458	28	318	38	
4304-4322	AGAGUUCACAAAAGCCCA	563	AGAGUUCACAAAAGCCCA	564	UGGCUUUUUUGAGAACUUTST	AD-12329	618	48	348	38	
4711-4729	UGAUAGCUAAUUAACCA	565	UGAUAGCUAAUUAACCA	566	UGGUUAUUAUUGCUUACATST	AD-12330	638	58	388	48	
1221-1239	AUAAGCCUGAGUGAUC	567	AUAAGCCUGAGUGAUC	568	GAUUCACUUCAGGCUUAUTST	AD-12331	508	28	268	58	
1705-1723	CAGUUGACCAACACAUUC	569	CAGUUGACCAACACAUUC	570	GCAUUGUGUUGGUAUCCUUTST	AD-12332	808	48	518	78	
3137-3155	UGGUGGGAUUGUUAUCA	571	UGGUGGGAUUGUUAUCA	572	UGAUGAACAUUCACACATST	AD-12333	348	68	128	28	
4292-4310	AUACCCUUCAGACAGAUUC	573	AUACCCUUCAGACAGAUUC	574	GAUCUCUGUAGGUGUAUUTST	AD-12334	278	28	188	38	
1829-1847	UAAGACCUUAUUGGUUAU	575	UAAGACCUUAUUGGUUAU	576	AUAACCAUAUAGGCUUATST	AD-12335	848	68	608	78	
2244-2262	AAGCAUUGUAGAAACCUAA	577	AAGCAUUGUAGAAACCUAA	578	UAAGUUCUUCACAUUGCUUTST	AD-12336	458	48	368	48	
2888-2906	UCUGAAACUGGAUUAUCCCA	579	UCUGAAACUGGAUUAUCCCA	580	UGGGAUAUCCAGUUAUCCAGATST	AD-12337	308	78	198	28	

TABLA 3

secuencia (5'-3')	seqID	secuencia (5'-3')	seqID	nombre del dúplex	cribado de dosis única @ 25 nM (% de ARNm residual)	2º cribado de DU (entre cuadros plicados)
ccAuuaAuaAcAGuAGcAcuTsT	582	AGUGCuACUGuAGuAAUUGGTsT	583	AD-14085	19%	1%
AucuGGcAAccAuAuuuuCuTsT	584	AGAAuAuUGGUUGCcAGAUtsT	585	AD-14086	38%	1%
GAuAGcuAAuAuAAAccAATsT	586	UUGGUUuAAUuuAGCuAUCTsT	587	AD-14087	75%	10%
AGAuAccAuAuAcuAcAGuATsT	588	uACUGuAGuAAUGGuAUCUTsT	589	AD-14088	22%	8%
GAuuGuucAucAAuuGGcGTsT	590	CGCcAAUUGAUGAAcAAUCTsT	591	AD-14089	70%	12%
GcuuuucuccuGGGuAcuTsT	592	AGuGAGCCGAGGAGAAAGCTsT	593	AD-14090	79%	11%
GGAGGAuuGGGuGAcAAGATsT	594	UCUUGUcAGCcAAUCCUCCTsT	595	AD-14091	29%	3%
uAAuGAAGAGuAuAccuGGTsT	596	CcAGGuAuACUCUUAuATsT	597	AD-14092	23%	2%
uuuAcAcAAAccAuuuGuATsT	598	uAcAAUUGGUUUGGUGAAATsT	599	AD-14093	60%	2%
cuuAuuuAAGGAGuAuAcGGTsT	600	CCGuAuACUCCUuAAuAAGTsT	601	AD-14094	11%	3%
GAAuAcAGuAGGAcGuAAGTsT	602	CUuACGUCcAUCUGAUUUCTsT	603	AD-14095	10%	2%
cAGAuGucAGcAuAAcGATsT	604	UCGCUuAUGCUGAcAUCUGTsT	605	AD-14096	27%	2%
AucuAAcccuAGuuGuAuTsT	606	GAuAcAAcCuAGGGUuAGAUTsT	607	AD-14097	45%	6%
AAGAGcuuGuuuAAAUcGGTsT	608	CCGAUUUuAAcAAGCUCUUTsT	609	AD-14098	50%	10%
uuAAGGAGuAuAcGGAGATsT	610	UCCUCCGuAuACUCCUuAATsT	611	AD-14099	12%	4%
uuGcAAuGuAAuAcGuAuTsT	612	AuACGuAuUUuAcAUGcAATsT	613	AD-14100	49%	7%
ucuAAcccuAGuuGuAuuccTsT	614	GGAuAcAAcCuAGGGUuAGATsT	615	AD-14101	36%	1%
cuAuGuAuuuuuuCuGATsT	616	AUCGAGAAAGAuAcAUGTsT	617	AD-14102	49%	3%
GAuGuAcAGcAuAAGcGAuTsT	618	cAUCGCUuAUGCUGAcAUCTsT	619	AD-14103	74%	5%
ucccAAcAGGuAcGAcATsT	620	GGUGUGCuACCUGUUGGATsT	621	AD-14104	27%	3%
uGcuAcAGuAGuGuuAGTsT	622	AcuAAACUcAUCGUGAGcATsT	623	AD-14105	34%	4%
AGAGcuuGuuAAAUcGGATsT	624	UCCGAUUUuAAcAAGCUCUTsT	625	AD-14106	9%	2%
GcGuAcAAGAAcAucAuATsT	626	uAuAGAUGUUCUUGAcCGTsT	627	AD-14107	5%	1%
GAGGuuGuAAGcCAuGuTsT	628	AAcAUUGGCUuAcAACCUCTsT	629	AD-14108	15%	1%
AAcAGGuAcGAcAcAcATsT	630	CUGUGUGUGCuACCUGUUTsT	631	AD-14109	91%	2%
AAcccuAGuuGuAuucccuTsT	632	GAGGGAuAcAAcCuAGGGUUTsT	633	AD-14110	66%	5%
GcAuAAGcGAuGGAuAAuATsT	634	uAuUAUCCcAUCGCUuAUGTsT	635	AD-14111	33%	3%
AAGcGAuGGAuAAuAcCuATsT	636	uAGGuAuUAUCCcAUCGCUUTsT	637	AD-14112	51%	3%
uGAuccuGuAcGAAAGAAATsT	638	UUUUUUUUGCuAcAGGAUcATsT	639	AD-14113	22%	3%
AAAAcAuuuGGccGuuucGGTsT	640	CcAGAAcGGCcAAUUGUUUTsT	641	AD-14114	117%	8%
cuuGGAGGGcGuAcAAGATsT	642	UUUUUGuACGCCUCCcAAGTsT	643	AD-14115	50%	8%
GGcGuAcAAGAAcAucAuTsT	644	AuAGAUGUUCUUGuACGCTTsT	645	AD-14116	14%	3%
AcucuGAGuAcAuUGGAUtsT	646	AUUCcAAUGuACUCAGAGUTsT	647	AD-14117	12%	4%
uuAuAuAAGGAGuAuAcGGATsT	648	UCCGuAuACUCCUuAAuAATsT	649	AD-14118	26%	4%
uAAGGAGuAuAcGGAGGATsT	650	CUCCUCCGuAuACUCCUuATsT	651	AD-14119	24%	5%
AAAUcAAuAGuAcAAuAAATsT	652	UUuAGUUGAcuAAUUGAUUTsT	653	AD-14120	8%	1%
AAuAcAAuAGuAcAAuAAATsT	654	CUUuAGUUGAcuAAUUGAUUTsT	655	AD-14121	24%	2%
uuucAcGuAuAcuGuUAATsT	656	UuAcAcAGuAuAcUGAGAATsT	657	AD-14122	10%	1%
uGuGAAAcAcucuGAuAAATsT	658	UUuAUcAGAGUGUUUcAcATsT	659	AD-14123	8%	1%
AGAuGuGAAuucGuAAAcATsT	660	UGUUCAGAGAUUcAcAUCUTsT	661	AD-14124	9%	2%
AGGuuGuAAGcCAuGuuGTsT	662	cAAcAUUGGCUuAcAACCUTsT	663	AD-14125	114%	6%
uGAGAAuAcAGuGGAcGuTsT	664	ACGUCcAUCUGAUUUCATsT	665	AD-14126	9%	1%
AGAAuAcAGuGGAcGuAATsT	666	UuACGUCCcAUCUGAUUUCUTsT	667	AD-14127	57%	6%
AuAuucccAAcAGGuAcGAcTsT	668	GUCGuACCUGUUGGGAuAUTsT	669	AD-14128	104%	6%
cccAAcAGGuAcGAcAcATsT	670	UGGUGUCGuACCUGUUGGCTsT	671	AD-14129	21%	2%
AGuAuAcuGAAGAAccucuTsT	672	AGAGGUUCUUCcAGuAuAcUTsT	673	AD-14130	57%	6%
AuAuAuAuAcGccGGcGcTsT	674	GCGCCCGGCUGAuAuAuAUTsT	675	AD-14131	93%	6%
AAuAuAAcccuAGuuGuAuTsT	676	AuAcAAcCuAGGGUuAGAUUTsT	677	AD-14132	75%	8%
cuAAcccuAGuuGuAuuccTsT	678	GGGAuAcAAcCuAGGGUuAGTsT	679	AD-14133	66%	4%
cuAGuuGuAuuccuuccuuTsT	680	AAAGGAGGAuAcAAcCuAGTsT	681	AD-14134	44%	6%
AGAcAucGAcuAAuGGcuTsT	682	AGCcAUuAGUcAGAUGUCUTsT	683	AD-14135	55%	6%

TABLA 3

GAAGCucAcAAuGAuuuAATsT	684	UuAAAUCaUUGUGAGCUUCTsT	685	AD-14136	29%	3%
AcAuGuAucuuuuuucGATsT	686	UCGAGAAAAAGAuAcAUGUTsT	687	AD-14137	40%	3%
ucGAuucAAuucuuAAccTsT	688	GGGUuAAGAUUUUGAAUCGATsT	689	AD-14138	39%	5%
ucuuAAcccuuAGGAcuTsT	690	AGAGUCCuAAGGGUuAAGATsT	691	AD-14139	71%	11%
GcucAcGAuGAGuuuAGuGTsT	692	cACuAAACUcAUCGUGAGCTsT	693	AD-14140	43%	15%
cAuAAGcGAuGGAuAAuAcTsT	694	GuAUuAUCcAUCGCUuAUGTsT	695	AD-14141	33%	6%
AuAAGcGAuGGAuAAuAcTsT	696	GGuAUuAUCcAUCGCUuAUTsT	697	AD-14142	51%	14%
ccuAAuAAAcuGcccucAGTsT	698	CUGAGGGcAGUuuuAUGGTsT	699	AD-14143	42%	1%
ucCGAAAGuuGAACuuGGUtsT	700	ACCAGUUCcAACUUCCGATsT	701	AD-14144	4%	4%
GAAAAcAuUGGccGuucGtsT	702	cACAACGGCCAAUGUUUUCTsT	703	AD-14145	92%	5%
AAGAcuGAucuuuAAGuuTsT	704	AACUuAGAAGAUcAGUCUUTsT	705	AD-14146	13%	2%
GAGcuuGuuAAAAucGGAATsT	706	UUCCGAUUUuAAcAAGCUCtsT	707	AD-14147	8%	1%
AcAuUGGccGuucGGAGTsT	708	GCUCcAGAAGCGCCAAUGUTsT	709	AD-14148	80%	7%
AAGAAcAuCuAuAAuGcATsT	710	UGcAAUuAuAGAUUUUUCTsT	711	AD-14149	44%	7%
AAuGuGucAcucAuGuuTsT	712	AAcAUGAGuAGAcAcAUUUTsT	713	AD-14150	32%	29%
uGucAcucAuGuuucucATsT	714	UGAGAAAcAUGAGuAGAcATsT	715	AD-14151	75%	11%
GuAuAcuGuGuAAcAAuTsT	716	AGAUGUuAcAcAGuAuACTsT	717	AD-14152	8%	5%
uuAuAcuGuGuAAcAAuTsT	718	uAGAUGUuAcAcAGuAuATsT	719	AD-14153	17%	11%
cuuAGuAGuGuccAGGAATsT	720	UUUCCUGGAcAcuAUAAGTsT	721	AD-14154	16%	4%
ucAGAuGGAcGuAAGGcAGTsT	722	CUGCCUuACGUcAUCUGATsT	723	AD-14155	11%	1%
AGAuAAuUGAuAGcAcATsT	724	UUGUGCUAUCAAUuAUCUTsT	725	AD-14156	10%	1%
cAAcAGGuAcGAcAcAcATsT	726	UGUGGUGUGcUACCUGUUGTsT	727	AD-14157	29%	3%
uGcAAuGuAAuAcGuuTsT	728	AAuACGuAUUuAcAUUGcATsT	729	AD-14158	51%	3%
AGuAGAAuAuAuAuAGATsT	730	UCuAGAuAAuAUUCUGACUTsT	731	AD-14159	53%	5%
cuaGAAuAuAuAuAAcAcTsT	732	GGUGUuAAAAGAUUUCuAGTsT	733	AD-14160	40%	3%
AAuAAuAuAAcCCuAGuuTsT	734	AACuAGGGuuAGAUuAUUTsT	735	AD-14161	83%	7%
AAuuuuuGcucAcGAuATsT	736	UcAUCGUGAGcAGAAAAUUTsT	737	AD-14162	44%	6%
GccucAGuAAuAcuAGGTsT	738	CcAUGGAUuACUGAGGGTsT	739	AD-14163	57%	3%
AcGuuuAAAAcGAGAuCuTsT	740	AAGAUcUGGUUuAAACGUTsT	741	AD-14164	4%	1%
AGGAGAuAGAAcGuuAAATsT	742	UUuAAACGUUCuAUCUCCTsT	743	AD-14165	11%	1%
GAccGuAcuGGcGucGcAGTsT	744	CUGCGACGCCAUGACGGUCTsT	745	AD-14166	90%	5%
AccGucAuGGcGucGcAGTsT	746	GCUGCGACGCCAUGACGGUTsT	747	AD-14167	49%	1%
GAAcGuuuuAAAcGAGAuTsT	748	GAUCUCGUUUuAAACGUUCTsT	749	AD-14168	12%	2%
uuGAGcuuAAcAuAGGuAATsT	750	UuACCuAUGUuAAGCUCATsT	751	AD-14169	66%	4%
AcuAAuAuGaucGcGAGATsT	752	UCuACGAGAUcAAUuAUGTsT	753	AD-14170	52%	6%
ucGuAGAAuAuCuAAuATsT	754	uAUuAAGAuAAUUCuACGATsT	755	AD-14171	42%	4%
GGAGAuAGAAcGuuAAATsT	756	UUUuAAACGUUCuAUCUCCTsT	757	AD-14172	3%	1%
AcAAcuuAuGGAGGuuTsT	758	AcAAcCUCcAAuAAGUUTsT	759	AD-14173	29%	2%
uGAGcuuAAcAuAGGuAAATsT	760	UUuACCuAUGUuAAGCUCATsT	761	AD-14174	69%	2%
AucucGuAGAAuAuCuAATsT	762	uAAGAuAAUUCuACGAGUATsT	763	AD-14175	53%	3%
cUGcGuGcAGucGGuccTsT	764	GAGGACCGACUGcACGcAGTsT	765	AD-14176	111%	4%
cAcGcAGcGcccGAGAGuATsT	766	uACUCUCGGCGCUGCGUGTsT	767	AD-14177	87%	6%
AGuAccAGGAGAcuccGGTsT	768	CCGGAGUCUCCUGGuACUTsT	769	AD-14178	59%	2%
AcGGAGGAGAuAGAAcGuuTsT	770	AACGUUCuAUCUCCUCCGUTsT	771	AD-14179	9%	2%
AGAAcGuuuAAAcGAGAuTsT	772	AUCUCGUUUuAAACGUUCUTsT	773	AD-14180	43%	2%
AAcGuuuAAAcGAGAuTsT	774	AGAUCUGGUUUuAAACGUUTsT	775	AD-14181	70%	10%
AGcuuGAGcuuAAcAuAGGTsT	776	CCuAUGUuAAGCUCuAAGCUTsT	777	AD-14182	100%	7%
AGcuuAAcAuAGGuAAuATsT	778	uAUUuACCuAUGUuAAGCUTsT	779	AD-14183	60%	5%
uAGAGcuAcAAAACcuAucTsT	780	GAuAGGUUUUGuAGCUCuATsT	781	AD-14184	129%	6%
uAGuuGuAuCCCCuCuATsT	782	uAAAGAGGGGAuAcAACuATsT	783	AD-14185	62%	4%
AccAccAGAcAuCuGAcTsT	784	AGUcAGAUUCUGGUGGUTsT	785	AD-14186	42%	3%
AGAAAcuAAuGaucGcTsT	786	CGAGAUcAAUuAGUUUCUTsT	787	AD-14187	123%	12%
ucucGuAGAAuAuCuAATsT	788	UuAAGAuAAUUCuACGAGATsT	789	AD-14188	38%	2%
cAAcuuAuGGAGGuuGuATsT	790	uAcAACUCCAAuAAGUUGTsT	791	AD-14189	13%	1%
uuGuAuCCCCuCuAAuAGTsT	792	ACUuAAAGGAGGGAuAcAATsT	793	AD-14190	59%	3%
uAcAAcuuAuGGAGGuuTsT	794	AACCUCcAAuAAGUUGATsT	795	AD-14191	93%	3%

TABLA 3

AGAAGuGuAcucucucAGTsT	796	CUGAGAAGAGuAcAGUUCUTsT	797	AD-14192	45%	5%
GAGcuuAAcAuAGGuAAuTsT	798	AUUuACCuAUGUuAAGCUCTsT	799	AD-14193	57%	3%
cAccAAcAuGuGuccuuAGTsT	800	CuAAGGAcAGAUUGGUGTsT	801	AD-14194	51%	4%
AAAGcccAcuuuAGAGuAuTsT	802	AuACUCuAAAGUGGGCUUUTsT	803	AD-14195	77%	5%
AAGcccAcuuuAGAGuAuTsT	804	uAuACUCuAAAGUGGGCUUUTsT	805	AD-14196	42%	6%
GAccuuAuuuGGuAAucGTsT	806	cAGAUuACCcAAuAAGGUCTsT	807	AD-14197	15%	2%
GAuuAAuGuAcucAAGAcTsT	808	AGUCUUGAGuAcAuAAUUCTsT	809	AD-14198	12%	2%
cuuuAAGAGGccuAAcucATsT	810	UGAGUuAGGCCUCuAAAGTsT	811	AD-14199	18%	2%
uuAAAccAAcccuAAuGATsT	812	UcAAuAGGGUUUGGUuAATsT	813	AD-14200	72%	9%
ucuGuuGGAGuAuAAuTsT	814	AUuAuAGAUUCUcAAcAGATsT	815	AD-14201	9%	3%
cuGAuGuuuuGAGAGAcTsT	816	AGUCUCUcAGAAAcAuAGTsT	817	AD-14202	25%	3%
GcAuAcucucAGucGuucccTsT	818	GGGAACGACuAGAGuAUGCTsT	819	AD-14203	21%	1%
GuucccuAuGAGAAuAuTsT	820	uAGAUUCUGAuAAGGAACTsT	821	AD-14204	4%	2%
GcAcuuGGAuucucAcAuTsT	822	AUGUGAGAGAUcAAGUGCTsT	823	AD-14205	5%	1%
AAAAAAGGAACuAGAuGGcTsT	824	GcAcUCuAGUUCUUUUUTsT	825	AD-14206	79%	6%
AGAGcAGAuAAccucGcGTsT	826	CGcAGAGGuAAUCUGCUCUTsT	827	AD-14207	55%	2%
AGcAGAuAAccucGcGAGTsT	828	CUCGcAGAGGuAAUCUGCUTsT	829	AD-14208	100%	4%
cccuGAcAGAGuAcAAATsT	830	UUUGUGAACUCUGUcAGGGTsT	831	AD-14209	34%	3%
GuuuAccGAAGuGuuGuuTsT	832	AAAcAAcACUUCGGuAACTsT	833	AD-14210	13%	2%
uuAcAGuAcAcAAcAAGATsT	834	UCCUUGUUGUGACUGuAATsT	835	AD-14211	9%	1%
AcuGGAucGuAAGAAGGcTsT	836	UGCCUUCUuACGAUcAGUTsT	837	AD-14212	20%	3%
GAGcAGAuAAccucGcGATsT	838	UCGcAGAGGuAAUCUGCUCTsT	839	AD-14213	48%	5%
AAAGAAGGuuAGuGuAcGATsT	840	UCGuAcACuAAUCUUUUUTsT	841	AD-14214	28%	18%
GAccAuuuAAuuGGcAGATsT	842	UCUGCcAAAUuAAuAUGGUCTsT	843	AD-14215	132%	0%
GAGAGGAGuGAuAAuAAATsT	844	UUuAAUuAUcACUCCUCUTsT	845	AD-14216	3%	0%
cuGGAGGGuuGGcGAcAATsT	846	UUGUcAGCcAAUCCUCcAGTsT	847	AD-14217	19%	1%
cucuAGucGuucccAcucATsT	848	UGAGUGGGAACGACuAGAGTsT	849	AD-14218	67%	8%
GAuAccAuAAcAuAGuAGTsT	850	CuACUGuAGuAAUGGuAUCTsT	851	AD-14219	76%	4%
uuGcGucGcGAAGAAGAAATsT	852	UUUCUUCUUCGcAGACGATsT	853	AD-14220	33%	8%
GAAAGAAGGuuAGuGuAcGTsT	854	CGuAcACuAAUCUUUUUTsT	855	AD-14221	25%	2%
uGAuGuuuAccGAAGuGuuTsT	856	AAcACUUCGGuAAAcAuCATsT	857	AD-14222	7%	2%
UGuuuGuccAAuuuGGAuTsT	858	AUCcAGAAUUGGAcAAAcATsT	859	AD-14223	19%	2%
AuGAAGAGuAAccuGGGATsT	860	UCCcAGGuAAuACUCUUcAUTsT	861	AD-14224	13%	1%
GcuAcucGauGAuGcAuTsT	862	AUGcAUUcAUcAGAGuAGCTsT	863	AD-14225	15%	2%
GcccuGuAGAAAGAAcAcTsT	864	GUGUUCUUUCuAAAGGGcTsT	865	AD-14226	11%	0%
ucAuGuuccuuAucGAGATsT	866	UUCUCGAuAAGGAACuAGATsT	867	AD-14227	5%	1%
GAuAAGGGuuAcAGAGuuTsT	868	cAACUCUGuAACCcAUUCTsT	869	AD-14228	34%	3%
cAAAcuGGAuGuaAGAGTsT	870	CUUCUuACGAUcAGUUGTsT	871	AD-14229	15%	2%
cuuAuuuGGuAAuGuGcTsT	872	cAGcAGAUuACCcAAuAAGTsT	873	AD-14230	20%	1%
AGcAAuGuGAAAccuAACTsT	874	GUuAGGUUUCcAcAUUGCUTsT	875	AD-14231	18%	1%
AcAAuAAAGcAGAcceAuTsT	876	AAUGGGUCUGCUUuAUUGUTsT	877	AD-14232	21%	1%
AAcAcuuAGuAGuGuccATsT	878	UGGAcACuACuAAGUGGUUTsT	879	AD-14233	106%	12%
AGucAAGGccAuGuAGTsT	880	CuAcAGAUcGCUUGACUTsT	881	AD-14234	35%	3%
cucccuAGAcuucccuAuTsT	882	AAuAGGGAAGUCuAGGGAGTsT	883	AD-14235	48%	4%
AuAGcuAAuAAccAAATsT	884	UUUGGUUuAAUuAGCuAUTsT	885	AD-14236	23%	3%
uGGcuGGuAAuAAuccAcGTsT	886	CGUGGAAUuAAcAGCcATsT	887	AD-14237	79%	9%
uuAuuuGGuAAuGuGcTsT	888	AcAGcAGAUuACCcAAuAATsT	889	AD-14238	92%	7%
AAcuAGAuGGcuuucAGTsT	890	CUGAGAAGCcAUcAGUUTsT	891	AD-14239	20%	2%
ucAuGGcGucGcAGcAAATsT	892	UUUGGUGGcGACGcAUGATsT	893	AD-14240	71%	6%
AcuGGAGGGuuGGcGAcATsT	894	UGUcAGCcAAUCCUcAGUTsT	895	AD-14241	14%	1%
cuAuAAuGcAcuAuuuTsT	896	AAAGAuAGUGcAAUuAAGTsT	897	AD-14242	11%	2%
AAAGGucAccuAAuGAAGATsT	898	UCUUCuAUuAGGUGACCUUUTsT	899	AD-14243	11%	1%
AuGAuGcAuAcucAGucTsT	900	GACuAGAGuAUGcAUUCUTsT	901	AD-14244	15%	2%
AAcAuAuGAuAAAGccuGTsT	902	cAGGCuAAUUCcAAuAUGUUTsT	903	AD-14245	80%	7%
AAGAAGGcAGuGAcAAcTsT	904	GUUGGUCcAACUGCCUUCUTsT	905	AD-14246	57%	5%
GAuAcuAAAAAGAAcAAcATsT	906	UGAUUGUUCUUuAGuAUCTsT	907	AD-14247	9%	3%

TABLA 3

AuAcuGAAAAuAAuAGucTsT	908	GACuAUUGAUUUUcAGuAUTsT	909	AD-14248	39%	4%
AAAAAGGAACuAGAuGGcuTsT	910	AGCcAuCuAGUUCUUUUUtsT	911	AD-14249	64%	2%
GAAcuAGAuGGcuuuucTsT	912	UGAGAAAGCcAuCuAGUUCtsT	913	AD-14250	18%	2%
GAAAccuAAcuGAAGAccuTsT	914	AGGUCUUCAGUuAGGUUUCTsT	915	AD-14251	56%	6%
uAeccAuAAcAcuGGuAATsT	916	UuACcAGUGUUGAGGGGATsT	917	AD-14252	48%	6%
AuuuGAAuAuCuAcccAuuTsT	918	AAUGGGuAGAuAuC AAAAUTsT	919	AD-14253	39%	5%
AucccuAuAGuucAcuuuGTsT	920	cAAAGUGAAcAuAGGGAUTsT	921	AD-14254	44%	8%
AuGGGuAuAAuGcAcuATsT	922	uAGUGcAAUuAuACCCcAUTsT	923	AD-14255	108%	8%
AGAuuAcccuGcGAGccTsT	924	GGGCUcGAGAGGuAAUCUTsT	925	AD-14256	108%	6%
uAAuuccAcGuAeccuucATsT	926	UGAAGGGuACGUGGAAUuTsT	927	AD-14257	23%	2%
GucGuuccAcuAGuuuTsT	928	AAAACuGAGuGGGAAcGACTsT	929	AD-14258	21%	3%
AAAcAAucccuGuuGAcuTsT	930	AGUcAAcAGGGAUUGAUUUTsT	931	AD-14259	19%	2%
ucAuAGAGcAAAGAAcAuATsT	932	uAUGUUCUUGCUCuAUGATsT	933	AD-14260	10%	1%
uuAcuAcAGuAGcAcuuGGTsT	934	CcAAGUGCuACUGuAGuAATsT	935	AD-14261	76%	3%
AuGuGGAAAccuAAcuGAATsT	936	UUCAGUuAGGUUUCcAcAUTsT	937	AD-14262	13%	2%
uGuGGAAGccuAAcuGAAGTsT	938	CUUcAGUuAGGUUUCcAcATsT	939	AD-14263	14%	2%
ucuuccuuAAuGAAAGGtsT	940	CCCUUUCuAUUuAAGGAAGATsT	941	AD-14264	65%	3%
uGAAAGAcccuAAGcAAATsT	942	UUGACUuAGAGGUUCUcATsT	943	AD-14265	13%	1%
AGAGGucAAAGuGGAAGATsT	944	UCUUCcACUuAGACCUCUTsT	945	AD-14266	18%	3%
AuAuCuAcccAuuuuuuGTsT	946	cAGAAAAUGGGuAGAuAUTsT	947	AD-14267	50%	9%
uAAGccuGAAGuGAAuAcGTsT	948	CUGAUUcACUUCAGGCUuATsT	949	AD-14268	13%	3%
AGAuGcAGAccAuuuAAuTsT	950	AAUuAAAUGGUCUGcAUCUTsT	951	AD-14269	19%	4%
AGuGuuGuuGucAAuucTsT	952	GAAUUGGAcAAAcAAcACUTsT	953	AD-14270	11%	2%
cuAuAAuGAAGAGcuuuuTsT	954	AAAAAGCUUCUcAUuAAuAGTsT	955	AD-14271	11%	1%
AGAGGAGuAAuAAuAAAGTsT	956	CUUuAAUuAAUcACUCCUCUTsT	957	AD-14272	7%	1%
uuucucuGuuAcAAuAcAuTsT	958	AUGuAUUGuAAcAGAGAAATsT	959	AD-14273	14%	2%
AACuCuAuAAuGcAAcATsT	960	UGUUGcAAUuAuAGAUUUTsT	961	AD-14274	73%	4%
uGuAGAGuAcAAuAAcATsT	962	GUCUuAUGuACUUCAGcATsT	963	AD-14275	10%	1%
AAuGuAcuAAGAcuGAucTsT	964	GAUcAGUCUUGAGuAcAUUTsT	965	AD-14276	89%	2%
GuAcuAAGAcuGAucucTsT	966	GAGAUcAGUCUUGAGuAcTsT	967	AD-14277	7%	1%
cAcucuGAuAAAcuAAuGTsT	968	cAUUGAGUuAuAcAGAGUGTsT	969	AD-14278	12%	1%
AAGAGcAGAuAAccucuGcTsT	970	GcAGAGGuAAUCUGCUCUUTsT	971	AD-14279	104%	3%
ucuGcGAGccAGAuAcATsT	972	GUUGAUcUGGGCUCcAGATsT	973	AD-14280	21%	2%
AAcuuGAGccuGuGuAuATsT	974	uAuAcAcAAGGCUcAAGUUTsT	975	AD-14281	43%	3%
GAAuAuAuAuAuAcAGccGGTsT	976	CCGGCUAGuAAuAuAUUCTsT	977	AD-14282	45%	6%
uGucAucccuAuAGuucAcTsT	978	GUGAACuAuAGGGAUGAcATsT	979	AD-14283	35%	5%
GAucGGcAAccAuAuucTsT	980	GAAAuAUGGUUGCcAGAUcTsT	981	AD-14284	58%	3%
uGcAAccAuAuuuuGGATsT	982	UCcAGAAuAUGGUUGCcATsT	983	AD-14285	48%	3%
GAuGuuAaccGAAGuGuuGTsT	984	cAAcACUUCGGuAAAcAUcTsT	985	AD-14286	49%	3%
uuccuuAucGAGAAcuAATsT	986	UuAGAUUCUGGuAAAGGAATsT	987	AD-14287	6%	1%
AGcuuAAuGcuuuuCGATsT	988	UCcAGAAAGcAAUuAAGCUTsT	989	AD-14288	50%	2%
uuGcuAuAuGGGAGAcATsT	990	UGGUCUCCcAuAAuAGcAATsT	991	AD-14289	48%	1%
GucAuGGcGucGcAGccAATsT	992	UUGGCUcGCGAGCcAUGACTsT	993	AD-14290	112%	7%
uAAuGcAcuAucuuuGcGTsT	994	CGcAAAGAuAGUGcAAUuATsT	995	AD-14291	77%	2%
cuAuCuuuGcGuAuGGcATsT	996	UGGcAcuACGcAAAGAuAGTsT	997	AD-14292	80%	6%
ucccuAuAGuucAcuuuGuTsT	998	AcAAAGUGAACuAuAGGGATsT	999	AD-14293	58%	2%
ucAAccuuuAAuucAcuuGTsT	1000	cAAGUGAAUuAAAGGUUGATsT	1001	AD-14294	77%	2%
GGcAAccAuAuuuuGGAATsT	1002	UUCcAGAAuAUGGUUGCcTsT	1003	AD-14295	62%	2%
AuGuAcuAAGAcuGAucTsT	1004	AGAUcAGUCUUGAGuAcAUTsT	1005	AD-14296	59%	4%
GcAGAccAuuuAAuGGcTsT	1006	GCcAAAUuAAUUGGUCUGTsT	1007	AD-14297	37%	1%
ucuGAGAGAcuAcAGAuGuTsT	1008	AcAUCUGuAGUCUCUcAGATsT	1009	AD-14298	21%	1%
uGcuAuAGAGcAAAGAAcTsT	1010	GUUCUUGCUCuAUGAGcATsT	1011	AD-14299	6%	1%
AcAuAAGAccuAuuuGGuTsT	1012	ACcAAuAAGGUCUuAUGUTsT	1013	AD-14300	17%	2%
uuuGuGcuGAuucGuAGGTsT	1014	CcAUcAGAAUcAGcAcAAATsT	1015	AD-14301	97%	6%
ccAuAcAcuGGuAAGAAATsT	1016	UUCUuACcAGUGUUGAGGTsT	1017	AD-14302	13%	1%
AGAcAAuuccGGAuGuGGATsT	1018	UCcAcAUCCGGAUUGUCUTsT	1019	AD-14303	13%	3%

TABLA 3

GAACuuGAGccuuGuGuAuTsT	1020	AuAcAcAAGGCuAAGUUCTsT	1021	AD-14304	38%	2%
uAAuuuGGcAGAGcGGAATsT	1022	UUUCCGCUCUGCcAAUuATsT	1023	AD-14305	14%	2%
uGGAuGAAGuuAuAuGGTsT	1024	CCcAuAAuAACUUCuAUCcATsT	1025	AD-14306	22%	4%
AucAcAuGAACuAcAAGATsT	1026	UCUUGuAGUUCuAGUAGAUTsT	1027	AD-14307	26%	6%
GGuAuuuuGAGuGGcAATsT	1028	UUGCcAGAUcAAAAuACCTsT	1029	AD-14308	62%	8%
cuAAuGAAGAGuAuAccuGTsT	1030	cAGGuAuACUUCUcAUuAGTsT	1031	AD-14309	52%	5%
uuuGAGAAAcuuAcuGAuATsT	1032	uAUcAGuAAGUUCUcAAATsT	1033	AD-14310	32%	3%
cGAuAAGAuAGAAGuAcAATsT	1034	UUGAUUCUUCuAUCUuAUCGTsT	1035	AD-14311	23%	2%
cuGGcAAccAuAuuuuGGTsT	1036	CcAGAAuAuUGGUUGCcAGTsT	1037	AD-14312	49%	6%
uAGAuAccAuAuAcuAcAGuTsT	1038	ACUGuAGuAAUGGuAUCuATsT	1039	AD-14313	69%	4%
GuAuAAuAuGGGuuucAuTsT	1040	AUGAAACCCAAUuAAuACTsT	1041	AD-14314	52%	3%
AAGAccuuAuuuGGuAAuCTsT	1042	GAUuACcAAuAAGGUUCUuTsT	1043	AD-14315	66%	4%
GcuGuuGauAAGAGAGcucTsT	1044	GAGCUCUCUuAuAcAGCTsT	1045	AD-14316	19%	4%
uAcucAuGuuuucAcAGuTsT	1046	AAUCUGAGAAAcAUGAGuATsT	1047	AD-14317	16%	5%
cAGAuGGAcGuAAGGcAGcTsT	1048	GCUGCCUuACGUCcAUCUGTsT	1049	AD-14318	52%	11%
uAucccAacAGGuAcGAcATsT	1050	UGUCGuACCUGUUGGGuATsT	1051	AD-14319	28%	11%
cAuGcuAuAuGGGAGAcTsT	1052	GUCUCCcAuAAuAGcAAUGTsT	1053	AD-14320	52%	10%
CccucAGuAAuuccAuGGuTsT	1054	ACcAUGGAUuACUGAGGGTsT	1055	AD-14321	53%	6%
GGucAuuuAcuGccuuGuATsT	1056	uAcAAGGcAGuAAUGACCTsT	1057	AD-14322	20%	2%
AAccAcucAAAAAcAuuuGTsT	1058	cAAAUUUUUUGAGUGGUuTsT	1059	AD-14323	116%	6%
uuuGcAAGuuAAuGAAuCuTsT	1060	AGAUUcAUuAACUUGcAAATsT	1061	AD-14324	14%	2%
uuAuuuuucAGuAGuAcAGATsT	1062	UUCUGAcuACUGAAAAuAATsT	1063	AD-14325	50%	2%
uuuuuucGAAuucAAuucuuTsT	1064	AAGAuuuGAAUCGAGAAATsT	1065	AD-14326	47%	3%
GuAGAAAGAGAGuAGUGTsT	1066	cACuAACUUCUuUUCGACTsT	1067	AD-14327	18%	2%
uuuAAAAcGAGAuCuGcuTsT	1068	AGcAAGAUcUGGUUUuAATsT	1069	AD-14328	19%	1%
GAAuuGAuuAAuGuAcuAcTsT	1070	UGAGuAcAuAAuCAAUUCTsT	1071	AD-14329	94%	10%
GAuGGAcGuAAGGcAGcucTsT	1072	GAGCUGCCUuACGUcAUCTsT	1073	AD-14330	60%	4%
cAuCuGAcuAAuGGGcuuGTsT	1074	cAGAGCcAuAuAGUcAGAUGTsT	1075	AD-14331	54%	7%
GuGAuccuGuAcGAAAGATsT	1076	UCUUUUCGuAcAGGAUcACTsT	1077	AD-14332	22%	4%
AGcucuuuuAAGGAGuAuTsT	1078	AuACUCCUuAAuAAGAGCUTsT	1079	AD-14333	70%	10%
GcuCuAuAuAAGGAGuAuATsT	1080	uAAuACUCCUuAAuAAGAGTsT	1081	AD-14334	18%	3%
ucuuAuuuAAGGAGuAuAcGTsT	1082	CGuAuACUCCUuAAuAAGATsT	1083	AD-14335	38%	6%
uAuuuAAGCGAGuAuAcGGATsT	1084	CUCCGuAuACUCCUuAAuATsT	1085	AD-14336	16%	3%
cuGcAGccCGuGAGAAATsT	1086	UUUUUCUcACGGCGUcAGTsT	1087	AD-14337	65%	4%
ucAAGAcuGAuucuuAAGTsT	1088	CUuAGAAGAUcAGUCUUGATsT	1089	AD-14338	18%	0%
cuucuuAAGuucAcuGGAATsT	1090	UUUCcAGUGAACUuAGAAGTsT	1091	AD-14339	20%	4%
uGcAAGuuAAuGAAuCuTsT	1092	AAAGAUUcAUuAACUUGcATsT	1093	AD-14340	24%	1%
AAucuuAAGGAuAuAGuAcATsT	1094	UUGACuAuAUCCUuAGAUTsT	1095	AD-14341	27%	3%
AucucuGAACAcAAGAAcATsT	1096	UGUUCUUGUGUUCAGAGAUTsT	1097	AD-14342	13%	1%
uuCuGAACAGuGGGuAuCuTsT	1098	AGAuACCcACUGUUCAGATsT	1099	AD-14343	19%	1%
AGuuAuuuAuAcAcuAcATsT	1100	UUGAUUGGGuAuAAuAACUTsT	1101	AD-14344	23%	2%
AuGcuAAAcuGuucAGAAATsT	1102	UUUCUGAAcAGUuAuAGcAUTsT	1103	AD-14345	21%	4%
cuAcAGAGcAcuuGGGuAcTsT	1104	GuAACcAAGUCCUCUGAGTsT	1105	AD-14346	18%	2%
uAuAuAuAcAGccGGGcGcGTsT	1106	CGCGCCCGGCGuAuAuATsT	1107	AD-14347	67%	2%
AuGuAAuAcGuAuuuuAuTsT	1108	uAGAAuACGuAUuAcAUTsT	1109	AD-14348	39%	3%
uuuuuCuGAAuAcAAuCuTsT	1110	AGAUUuGAAUCGAGAAAAATsT	1111	AD-14349	83%	6%
AAucuuAAccuuAGGAcuTsT	1112	AGUCCuAAGGGUuAAGAUUTsT	1113	AD-14350	54%	2%
ccuuAGGAcucuGGuAuuuTsT	1114	AAAuACcAGAGUCCuAAGGTsT	1115	AD-14351	57%	8%
AAuAAAcuGccuAcAGuATsT	1116	UuACUGAGGGcAGUuAuUUTsT	1117	AD-14352	82%	3%
GAuccuGuAcGAAAGAGTsT	1118	CUUCUuuUUGGuAcAGGAUCTsT	1119	AD-14353	2%	1%
AAuGuGAuccuGuAcAAATsT	1120	UUUCGuAcAGGAUcAcAUUTsT	1121	AD-14354	18%	11%
GuGAAAcAuGGccGuuCTsT	1122	GAACGGCcAAUGUUUcACTsT	1123	AD-14355	2%	1%
cuuGAGGAAAcucuGAGuATsT	1124	uACUcAGAGUUCCUcAAGTsT	1125	AD-14356	8%	2%
cGuuuAAAcAGAGuCuGTsT	1126	cAAGAUCUCGUUUuAAcAGTsT	1127	AD-14357	6%	3%
uuAAAcAGAGuCuGcuGTsT	1128	cAGcAAGAUcUGGUUUuAATsT	1129	AD-14358	98%	17%
AAAGAuGuAucGGucuccTsT	1130	GGAGACCAGuAcAUCUUUTsT	1131	AD-14359	10%	1%

TABLA 3

cAGAAAuGuGucAcucATsT	1132	UGAGuAGAcAcAUUUUCUGTsT	1133	AD-14380	6%	4%
cAGGAuuGauuAAuGuAcTsT	1134	GuAcAUuAAUcAAUUCUGTsT	1135	AD-14381	30%	5%
AGucAAcuAAAGcAuAuuuTsT	1136	AAuAuUGCUUuAGUUGACUTsT	1137	AD-14382	28%	2%
uGuGuAAcAAucAcAuGATsT	1138	UcAUguAGAUUGUuAcAcATsT	1139	AD-14383	60%	6%
AuAccAuuuGuucuuGGuTsT	1140	AcAAGGAACAAUUGGUuAUTsT	1141	AD-14384	12%	9%
GcAGAAuucAAGGauAuATsT	1142	uAuAUCCUuAGAUUUUCUGTsT	1143	AD-14385	5%	2%
uGGcuucAcAGGAucTsT	1144	GAGUCCUGUGAGAGcATsT	1145	AD-14386	28%	5%
GAGAuGuGAUcucGAAcTsT	1146	GUUcAGAGAUUcAcAUCUCTsT	1147	AD-14387	42%	4%
uGuAAGccAAuGuuGuGAGTsT	1148	CUCAcAAcAUUGGCUuAcATsT	1149	AD-14388	93%	12%
AGccAAuGuuGuGAGGcuTsT	1150	AAGCCUcAcAAcAUUGGCUtsT	1151	AD-14389	65%	4%
uuGuGAGGcuucAAGuuATsT	1152	UGAACUUGAAGCCUcAcAAATsT	1153	AD-14370	5%	2%
AGGcAGucAuGAGAAAcATsT	1154	UGUUCUcAUcAGUGGCUtsT	1155	AD-14371	54%	5%
AuAAAuGuAuGAcAcAAATsT	1156	UUUUGUGcAUcAAUuuAUTsT	1157	AD-14372	4%	1%
AcAAAUcucAGAAcuuAuTsT	1158	AUuAAGUUCuAGAUUUUGUTsT	1159	AD-14373	5%	1%
GAuAucccAAcAGGAcGATsT	1160	UCGUACCGUUGGGAuAUCTsT	1161	AD-14374	92%	6%
AGGuAuuuAuAcAcuATsT	1162	UGAUGGGuAAuAAuAAUUTsT	1163	AD-14375	76%	4%
uGuAAAUAcGuAuuuuAGTsT	1164	CuAGAAuACGuAUUuAcATsT	1165	AD-14376	70%	5%
UCuAGUuuuAuAAAGUtsT	1166	ACUuuAuAUGAAACuAGATsT	1167	AD-14377	48%	4%
AuAAAGuAGUucuuuAuATsT	1168	uAuAAAGAAcAuACUuuAUTsT	1169	AD-14378	48%	3%
ccAuuuGuAGAGcuAcAAATsT	1170	UUUGuAGCUCuAcAAUUGTsT	1171	AD-14379	44%	5%
uAuuuuAcAGuAGucAGAAuTsT	1172	AUUCUGACuACUGAAAAuATsT	1173	AD-14380	35%	16%
AAAUcuAAcccuAGuGuATsT	1174	uAcAAcAuAGGUuAGAUUUTsT	1175	AD-14381	44%	5%
cuuuAGAGuAuAcAuGcuTsT	1176	AGcAAUGAuACUCuAAAGTsT	1177	AD-14382	28%	1%
AucvGAcuAAuGGcucGuTsT	1178	AcAGAGCcAuAGUcAGAUtsT	1179	AD-14383	55%	11%
cAcAAuGAuuuAAGGAcuGTsT	1180	cAGUCCUuAAAUcAUUUGUTsT	1181	AD-14384	48%	9%
ucuuuuuucGauucAAAUtsT	1182	AUUuGAUcGAGAAAAAGATsT	1183	AD-14385	36%	2%
cuuuuuucGauucAAAUtsT	1184	GAUuGAAUcGAGAAAAAGTsT	1185	AD-14386	41%	7%
AuuuuuGucAcGauGAGTsT	1186	CUCuAUCGUGAGcAGAAAAuTsT	1187	AD-14387	38%	3%
uuuuuGucAcGauGAGuTsT	1188	AACUCuAUCGUGAGcAGAAATsT	1189	AD-14388	50%	4%
AGAGcuAcAAAUcucAcTsT	1190	GGAuAGGUUUUGuAGCUCUTsT	1191	AD-14389	98%	6%
GAGccAAAGGUAcAccAcuTsT	1192	AGUGGUGuACCUUUGGCUtsT	1193	AD-14390	43%	8%
GccAAAGGUAcAccAcuAcTsT	1194	GuAGUGGUGuACCUUUGGCUtsT	1195	AD-14391	48%	4%
GAAcuGuAcucuuucAcGcTsT	1196	GCUGAGAGAGuAcAGUuUCTsT	1197	AD-14392	44%	3%
AGGuAAuAuAcAcAAcAuTsT	1198	AUCUUGGUGAuAuUuACCUTsT	1199	AD-14393	37%	2%
AGcuAcAAAUcucAuuccuTsT	1200	AAGGAuAGGUUUUGuAGCUTsT	1201	AD-14394	114%	7%
uGuGAAAGcAuuuAAuuccTsT	1202	GGAAUuAAUUGCUUuAcATsT	1203	AD-14395	55%	4%
GcccAcuuuAGAGuAuAcATsT	1204	UGuAuACUCuAAAGUGGCUtsT	1205	AD-14398	49%	5%
uGuGccAcAcuccAAGAcTsT	1206	GGUCUUGGAGUGGcAcATsT	1207	AD-14397	71%	6%
AAAcuAAAUuGAucucGuATsT	1208	uACGAGAUcAAUuAGUuUTsT	1209	AD-14398	81%	7%
uGAucucGuAGAAuAuCuTsT	1210	AGAuAAUUCuACGAGAUcATsT	1211	AD-14399	38%	4%
GeGuGeAGucGUucucATsT	1212	UGGAGGACCGACUGcACGCTsT	1213	AD-14400	106%	8%
AAAGuuuAGAGAcAuCuGATsT	1214	UcAGAUUCUCuAAACUuUTsT	1215	AD-14401	47%	3%
cAGAAGGAuAuGuAcAAATsT	1216	UUUGuAcAuAUUCCUUCUGTsT	1217	AD-14402	31%	1%
cGcccGAGAGuAcAGGGATsT	1218	UCCUGGGuACUCUGGGCGTsT	1219	AD-14403	105%	4%
cGGAGGAGAuAGAAcGuuuTsT	1220	AAACGUUCuAUCUCCUCCGTsT	1221	AD-14404	3%	1%
AGAuAGAAcGuuuAAAcGTsT	1222	CGUUuAAACGUUCuAUCUTsT	1223	AD-14405	15%	1%
GGAAcAGGAACuucAcAAcTsT	1224	GUuGuGAAGUCCuGUUCCTsT	1225	AD-14408	44%	5%
GuGAGccAAAGGuAcAccATsT	1226	UGGUGuACCUUUGGCUcATsT	1227	AD-14407	41%	4%
AuccuuccuAGAcuuccuTsT	1228	AGGGAAGUCuAGGGAGGAUTsT	1229	AD-14408	104%	3%
cAcAcuccAAGAcuGuGcTsT	1230	GcAcAGGUCUUGGAGUGUGTsT	1231	AD-14409	67%	4%
AcAGAAGGAuAuGuAcAAATsT	1232	UUGuAcAuAUUCCUUCUGUTsT	1233	AD-14410	22%	1%
uuAGAGAcAucGAcuuuGTsT	1234	cAAAGUCAGAUUCUCuAAATsT	1235	AD-14411	29%	3%
AAuuGAucucGuAGAAuATsT	1236	uAAUUCuACGAGAUcAAUUTsT	1237	AD-14412	31%	4%

<110> Alnylam Pharmaceuticals, Inc.

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA INHIBIR LA EXPRESIÓN DEL GEN Eg5

5 <130> P3076 EP

<140> EP 07 75 9825.8

<141> 30-03-2007

10 <150> US 60/787.762

<151> 31-03-2006

<150> US 60/870.259

<151> 15-12-2006

15 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.1

20 <210> 135

<211> 21

<212> ADN

<213> secuencia artificial

25 <220>

<223> ARNip con reacción cruzada a Eg5 humano y de mono rhesus

<220>

<223> el ácido nucleico 5'-terminal es un nucleósido, es decir, base + azúcar, pero carece de 5'-fosfato

30 <220>

<221> base modificada

<222> 1, 2, 8, 9, 10, 14, 15, 18, 19

<223> /base_mod = "2'-O-metil base correspondiente"

35 <220>

<221> base modificada

<222> 21

<223> /base_mod = "5'-tio timidina"

40 <220>

<221> base modificada

<222> 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13, 16, 17

<223> /base_mod = "2'-hidroxi base correspondiente"

45 <400> 135

ucgagaauucu aaacuaacut t 21

<210> 136

50 <211> 21

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

55 <223> ARNip con reacción cruzada a Eg5 humano y de mono rhesus

<220>

<223> el ácido nucleico 5'-terminal es un nucleósido, es decir, base + azúcar, pero carece de 5'-fosfato

60 <220>

<221> base modificada

<222> 4, 9

<223> /base_mod = "2'-O-metil base correspondiente"

65 <220>

<221> base modificada
 <222> 21
 <223> /base_mod = "5'-tio timidina"

5 <220>
 <221> base modificada
 <222> 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
 <223> /base_mod = "2'-hidroxi base correspondiente"

10 <400> 136
 aguuaguuuu gauucucgat t 21

REIVINDICACIONES

1. Un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de un gen Eg5 humano en una célula, en donde dicho ARNbc comprende al menos dos secuencias que son complementarias entre sí y en donde una hebra sentido comprende una primera secuencia y una hebra antisentido comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad que es completamente complementaria a al menos una parte de un ARNm que codifica Eg5, en donde dicha región de complementariedad tiene menos de 30 nucleótidos de longitud, en donde dicha parte de un ARNm que codifica Eg5 consiste en la secuencia UCGAGAAUCUAAACUAACU, y en donde dicho ARNbc, tras el contacto con una célula que expresa dicho Eg5, inhibe la expresión de dicho gen Eg5.
2. El ARNbc de la reivindicación 1, en donde dicha primera secuencia es la secuencia de SEQ ID NO: 135 y dicha segunda secuencia es la secuencia de SEQ ID NO: 136.
3. El ARNbc de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho ARNbc comprende al menos un nucleótido modificado.
4. El ARNbc de la reivindicación 3, en donde dicho nucleótido modificado se elige del grupo de: un nucleótido modificado con 2'-O-metilo, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fosforotioato, un nucleótido terminal unido a un derivado de colesterilo o grupo bisdecilamida del ácido dodecanoico, un nucleótido modificado con 2'-desoxi-2'-fluoro, un nucleótido modificado con 2'-desoxi, un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico, un nucleótido modificado con 2'-amino, un nucleótido modificado con 2'-alquilo, nucleótido de morfolino, un fosforamidato, y un nucleótido que comprende una base no natural.
5. Una célula *in vitro* que comprende el ARNbc de la reivindicación 1.
6. Una composición farmacéutica para inhibir la expresión del gen Eg5 que comprende el ARNbc de la reivindicación 1 o 2.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, que comprende además un ARNbc que inhibe la expresión del gen VEGF.
8. Un método *in vitro* para inhibir la expresión del gen Eg5 en una célula, comprendiendo el método:
 - (a) introducir en la célula el ARNbc de la reivindicación 2; y
 - (b) mantener la célula producida en el paso (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm del gen Eg5,
 inhibiendo de esta manera la expresión del gen Eg5 en la célula.
9. El método de la reivindicación 8 en donde un segundo ARNbc que inhibe la expresión de VEGF se introduce en dicha célula.
10. Un ARNbc de la reivindicación 1 o 2 para tratar, prevenir o controlar procesos patológicos mediados por la expresión de Eg5.
11. El ARNbc de la reivindicación 10, en donde se va a administrar un segundo ARNbc que inhibe la expresión de VEGF.
12. Un vector para inhibir la expresión del gen Eg5 en una célula, comprendiendo dicho vector una secuencia reguladora operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una hebra de un ARNbc, en donde una de las hebras de dicho ARNbc es completamente complementaria a al menos una parte de un ARNm que codifica Eg5, en donde dicho ARNbc tiene menos de 30 pares de bases de longitud, en donde dicha parte de un ARNm que codifica Eg5 consiste en la secuencia UCGAGAAUCUAAACUAACU, y en donde dicho ARNbc, tras el contacto con una célula que expresa dicho Eg5, inhibe la expresión de dicho gen Eg5 al menos en un 40%.
13. Una célula *in vitro* que comprende el vector de la reivindicación 12.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, el método de la reivindicación 9, o el ARNbc de la reivindicación 11, en la medida en que dichas reivindicaciones se refieren a la reivindicación 2, en donde el ARNbc que inhibe la expresión de VEGF consiste en una hebra sentido y una antisentido, consistiendo dicha hebra sentido en la secuencia GcAcAuAGGAGAGAuGAGCuUs, consistiendo dicha hebra antisentido en la secuencia AAGCUcAUCUCUCCuAuGuGCusG, en donde A, G, C y U representan ribonucleótidos; c y u representan 2'-O-metil ribonucleótidos; y s representa fosforotioato.