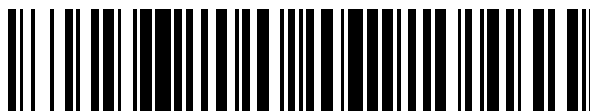


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 128**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2007** **E 07711288 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2015** **EP 2002004**

54 Título: **ARN interfiriente pequeño internamente segmentado**

30 Prioridad:

23.03.2006 DK 200600433

28.09.2006 DK 200601254

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

13.01.2016

73 Titular/es:

ROCHE INNOVATION CENTER COPENHAGEN

A/S (100.0%)

Fremtidsvej 3

2970 Hørsholm, DK

72 Inventor/es:

WENGEL, JESPER y

KJEMS, JØRGEN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 556 128 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

ARN interfiriente pequeño internamente segmentado

5 Campo de la invención

La invención se refiere al campo de la regulación negativa in vivo de la expresión génica utilizando complejos de ARNip modificado. A título de ejemplo, los complejos de ARN según la invención pueden utilizarse en composiciones farmacéuticas o para el análisis in vivo de la función génica.

10

Antecedentes

El campo de la interferencia del ARN ha atraído mucha atención durante los últimos años, ya que puede proporcionar inactivaciones génicas específicas. Evidentemente ello resulta muy importante en la investigación básica al estudiar las rutas genéticas y bioquímicas o la función de genes individuales y productos génicos. De acuerdo con lo anterior, la interferencia del ARN se ha convertido en una herramienta muy importante para la validación de dianas en la industria farmacéutica. Además, se han realizado inversiones sustanciales con el objetivo de desarrollar complejos de ARN capaces de mediar en la interferencia del ARN que puedan utilizarse como fármacos.

15

20

El atractivo del ARNi para la utilización terapéutica radica en su sensibilidad y especificidad de secuencia. Sin embargo, la especificidad de la secuencia ha suscitado cierta inquietud, por ejemplo porque una cadena incorrecta del complejo de ARN podría dirigir la respuesta a los ácidos nucleicos diana incorrectos. Además, los complejos de ARN de un determinado tamaño inducen una respuesta dependiente de interferón no específico, que también no resulta deseable.

25

La solicitud de patente nº US2003/0108923 describe complejos de ARN capaces de mediar en el ARNi, que comprenden una cadena antisentido y una cadena pasajero, en los que las cadenas presentan una longitud de entre 21 y 23 nucleótidos. Se propone la utilización de los complejos de ARN para aplicaciones terapéuticas.

30

La solicitud de patente nº US2003/0108923 describe complejos de ARN capaces de mediar en el ARNi, que comprenden una cadena antisentido y una cadena pasajera, en los que las cadenas presentan una longitud de entre 3 y 23 nucleótidos. Se propone la utilización de los complejos de ARN para aplicaciones terapéuticas.

35

El documento nº WO 2005/073378 describe complejos de ARNi capaces de mediar en el ARNi que comprenden una cadena antisentido y una cadena pasajera. Los complejos de ARN descritos en la memoria comprenden residuos de ANB y se indica que la incorporación de residuos de ANB en posición próxima al extremo 5' de una de las cadenas puede controlar qué cadena se incorpora en el complejo CSIA debido a que la cadena que forma la pareja de bases más débil en su extremo 5' se incorpora en el complejo CSIA.

40

Matranga et al. (Cell 123:607-620, 2005) dan a conocer que la maduración del complejo CSIA activo requiere el corte de la cadena pasajera por parte de Ago-2. El corte de la cadena pasajera se produce entre los nucleótidos 9 y 10 durante el ensamblaje de CSIA.

45

Leuschner et al. (EMBO Reports, publicado en Internet el 20 de enero de 2006) dan a conocer complejos de silenciamiento inducidos por ARNi que presentan una cadena pasajera discontinua. Leuschner et al. también han utilizado unidades de 2'-O-metil-ribose en la posición 9 de la cadena pasajera (5' a 3'). Se sometieron a ensayo los complejos de ARNi en un experimento in vitro con extractos celulares. Se encontró que la utilización de cadenas pasajeras discontinuas resultaba en un corte eficiente del ARN diana, al igual que los complejos de ARNi en los que la unidad de 2'-O-metilribose se encontraba situada en el sitio de corte de la cadena pasajera (9). Sin embargo, en el caso de que la unidad de 2'-O-metilribose se encontrase situada más arriba del sitio de corte se producía una reducción del corte del ARN diana.

50

Ni Leuschner et al. ni Matranga et al. dan a conocer o sugieren que los complejos de silenciamiento inducidos por ARNi que presentan una cadena pasajera discontinua son complejos de ARNi preferentes para la utilización terapéutica.

55

La utilización de ARNip sintéticos in vivo actualmente se ve dificultada por la falta de medios eficientes de administración del ARNip, la baja bioestabilidad en líquidos biológicos y la baja especificidad de acción debido a efectos inherentes distintos de los deseados (inespecíficos) que se asocian al comportamiento de tipo microARN de todos los ARNip investigados (Jackson A.L. et al., Nat. Biotechnol. 21:635-637, 2003; Birmingham A. et al., Nat. Methods 3:199-204, 2006; Jackson A.L. et al., Rna 12:1179-1187, 2006). Se han realizado varios intentos por reducir los efectos inespecíficos mediante la modificación química de los ARNip sintéticos (Jackson A.L. et al., Nat.

60

- Biotechnol. 21:635-637, 2003; Birmingham A. et al., Nat. Methods 3:199-204, 2006; Jackson A.L. et al., RNA 12:1179-1187, 2006; Elmen J. et al., Nucleic Acids Res 33:439-447, 2005. Debido a que las cadenas tanto de sentido como antisentido pueden contribuir a los efectos inespecíficos (Jackson A.L. et al., Nat. Biotechnol. 21:635-637, 2003), la minimización de la incorporación de la cadena de sentido en el CSIA activado debería incrementar significativamente la especificidad de reconocimiento y, de esta manera, reducir, el desvío de la cadena de sentido a dianas diferentes. Se encuentra bien establecido que la cadena de ARNip con el extremo 5' termodinámicamente menos estable se utiliza preferentemente como cadena antisentido en el CSIA activado (Schwarz D.S. et al., Cell 115:199-208, 2003).
- 5
- 10 Los complejos de ARN de doble cadena pueden mediar en diversas modificaciones de los ácidos nucleicos diana en la célula. En este procedimiento, la cadena antisentido del complejo actúa como guía, ya que la cadena antisentido puede hibridarse con los ácidos nucleicos diana que presentan tramos de secuencia complementaria a la cadena antisentido.
- 15 Antes de dirigirse al ácido nucleico diana, la cadena antisentido con frecuencia se incorpora en un complejo de proteínas guiado por ARN (CPGA), que puede actuar sobre el ácido nucleico diana. Un ejemplo de un complejo de proteínas guiado por ARN es el complejo de silenciamiento inducido por ARN (CSIA). Se cree que existen otros CPGA similares y que los complejos de ARN de la presente invención también resultarán ventajosos al utilizarse con estos otros CPGA.
- 20 Sin embargo, utilizados in vivo como agente terapéutico o herramienta de investigación génica, el complejo de silenciamiento, tal como CSIA, es incapaz de distinguir cuál de las dos cadenas de un complejo de silenciamiento de ARNip es la cadena antisentido deseada, y cuál es la cadena pasajera o guía. La carga de una cadena pasajera en el complejo de silenciamiento bien puede resultar en un silenciamiento no intencionado de dianas distintas de la deseada, es decir, dianas no deseadas que presentan una complementariedad suficientemente elevada con la cadena pasajera. Por lo tanto, el riesgo de estos sucesos con dianas no deseadas es una cuestión importante al considerar el desarrollo de agentes tanto terapéuticos como de investigación génica basados en complejos de ARNip.
- 25
- 30 La selección de la cadena para la inserción en el complejo CSIA depende, en un aspecto, de la fuerza de los enlaces de hidrógeno entre los extremos 5' de cada cadena. Mediante el diseño de ARNip para garantizar que la base 5' de la cadena pasajera es una G o una C y que la base 5' de la cadena antisentido es una A o una T, resulta posible sesgar preferentemente la selección de la cadena antisentido para la incorporación en el complejo de silenciamiento CSIA. Sin embargo, lo anterior no impide la carga de la cadena pasajera en el complejo de silenciamiento CSIA.
- 35
- La incorporación de análogos de nucleótidos potenciadores de la afinidad en el extremo 5' de la cadena pasajera puede reducir adicionalmente la proporción de cadenas pasajeras cargadas en el complejo de silenciamiento CSIA. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la estabilización termodinámica selectiva de los extremos 5' de la cadena de sentido mediante la incorporación de ácidos nucleicos bloqueados (ANB) se ha demostrado que reduce el silenciamiento génico injustificado por parte de la cadena de sentido (Elmen J. et al., Nucleic Acids Res. 33:439-447, 2005; Petersen M. y Wengel J. Trends Biotechnol. 21:74-81, 2003).
- 40
- La incorporación de análogos de nucleótido en las posiciones 10 y 12 (desde el extremo 5') de la cadena pasajera puede evitar el suceso de corte de CSIA, ya que se cree que estos residuos se alinean con el centro catalítico del complejo CSIA. Sin embargo, la incorporación de análogos de nucleótido potenciadores de la afinidad reduce la eficacia de los complejos de ARNip modificados, posiblemente mediante el incremento de la resistencia del ARNip a la acción de la helicasa del complejo CSIA. Por lo tanto, la incorporación de cargas elevadas de análogos de nucleótido potenciadores de la afinidad ha sido limitada debido al efecto negativo de dichos análogos sobre la eficacia de silenciamiento.
- 45
- 50
- La introducción de complejos de ARNdc en una célula de mamífero puede resultar en la inducción de la respuesta de interferón, conduciendo a la muerte celular. Aunque previamente se ha considerado que el efecto del interferón se limitaba a la presencia de moléculas de ARNdc más largas, tales como las asociadas a la infección y replicación víricas, ahora es conocido que las entidades de tipo ARNip corto también pueden inducir la respuesta del interferón. Se ha sugerido que la introducción de análogos de nucleótido dentro del ARNip puede utilizarse para limitar o incluso evitar la inducción del efecto de interferencia. Por lo tanto, se ha considerado deseable introducir análogos de nucleótido en los complejos de tipo ARNip para la utilización en aplicaciones in vivo.
- 55
- 60 La incorporación de análogos de nucleótido resistentes a nucleasas se cree que resulta beneficiosa para proteger los extremos 3'-solapantes de los ARNip. Debido a que estos solapamientos de 3' no contribuyen a la fuerza de la hibridación entre la cadena de sentido y la cadena pasajera, no presentan un efecto negativo sobre la acción de la helicasa del complejo CSIA.

Por lo tanto, existe un problema crítico que limita el éxito y eficacia del ARNip en aplicaciones in vivo, tal como las aplicaciones terapéuticas y de investigación génica: cómo prevenir los efectos sobre dianas distintas de las deseadas debido al silenciamiento no intencionado causado por la cadena pasajera, evitando simultáneamente los efectos de inhibición no deseados que se asocian a la utilización de análogos de nucleótido potenciadores de la afinidad.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1 a 6 ilustran ejemplos de diferentes arquitecturas de los complejos de ARN de la invención. Resultará evidente para el experto en la materia que pueden combinarse diversos elementos ilustrados, por ejemplo un patrón particular de extremos protuberantes puede combinarse con una o varias discontinuidades en posiciones particulares que pueden estar unidas o no. De esta manera, las figuras deben interpretarse como no limitativas, de manera que, por ejemplo, la naturaleza y la posición de la discontinuidad pueda modificarse y puedan añadirse elementos adicionales.

La figura 1 ilustra los elementos estructurales básicos de los complejos de ARN de la invención. A: muestra la región nuclear de doble cadena de los complejos de ARN de la invención. B: indica la cadena antisentido (la cadena inferior) y la cadena pasajera discontinua (la cadena superior). También se indica la discontinuidad de la cadena pasajera. Observar que la discontinuidad mostrada es una muesca ejemplar y que se indican en la memoria otros tipos de discontinuidad.

La figura 2 ilustra diversas combinaciones de extremos protuberantes y extremos romos.

La figura 3 ilustra que puede utilizarse una o más discontinuidades en la cadena pasajera.

La figura 4 ilustra que puede modificarse el tamaño de las discontinuidades.

La figura 5 ilustra que puede utilizarse uno o más conectores para conectar la cadena antisentido a la cadena pasajera y/o para conectar una primera y una segunda molécula de ARN de la cadena pasajera.

La figura 6 ilustra que puede modificarse la posición de la discontinuidad.

Las figuras 7 a 12 muestran datos experimentales obtenidos tal como se indica en la sección de ejemplos.

Figura 7: estabilidad sérica del ARNip, ANBip y ARNipis. Los dúplex de ARNip (ARNip-PFVM), ANBip (JW1103 y JW1106) y ARNipis (JW1103, W004 y W005) se incubaron durante el tiempo indicado a una concentración de 20 mM a 37°C en suero de feto bovino al 10% y después se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturante y se visualizaron mediante tinción con SYBR-oro. Se incluye una línea recta inmediatamente en la parte superior de la migración esperada de los oligonucleótidos no cortados.

Figura 8: análisis de microscopía de fluorescencia de la expresión de PFVM. Ensayo de la inactivación de ARNipis y constructos relacionados. Se trataron células HT1089 con 50 nM de las combinaciones indicadas de ARN/ANB y se analizaron 48 horas después para la expresión de PFVM. Se evaluó la expresión de PFVM tanto al nivel de ARN como de proteínas. (A) Análisis de microscopía de fluorescencia de la expresión de PFVM en las células. Se trataron células con 50 nM de las combinaciones indicadas de oligos de ARN/ANB y se analizaron 48 horas después para la expresión de PFVM. (C) Transferencia northern de la expresión de ARNm de PFVM tras 48 horas (carriles 1 a 6) y 120 horas (carriles 7 a 12).

Figura 9: análisis del ARNm de PFVM y expresión de proteínas en células tratadas con ARNipis. Transferencia western que muestra la expresión de proteína PFVM en células tratadas con 50 nM de las combinaciones indicadas de oligonucleótidos. Se sondeó nuevamente el filtro con un anticuerpo específico para la proteína hnRNPC1 como control de carga. B) Transferencia northern de investigación de la expresión de ARNm de PFVM tras 48 horas (carriles 1 a 6) y 120 horas (carriles 7 a 12). Se sondeó nuevamente el filtró para la expresión de RNPA1hn como control de carga. Las muestras de ARN se analizaron por duplicado bajo las mismas condiciones.

Figura 10: análisis de la expresión de PFVM durante un periodo de tiempo prolongado. 10A: transferencia western que muestra la expresión de PFVM tras 48, 120 y 180 h de la transfección utilizando las combinaciones indicadas de oligonucleótidos. Se incluyó la proteína RNPC1hn a modo de control interno. Se sondeó nuevamente el filtró para la expresión de RNPA1hn como control de carga (carriles 1 a 12). Las muestras de ARN se analizaron por duplicado bajo las mismas condiciones. 10B: análisis de flujo de la fluorescencia media de 50.000 células (basada en tres experimentos).

Figura 11: comparación de la eficiencia de inactivación entre ARNipis y otros ANBip y ARNip con diana la misma secuencia. A. Eficiencia de inactivación entre ARNipis, ANBip y ARNip. B. Análisis de la dependencia de la concentración de la eficiencia de inactivación. Se basó la cuantificación de las proteínas en la expresión de PFVM media de aproximadamente 50.000 células medidas mediante citometría de flujo y se cuantificó el ARNm de PFVM a partir de transferencias northern similares a las mostradas en la fig. 3. La no correspondencia del ARNip representa un ARNip que contiene 4 no correspondencias respecto a la diana de PFVM (ver la secuencia, posteriormente).

Figura 12: optimización del diseño del ARNipis. Eficiencia de inactivación de PFVM utilizando diferentes variantes de diseños de ARNipis con una cadena pasajera discontinua. Se basó la cuantificación de las proteínas en la PFVM media medida mediante citometría de flujo. La no correspondencia del ARNip representa un ARNip que contiene 4 no correspondencias respecto a la diana de PFVM (ver la secuencia, posteriormente). Una comparación entre las columnas 3 y 4 ilustra que la posición de la muesca puede desplazarse de las posiciones 10 a 11 sin ningún efecto perjudicial; la columna 7 muestra que la cadena pasajera puede ser simplemente ARN, aunque las cadenas pasajeras que incluyen análogos de nucleótido tales como ANB son mejores; la comparación entre las columnas 6 y

8 muestra que el ARNipis puede aceptar una cadena antisentido modificada con ANB (dentro de la región dúplex), mientras que lo anterior elimina la actividad en el constructo de ARNip normal correspondiente que contiene una cadena antisentido similarmente modificada con ANB.

5 Figura 13: inducción de ISG56 tras la transfección de ARN en células T98G. Evaluación de la respuesta del interferón inducida por ARNipis y otros constructos de ARNip. Se midió el nivel de IGH56, que es un marcador posterior de la respuesta del interferón alfa, mediante RT-PCR cuantitativa. Se incluyó poli(I/C) como control positivo (dibujado fuera de escala). El ARNip 27mero está compuesto de una cadena de 27 nucleótidos y una de 25 nucleótidos, cadenas guía y pasajera, respectivamente, y se ha demostrado anteriormente que induce el interferón moderadamente. El ARNipi modificado con ANB y el ARNip modificado con ANB no activan el sistema del interferón, tal como se evaluó mediante inducción de ISG56 en células T98G. La línea celular de glioblastoma T98G se transfectó con 80 nM de las variantes de ARNip o 0,8 mg de poli(I:C), tal como se indica, y se evaluaron los niveles de ARNm de ISG56 mediante análisis de qPCR 48 horas después de la transfección. Sólo la transfección de poli(I:C) (control pos.) condujo a niveles elevados de inducción de ISG56, mientras que los niveles de ISG56 para todas las variantes de ARNip eran indistinguibles de las células no tratadas o de las células tratadas con reactivo de transfección solo (Mirus Trans-IT TKO®).

15 Figura 14. Medición del efecto inespecífico del ARNipis.

Figura 15. El ARNipis y el ANBip muestran una estabilidad en suero incrementada en comparación con ARNip no modificado. Estabilidad en suero del diseño de ARNipis. (A) ARNipis modificado con ANB y ARNip modificado con ANB presentan una estabilidad en suero incrementada en comparación con el ARNip no modificado. Se incubaron las variantes de ARNip en SFB al 80% y se extrajeron alícuotas en los puntos temporales indicados. Se evaluó la estabilidad en suero mediante PAGE seguido de tinción con SYBR Gold®. Mientras que el ARNip se degrada en 1-1½ horas de incubación en suero, todavía se encuentran presentes cantidades significativas de ARNipis modificado con ANB y ARNip modificado con ANB tras 13 horas de incubación. Se indica un marcador de tamaño a la izquierda. (B) El apareamiento de bases de ANB resulta esencial para la integridad de las moléculas de ARNipis al incubarlas en SFB al 10%. Las moléculas de ARNipis indicadas que portan modificaciones de ANB diferentes o ninguna se incubaron en presencia (+) o en ausencia (-) de SFB al 10% durante 24 horas y se evaluó la estabilidad de los dúplex mediante PAGE seguido de tinción con SYBR Gold®. Los constructos de ARNipis con ANB en ambas cadenas mostraron una estabilidad total, mientras que el ARNipis que contenía únicamente ARN resultó completamente degradado al incubarlo en suero. Se indican esquemáticamente las posiciones de las modificaciones con ANB (líneas verticales).

Figura 16. Optimización del diseño del ARNipis. Se compararon las eficiencias de inactivación de los diferentes diseños de ARNipis y ARNip con la diana ARNm de PFVM. (A) Análisis del efecto de diferentes posiciones de hueco en la cadena de sentido. Los números correspondiente al tamaño de los fragmentos 5' y 3' de la cadena de sentido, respectivamente. (B) Análisis del efecto de modificaciones en el nucleótido 3'-terminal de la cadena de sentido. Se proporcionan posteriormente dibujos esquemáticos de los dúplex. Se midió mediante citometría de flujo la fluorescencia media de aproximadamente 50.000 células. La no correspondencia del ARNip representa un ARNip que contiene cuatro no correspondencias respecto a la diana de PFVM.

Figura 17. El diseño del ARNipis incrementa la especificidad del silenciamiento génico. La actividad de inactivación de las dos cadenas se evaluó mediante la medición de la expresión de la luciferasa a partir de constructos informadores que contenían la secuencia diana en la orientación de sentido o antisentido (columnas blancas y grises, respectivamente). Se muestran los constructos informadores en la parte superior (no a escala) y los constructos de ARNip se indican esquemáticamente en la parte inferior. Se promediaron los valores de tres experimentos completamente independientes. Los valores de la luciferasa de cada experimento se normalizaron para igualar las sumas de las actividades de luciferasa en cada uno de los experimentos. Para cada constructo informado se normalizó la luciferasa de luciérnaga (LL)/luciferasa de *Renilla* (LR) respecto a los controles de no correspondencia.

Figura 18. El diseño del ARNipis corrobora los efectos de silenciamiento de las cadenas antisentido químicamente modificadas. (A) estructura molecular de un monómero de ANB, un monómero N2'-adamantilmetilcarbonil-2'-amino-ANB (aT) y un monómero N2'-pirén-1-ilmetil-2'-amino-ANB-timina (pT). (B) Análisis del efecto del diseño del ARNipis sobre la eficiencia de silenciamiento de cadenas antisentido fuertemente modificadas. Se midió mediante citometría de flujo la fluorescencia media de aproximadamente 50.000 células. La no correspondencia del ARNip representa un ARNip que contiene cuatro no correspondencias respecto a la diana PFVM.(C) Se evaluó la actividad de inactivación de las dos cadenas mediante la medición de la expresión de la luciferasa a partir de constructos informadores que contenían la secuencia diana en la orientación de sentido o antisentido (columnas gris claro y gris oscuro, respectivamente). Se llevó a cabo el experimento por triplicado y para cada constructo informador se normalizó la proporción luciferasa de luciérnaga (LL)/luciferasa de *Renilla* (LR) respecto a los controles no correspondientes.

La figura 19 muestra una comparación entre los complejos de ARNip que comprende una cadena pasajera que comprende únicamente unidades de ADN y de ANB, en bloques, en donde el segundo y tercer residuo más hacia el extremo 3' de la cadena pasajera son de ANB dentro de una cadena pasajera de ADN o un patrón alternante de dos unidades de ADN y una unidad de ANB. Muestra que las cadenas pasajeras no de ARN pueden ser funcional dentro del contexto de un complejo de silenciamiento de ARNip.

La figura 20 muestra una comparación entre constructos de ARNipis modificados con ANB y no modificados en cultivo celular, e ilustra que la introducción de ANB en una cadena pasajera discontinua incrementa el efecto de

silenciamiento, y que el desplazamiento de la muesca de la posición 10 a la posición 11 de la cadena pasajera presenta poco efecto sobre la eficacia del silenciamiento. Los niveles de expresión mostrados para el ARNm de GFP media y PFVM son valores estimados basados en los experimentos realizados.

La figura 21 muestra una comparación entre ARNipis modificados con 2'-F-ADN y 2'-O-Me-ARN, e ilustra que las cadenas pasajeras que comprenden dichas modificaciones muestran cierto nivel de silenciamiento pero que éste no es tan eficaz como el observado con ANB (figura 20). Los niveles de expresión mostrados para el ARNm de GFP media y PFVM son valores estimados basados en los experimentos realizados.

La figura 22 muestra una comparación entre las cadenas pasajeras discontinuas y continuas modificadas con ANB de ARNipis e ilustra que las cadenas pasajeras más funcionalizadas resultan posibles con ARNipis modificado con ANB en contraste con ANBip (ARNip modificado con ANB). Los niveles de expresión mostrados para el ARNm de GFP media y PFVM son valores estimados basados en los experimentos realizados.

La figura 23 muestra una comparación entre el ARNipis con cadenas antisentido modificadas con ANB, que ilustra claramente que la presencia de una cadena pasajera discontinua supera el efecto de inhibición de la modificación fuerte de las cadenas antisentido, particularmente en áreas que forman el híbrido con la cadena pasajera. Los niveles de expresión mostrados para el ARNm de GFP media y PFVM son valores estimados basados en los experimentos realizados.

La figura 24 muestra una comparación del ARNipis con cadenas antisentido modificadas con 2'-F/2'-OMe-ANB, que ilustra que la utilización de una cadena pasajera discontinua permite la utilización de una cadena antisentido completamente modificada. Los niveles de expresión mostrados para el ARNm de GFP media y PFVM son valores estimados basados en los experimentos realizados.

La figura 25 muestra que la utilización de una cadena pasajera discontinua también permite la utilización de 2'-adamantil-amino-ANB dentro de la cadena antisentido. Los niveles de expresión mostrados para el ARNm de GFP media y PFVM son valores estimados basados en los experimentos realizados.

La figura 26 muestra el ensayo de constructos de 2'-F- y 2'-OMe-ARNipis en comparación con constructos de ARNipis ANB e ilustra que la modificación de la cadena pasajera con 2'-F o 2'-OMe la regulación negativa no es tan efectiva como con los constructos comparativos que utilizan ANB.

La figura 27 ilustra que los constructos de ARNipis con tres moléculas de ARN en la cadena pasajera también resultan efectivos en la regulación negativa de su ARNm diana, aunque el efecto no es tan pronunciado como la molécula 3' equivalente de ARNipis en la que la cadena pasajera consiste únicamente de dos moléculas de ARN.

Descripción resumida de la invención

La presente invención proporciona un complejo de ARN capaz de mediar en la interferencia del ARN, que comprende una región nuclear de doble cadena de entre 15 y 40 pares de bases, comprendiendo dicha región nuclear de doble cadena una cadena antisentido y una cadena pasajera discontinua que se hibrida con la cadena antisentido, en la que la discontinuidad en la cadena pasajera es una muesca, o un hueco de 1 o 2 nucleótidos, y en la que el complejo de ARN comprende análogos de nucleótido de ANB que incrementan la temperatura de fusión de la región nuclear de doble cadena y en la que la cadena pasajera discontinua comprende una primera y una segunda molécula de ARN que conjuntamente forman la cadena pasajera discontinua.

Los presentes inventores demuestran que sólo la cadena antisentido de dicho constructo es capaz de silenciamiento génico, incrementando de esta manera significativamente la especificidad de reconocimiento.

Además, aunque la utilización de una cadena pasajera discontinua puede conducir, en algunos casos, a una estabilidad reducida del complejo de silenciamiento debido a una posible probabilidad incrementada de disociación de las cadenas pasajera y antisentido antes de la interacción con el complejo CSIA, los presentes inventores han encontrado inesperadamente que la utilización de análogos de nucleótido potenciadores de la afinidad de ANB dentro del dúplex formado entre una cadena pasajera discontinua y la cadena antisentido pueden utilizarse para estabilizar eficazmente el dúplex in vivo, sin afectar indebidamente la funcionalidad del complejo de silenciamiento en términos del silenciamiento de la diana deseada de la cadena antisentido. Por lo tanto, la invención proporciona tanto una solución a la prevención de los efectos inespecíficos mediados por la cadena pasajera como también, bastante notablemente, una solución que permite la introducción de una carga elevada de análogos de nucleótido de ANB dentro del dúplex del complejo de silenciamiento, proporcionando un beneficio considerable en términos de estabilidad del dúplex in vivo, resistencia al ataque de nucleasas y prevención de la respuesta del interferón.

Típicamente entre dos moléculas de ARN existe un dúplex en una conformación de forma A, mientras que un dúplex entre dos moléculas de ADN típicamente existe en una conformación de forma B. Un dúplex entre una molécula de ADN y una de ARN típicamente existe en una conformación intermedia (forma A/B). La utilización de análogos de nucleótido, tales como beta-D-oxi-ANB, puede utilizarse para favorecer una confirmación más de tipo forma A.

Debido a que se cree que el reclutamiento por parte del complejo CSIA depende de la conformación estructural específica del ARNip, resulta preferible que los análogos de nucleótido utilizados dentro del dúplex favorezcan o no

interrumpan la formación de la conformación de forma A del complejo de ARN de doble cadena. Los métodos de RMN y DC pueden utilizarse para determinar si el dúplex forma una conformación de forma A.

5 Sin embargo, los presentes inventores también han determinado que la utilización de análogos de nucleótido que favorecen la estructura de forma B también pueden resultar efectivos, tales como el isómero alfa-L de ANB, que en el contexto de la presente invención es una unidad monomérica de análogo de nucleótido, tal como para la incorporación en la cadena pasajera. Por lo tanto, los presentes inventores creen que no resulta esencial que la cadena pasajera forme una conformación de forma A con la cadena antisentido, sino que puede formar una conformación intermedia de forma A/B, o incluso, en una realización, una conformación de forma B.

10 En una realización, la cadena pasajera consiste de oligonucleótido que comprenden tanto ANB como análogos de nucleótido 2'-OMe o 2'-fluoro, tal como se indica en la presente memoria. En dicha realización, se contempla que un constructo pueda comprender cadenas pasajeras que comprenden residuos alternantes de ANB y análogos de nucleótido 2'-OMe, o alternantes de ANB y 2'-fluoro, o combinaciones de ANB y análogos de nucleótido 2'-OMe/2'-fluoro.

15 Además, la incorporación de análogos de nucleótido, tales como unidades de monómero de ANB en la cadena de sentido interrumpida incrementa significativamente la estabilidad en suero y prolonga la inactivación de la diana. Resulta interesante que el diseño de ARNipis puede acomodar funcionalmente cadenas antisentido fuertemente modificadas que no son funcionales en forma de ARNip estándar. Lo anterior resulta críticamente importante para la aplicación de ARNip in vivo, particularmente para la utilización como agente terapéutico o como herramienta genómica funcional.

20 Los complejos de ARN de la presente invención pueden utilizarse en relación a la regulación génica guiada por ARN, en particular la interferencia de ARN. De esta manera, es un objetivo de la presente invención proporcionar complejos de ARN que presentan efectos inespecíficos reducidos en comparación con los complejos de ARN utilizados típicamente. Otro objetivo es proporcionar complejos de ARN con una respuesta del interferón reducida. Todavía otro objetivo es proporcionar complejos de ARN con propiedades mejoradas con respecto a la síntesis y viabilidad de las modificaciones químicas. Los complejos de ARN pueden encontrarse en forma de una composición farmacéutica (terapéutica) que comprende el complejo de ARN y un diluyente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Descripción detallada de la invención

35 En la presente invención los presentes inventores han desarrollado un nuevo diseño de ARNip terapéutico (o in vivo) compuesto de una cadena antisentido intacta complementada con una cadena pasajera discontinua, típicamente dos cadenas de sentido más cortas, de 9 a 13 nucleótidos. Los presentes inventores demuestran que dicho constructo es totalmente funcional y que presenta varias ventajas respecto a los diseños estándares de ARNip dúplex de 21 nt.

40 1. La naturaleza segmentada de la cadena pasajera reduce completamente su contribución a la inactivación génica no deseada, incrementando de esta manera en gran medida la especificidad del reconocimiento y previsiblemente reduciendo los efectos inespecíficos.

45 2. El diseño del ARNipis presenta la capacidad de rescatar la función de las cadenas antisentido químicamente modificadas (tales como las cadenas antisentido que incluyen análogos de nucleótido, tales como ANB) que son no funcionales en el contacto de un dúplex de ARNip estándar, permitiendo de esta manera la incorporación de más modificación química (por ejemplo análogos de nucleótido) en la cadena antisentido.

50 3. El diseño del ARNipis presenta por lo menos seis extremos terminales en comparación con cuatro en el ARNip normal, lo que puede utilizarse convenientemente para anclar grupos químicos funcionales para incrementar, por ejemplo, la administración celular. Por ejemplo, resulta posible anclar grupos voluminosos como el colesterol al extremo 5' de la cadena de sentido más abajo sin perder actividad.

4. Debido a que el rendimiento de la síntesis habitualmente es más elevado para las cadenas de ARN más cortas, puede reducirse el coste de la síntesis a gran escala en relación a la aplicación terapéutica mediante la utilización de un diseño de ARNipis.

55 5. La utilización de análogos de nucleótido, particularmente ANB en la cadena pasajera de ARNipis, incrementa en gran medida la estabilidad en suero, conduciendo a un silenciamiento génico potente y prolongado en comparación con los ARNip estándares.

60 Una característica importante del diseño del ARNipis es la capacidad de eliminar por completo la contribución de la cadena segmentada al silenciamiento génico, dejando intacta la actividad del ARNi de la cadena contraria (tal como se muestra en la figura 17). El incremento resultante de la especificidad del silenciamiento génico podría esperarse que redujese los efectos inespecíficos en todo el genoma producidos por la cadena de sentido, los cuales han sido observados con otros ARNip investigados (Jackson A.L. et al., Nat. Biotechnol. 21:635-637, 2003). Además, debido

a que la selección de cadena está determinada principalmente por la asimetría termodinámica de los extremos del ARNip dúplex, un ARNip altamente eficiente puede resultar difícil de diseñar en el caso de que la secuencia diana se encuentre restringida a una región termodinámicamente desfavorable, por ejemplo si la intención es reconocer una mutación de un único nucleótido o uniones entre genes fusionados. En estos casos, el diseño del ARNip garantizará que sólo la cadena no segmentada pueda contribuir al silenciamiento génico, con independencia del perfil termodinámico del dúplex de ARNipis, y de esta manera eliminará el silenciamiento no deseado significativo producido por la cadena contraria termodinámicamente favorecida.

Leuchner et al. han demostrado previamente que el ARNip precortado, similar al ARNipis no modificado de los presentes inventores, es capaz de carga de CSIA y corte de la diana en un extracto celular. Sin embargo, los presentes inventores han encontrado que los ARNipis con cadenas pasajeras sin residuos de ANB no son funcionales en un contexto celular (es decir, in vivo) aunque se introduzcan residuos modificados con 2'-OMe en las cadenas de sentido cortas. Basándose en los ensayos de estabilidad de los presentes inventores (figura 15A), la explicación más probable es que las cadenas no modificadas en ARNipis se están disociando y degradando in vivo que sólo el incremento significativo de la Tf, proporcionando por las unidades de análogo de nucleótido de ANB, produce un dúplex suficientemente estable bajo estas condiciones.

Una observación interesante es que la función del ARNipis no se basa estrictamente en un mimetismo estructural exacto de un producto intermediario de corte de Ago2, ya que la muesca de la cadena puede desplazarse 1-2 nt sin pérdida importante de la eficiencia de silenciamiento (figura 16A). En particular, el diseño del ARNipis que mimetiza el producto "natural" de corte de Ago2 (ARNipis₉₊₁₃) aparentemente es menos eficiente que al desplazar la muesca 1 y 2 nt hacia el extremo 3' de la cadena de sentido (ARNipis₁₀₊₁₂ y ARNipis₁₁₊₁₁). Basándose en los datos in vitro de Leuchner et al., estos constructos más probablemente son cortados por Ago2, liberando uno o dos nucleótidos, respectivamente. Por lo tanto, resulta posible que permitiendo un suceso de corte con Ago2 "natural" en los diseños de ARNipis₁₀₊₁₂ y ARNipis₁₁₊₁₁ pueda fomentarse adicionalmente la activación de CSIA al facilitar las etapas posteriores de activación de CSIA, tales como, por ejemplo, la eliminación de cadenas de sentido. Por lo tanto, los presentes inventores consideran que el diseño de ARNipis₁₀₊₁₂ introduce nuevas mejoras en la función de los ARNip más allá de las ofrecidas por el mimetismo estructural de intermediarios naturales en la tura del ARNi.

Los presentes inventores y otros han observado que las modificaciones químicas extensas en la cadena antisentido de los ARNip generalmente son incompatibles con su función en el silenciamiento génico. Resulta interesante que el diseño de ARNipis puede garantizar la carga de cadenas antisentido fuertemente modificadas en el CSIA activado, que posteriormente guiará un corte eficiente del ARNm diana mediado por Ago2. En la presente invención los presentes inventores demuestran que la incapacidad de las cadenas antisentido extensamente modificadas con ANB, ANB/adamantilo y ANB/pirenilo para proporcionar actividad de CSIA pueden rescatarse parcialmente con el diseño de ARNipis, mientras que los ARNip ordinarios modificados de manera similar no son funcionales (figura 18). Lo anterior demuestra que las modificaciones de la parte central de la cadena antisentido no alteran la reacción de corte de la diana por el CSIA activado mismo sino el direccionamiento del ARNip a la CLR, corte de la cadena de sentido y/o desenrollado del dúplex. Además, la observación de que las modificaciones múltiples en la cadena antisentido además aparentemente no inducen la incorporación de cadenas de sentido en el CSIA activado implica que no se trata simplemente de un cambio en la selección de cadena (figura 18). De acuerdo con lo anterior, el rescate del silenciamiento por el diseño de ARNipis aparentemente no se basa en la alteración del perfil termodinámico del ARNip, ya que las modificaciones adamantilo y pirenilo, en caso de producir algún efecto, sólo desestabilizan ligeramente los dúplex de ARNip, en contraste con el efecto estabilizador de los residuos de ANB. Por lo tanto, la explicación más evidente del efecto del ARNipis es que los ARNip fuertemente modificados pueden ser excesivamente rígidos o voluminosos para ser reconocidos por Ago2 durante la activación de CSIA, resultando en pérdidas de corte de la cadena de sentido y su posterior eliminación. Aunque sin deseo de restringirse a ninguna teoría en particular, los presentes inventores consideran que una explicación plausible es que la muesca central en la cadena del diseño de ARNipis puede proporcionar una mayor flexibilidad estructural al dúplex de ARNipis, permitiendo que se sitúe mejor para el corte con Ago2 durante la activación de CSIA.

La introducción de modificaciones químicas extensas en un ARNip puede presentar propiedades beneficiosas para las etapas tanto anteriores como posteriores de activación de CSIA en la ruta del ARNi. La introducción de grupos lipofílicos como el adamantilo y el pirenilo puede incrementar la incorporación celular de los dúplex de ARNip y las modificaciones no naturales en general incrementarán la bioestabilidad del ARNip en los compartimientos intracelulares y extracelulares.

Además, las modificaciones en la región "semilla" (nucleótidos 2 a 8 de la cadena antisentido) podría demostrar ser esencial para minimizar los efectos génicos inespecíficos inherentes por parte de los ARNip, ya que se ha demostrado anteriormente para la posición 2 de la cadena antisentido (Jackson A.L. et al., ARN, 2006). Los presentes inventores consideran además que el número incrementado de residuos de ANB en la cadena antisentido podría mejorar la especificidad de la diana y la afinidad para la diana.

Un objetivo de la presente invención es controlar qué cadena de un complejo de ARN de doble cadena funcionará de hecho como ARN guía en un CPGA. Por definición, la cadena antisentido está destinada a ser la cadena guía. Sin embargo, debe entenderse que un posible problema al utilizar complejos de ARN de doble cadena para mediar en la modificación de ácidos nucleicos diana es que la cadena incorrecta del complejo actuará como cadena guía. De esta manera, no se pretende que la cadena pasajera medie en cualquier modificación de los ácidos nucleicos diana.

En otras palabras, es un objetivo de la invención garantizar que sólo la cadena antisentido, y no la cadena pasajera, medie en modificaciones de los ácidos nucleicos diana. La consecución de dicho objetivo proporcionará complejos de ARN con menos efectos inespecíficos.

La idea básica de la invención es la utilización de una cadena pasajera discontinua, ya que dicha cadena pasajera discontinua más probablemente no se incorporará en un CPGA en la célula y en consecuencia no será capaz de guiar ninguna modificación de los ácidos nucleicos diana. En otras palabras, la discontinuidad define la cadena pasajera al producir asimetría en el dúplex.

Tal como implica el nombre, la cadena pasajera discontinua comprende una discontinuidad. La discontinuidad puede ser, por ejemplo, una muesca o un hueco, o puede ser un conector, tal como resultará evidente a partir de la memoria, posteriormente.

Los complejos de ARN de la invención que comprenden una cadena pasajera discontinua también se denominan en la presente memoria ARN interfiriente pequeño internamente segmentado (ARNipis).

La cadena pasajera puede comprender varias moléculas de ARN separadas, tal como 1, 2, 3 o 4 moléculas de ARN. Dichas moléculas de ARN pueden unirse entre sí y también pueden unirse a la cadena antisentido. De acuerdo con lo anterior, al hacer referencia a la cadena pasajera, se pretende hacer referencia de manera general a la molécula o moléculas de ARN que se hibridan con la cadena antisentido, a pesar de que se encuentren separadas por una discontinuidad. La cadena pasajera también se denomina cadena de sentido en la presente memoria.

La función de la cadena pasajera es de ayuda a que la cadena antisentido alcance su destino y en la incorporación de la cadena antisentido en el CPGA, lo que significa, entre otras cosas, que la cadena pasajera incrementa la biodisponibilidad y bioestabilidad de la cadena antisentido. De esta manera, en una realización, las cadenas pasajeras discontinuas de la invención son cualesquiera que satisfacen las funciones anteriormente indicadas, satisfaciendo simultáneamente las reivindicaciones estructurales descritas para los complejos de ARN de la invención.

En un aspecto, la presente invención proporciona un complejo de ARN capaz de mediar en modificaciones de los ácidos nucleicos de un ácido nucleico diana. El complejo de ARN comprende una región nuclear de doble cadena que comprende una cadena antisentido y una cadena pasajera discontinua que se hibrida con la cadena antisentido. Se proporcionan algunas características estructurales de este tipo de complejo en las figuras 1A y 1B.

Un ácido nucleico diana tal como se hace referencia al mismo en el presente contexto es un ácido nucleico que presenta una complementariedad significativa respecto a la cadena antisentido del complejo. Preferentemente la complementariedad es perfecta a lo largo de un tramo de varios nucleótidos.

De esta manera, en una realización, la complementariedad es perfecta a lo largo de un tramo de 25 nucleótidos.

En otras realizaciones, la complementariedad es perfecta a lo largo de un tramo de 24 nucleótidos, 23 nucleótidos, 22 nucleótidos, 21 nucleótidos, 20 nucleótidos, 19 nucleótidos, 18 nucleótidos, 17 nucleótidos, 16 nucleótidos, 15 nucleótidos, 14 nucleótidos, 13 nucleótidos, 12 nucleótidos, 11 nucleótidos, 10 nucleótidos, 9 nucleótidos o 8 nucleótidos, respectivamente.

En una realización, el tramo de complementariedad (tal como los listados como 'perfectos', anteriormente) comprende 1 no correspondencia. En otras realizaciones, el tramo de complementariedad comprende 2 no correspondencias, 3 no correspondencias o 4 no correspondencias, respectivamente. Una no correspondencia de 1 es una región en el tramo de complementariedad en la que no puede formarse un apareamiento de bases, por ejemplo en el caso de que una G se encuentre delante de una A. En el caso de que se encuentren presentes más no correspondencias, pueden ser contiguas entre si o pueden estar espaciadas en diferentes regiones del tramo de complementariedad.

El complejo de ARN comprende una región nuclear de doble cadena que es una región sustancialmente de doble cadena. Las regiones de cadena sencilla en el complejo de ARN se refieren principalmente a la discontinuidad de la cadena pasajera y a extremos protuberantes del complejo. Los extremos protuberantes son, por naturaleza, de

cadena sencilla, y la discontinuidad puede dar lugar a regiones de cadena sencilla en la cadena antisentido o la discontinuidad puede por sí misma ser una región de cadena sencilla (una protuberancia). Además de las regiones de cadena sencilla relacionadas con la discontinuidad de la cadena pasajera, la región sustancialmente de doble cadena puede comprender una no correspondencia.

5 De esta manera, en una realización, la región de doble cadena comprende 1 no correspondencia. En otras realizaciones, la región de doble cadena comprende 2 no correspondencias, 3 no correspondencias y 4 no correspondencias, respectivamente.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "ácido nucleico diana" puede comprender cualquier ARN/ADN que sería objeto de modulación guiada por la cadena antisentido, tal como el corte dirigido o el bloqueo estérico. El ARN/ADN diana podría ser, por ejemplo, ADN genómico, ARN vírico genómico, ARNm, un pre-ARNm o un ARN no codificante. La diana preferente es el ARNm, tal como el ARNm codificante de una proteína asociada a una enfermedad, tal como ApoB, Bcl2, Hif-1alfa, survivina o un p21 ras, tal como Ha.ras, K-ras o N-ras.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "modificación de un ácido nucleico diana" se refiere a cualquier modificación de un ácido nucleico diana, incluyendo las que afectan a la actividad del ácido nucleico diana, sin afectar a la estructura del ácido nucleico diana.

20 La expresión "composición farmacéutica" tal como se utiliza en la presente memoria es equivalente e intercambiable con "terapéutico" o "composición terapéutica". A este respecto, la composición de la invención puede utilizarse profilácticamente o en respuesta a la presentación de un fenotipo o diagnóstico de enfermedad.

25 Las expresiones "correspondiente a" y "corresponde a" se refieren a la comparación entre una secuencia de nucleobases del compuesto de la invención, y el complemento inverso de la misma, o en una realización, entre una secuencia de nucleobases y una secuencia de nucleobases equivalente (idéntica) que puede comprender, por ejemplo, otras nucleobases pero que conserva la misma secuencia de bases, o un complemento de la misma. Los análogos de nucleótido se comparan directamente con sus nucleótidos equivalentes o naturales correspondientes. Las secuencias que forman el complemento inverso de una secuencia se denominan secuencia complementaria de la secuencia.

30 Un ácido nucleico diana preferente de la invención es el ARNm. De acuerdo con lo anterior, en una realización, la modificación de ácido nucleico mediada por el complejo de ARN es la interferencia de ARN (ARNi). En una realización preferente, el ARNi media en la degradación del ARNm. En otra realización preferente, el ARNi media en la inhibición traduccional del ARNm. En otra realización, el ARNi media tanto en la inhibición traduccional como en la degradación del ARNm.

35 En una realización, la modificación de ácido nucleico mediada por el complejo de ARN es el silenciamiento génico, tal como la supresión génica. El silenciamiento génico puede ser parcial o completo y puede estar mediado, por ejemplo, por el corte de ARN, y la degradación y/o inhibición traduccional del ARN.

En otras realizaciones, el ácido nucleico diana es un ARN no codificante, por ejemplo un ARN, ARNm y precursores del mismo, ARNnp, ARNnop o un ARNr.

45 En todavía otra realización, el ácido nucleico diana es ADN genómico. En dichas realizaciones, entre las modificaciones de ácido nucleico preferentes se incluyen la metilación del ADN y la delección del ADN.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "nucleobase" se refiere a un nucleótido, tal como ADN o ARN o análogo de nucleótido.

50 En referencia a la longitud de una molécula de nucleótidos tal como se denomina en la presente memoria, la longitud corresponde al número de unidades monoméricas, es decir nucleobases, con independencia de si dichas unidades monoméricas son nucleótidos o análogos de nucleótido. Con respecto a las nucleobases, los términos monómero y unidad se utilizan intercambiamente en la presente memoria.

55 El tamaño del complejo de ARN de la invención puede modificarse, alcanzando sin embargo uno o más objetivos de la invención. Lo anterior se aplica, por ejemplo, al caso en que el objetivo particular es un efecto inespecífico reducido.

60 De esta manera, la región nuclear de doble cadena puede comprender un número de pares de bases seleccionado de entre el grupo de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30 pares de bases.

De esta manera, en la misma realización o en una diferente, la región nuclear de doble cadena puede comprender un número de pares de bases seleccionado de entre el grupo de 35 y 40 pares de bases.

5 La región nuclear de doble cadena comprende entre 15 y 40 pares de bases.

En otra realización preferente, la región nuclear de doble cadena comprende entre 18 y 22 pares de bases.

10 Es conocido que en algunas células, la introducción de un complejo de ARN de doble cadena más largo incrementa la probabilidad de inducción de una respuesta no específica dependiente del interferón.

15 En una realización preferente de la invención, el complejo de ARN comprende extremos protuberantes. Un extremo protuberante tal como se utiliza en el presente contexto se refiere a una región de cadena sencilla corta que sigue a una región de doble cadena. En la figura 2 se muestran diversos ejemplos de complejos de ARN que comprenden extremos protuberantes.

En una realización, la cadena antisentido del complejo de ARN comprende un extremo 3'-protuberante.

En otra realización, la cadena pasajera comprende un extremo 3'-protuberante.

20 En todavía otra realización, la cadena antisentido comprende un extremo 5'-protuberante.

En todavía otra realización, la cadena pasajera comprende un extremo 5'-protuberante.

25 En una realización preferente, tanto la cadena antisentido como la cadena pasajera comprenden un extremo 3'-protuberante.

Resultarán evidentes otras combinaciones de extremos protuberantes a partir de la figura 2.

30 Los extremos protuberantes del complejo de ARN pueden ser de longitud variable sin interferir con la función básica del complejo. De esta manera, en una realización, los extremos protuberantes se seleccionan de entre el grupo de extremos protuberantes con una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 nucleótidos.

35 Los extremos protuberantes más preferentes son los extremos protuberantes con una longitud de 1, 2 y 3 nucleótidos, respectivamente.

En una realización, el extremo protuberante de la cadena antisentido presenta la misma longitud que el extremo protuberante de la cadena pasajera.

40 En otra realización, el extremo protuberante de la cadena antisentido no presenta la misma longitud que el extremo protuberante de la cadena pasajera.

45 En todavía otra realización de la invención, el complejo de ARN comprende por lo menos un extremo romo. Un "extremo romo" se refiere a un extremo de un ácido nucleico de doble cadena que no presenta ningún nucleótido protuberante, es decir, ambas cadenas del ácido nucleico de doble cadena finalizan en la misma posición.

En otra realización, el complejo de ARN presenta los dos extremos romos.

50 Los complejos de ARN preferentes de la invención presentan una estructura similar a la de los productos del procesamiento por DICER de los complejos de ARN de doble cadena más largos, excepto por la discontinuidad de la cadena pasajera.

55 Otros complejos de ARN preferentes presentan una estructura similar a la de los productos del procesamiento con la endonucleasa Ago2 de la cadena pasajera. Sin pretender restringirse a ninguna teoría, los últimos datos sugieren que la proteína nuclear catalítica del CSIA, la endonucleasa Ago2, inicia la eliminación de la cadena pasajera mediante el corte de 9 nucleótidos de su extremo 5' durante la activación del CSIA.

60 Otros complejos de ARN preferentes de la invención son complejos en los que la región nuclear de doble cadena comprende 18 a 22 pares de bases, y en los que la cadena antisentido y la cadena pasajera comprenden, cada una, un extremo 3'-protuberante de 1 a 3 nucleótidos (es decir, 1, 2 o 3).

La cadena antisentido del complejo de ARN de la invención puede ser de longitud variable sin interferir con la función del complejo. De esta manera, en algunas realizaciones, la cadena antisentido es un 15-mero, 16-mero, 17-mero, 18-mero, 19-mero, 20-mero, 21-mero, 22-mero, 23-mero, 24-mero, 25-mero, 26-mero, 27-mero, 28-mero, 29-

- mero, 30-mero, 31-mero, 32-mero, 33-mero, 34-mero, 35-mero, 36-mero, 37-mero, 38-mero, 39-mero, 40-mero, 41-mero, 42-mero, 43-mero, 44-mero, 45-mero, 46-mero, 47-mero, 48-mero, 49-mero, 50-mero, 51-mero, 52-mero, 53-mero, 54-mero, 55-mero, 56-mero, 57-mero, 58-mero, 59-mero, 60-mero, 61-mero o 62-mero, respectivamente. Debe entenderse que, por ejemplo, un 19-mero es una cadena antisentido de 19 monómeros, es decir nucleótidos/análogos de nucleótido (nucleobases).
- 5
- En otra realización preferente, la cadena antisentido del complejo de ARN se selecciona de entre el grupo siguiente de cadena antisentido: un 18-mero, 19-mero, 20-mero, 21-mero, 22-mero y 23-mero.
- 10
- Tal como se ha indicado de manera general anteriormente, la cadena pasajera de la invención es discontinua. En una realización preferente de la invención, la cadena pasajera comprende varias moléculas de ARN separadas. El número de moléculas de ARN puede ser, por ejemplo, de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Se indican de manera general en la figura 3 complejos de ARN con varias moléculas de ARN separadas.
- 15
- En una realización preferente, la longitud de las moléculas de ARN individuales de la cadena pasajera es superior a 4 monómeros. En otras realizaciones preferentes, la longitud de las moléculas de ARN individuales de la cadena pasajera es superior a 5 monómeros, 6 monómeros, 7 monómeros, 8 monómeros, 9 monómeros, 10 monómeros, 11 monómeros y 12 monómeros, respectivamente.
- 20
- En otra realización, la longitud de las moléculas de ARN individuales de la cadena pasajera es inferior a 4 monómeros. En otras realizaciones, la longitud de las moléculas de ARN individuales de la cadena pasajera es inferior a 5 monómeros, 6 monómeros, 7 monómeros, 8 monómeros, 9 monómeros, 10 monómeros, 11 monómeros y 12 monómeros, respectivamente.
- 25
- En una realización preferente de la invención, la cadena pasajera discontinua comprende una primera y una segunda moléculas de ARN, que conjuntamente forman la cadena pasajera discontinua, en la que la primera molécula de ARN se hibrida con la parte posterior de la cadena antisentido y la segunda molécula de ARN se hibrida con la parte anterior de la cadena antisentido.
- 30
- En una realización, la cadena pasajera comprende por lo menos una primera y una segunda moléculas de ARN, que conjuntamente forman la cadena pasajera discontinua.
- En una realización, la cadena pasajera comprende sólo dos moléculas de ARN, la primera y segunda moléculas de ADN indicadas anteriormente.
- 35
- En una realización, la cadena pasajera comprende tanto la primera como la segunda moléculas de ARN indicadas anteriormente y por lo menos una molécula de ARN adicional.
- 40
- En una realización interesante, la primera molécula de ARN comprende por lo menos 3, tal como 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 unidades de análogo de nucleótido, tal como unidades de ANB. En una realización similar, la segunda molécula de ARN puede contener sólo unas cuantas unidades de análogo de nucleótido, tal como 3, 2, 1 o incluso ninguna unidad de análogo de nucleótido. Alternativamente puede ser la segunda molécula de ARN que comprende por lo menos 3, tal como 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 unidades de análogo de nucleótido, tal como unidades de ANB, y la primera molécula de ARN la que puede contener sólo unas cuantas unidades de análogo de nucleótido, tal como 3, 2, 1 o incluso ninguna unidad de análogo de nucleótido. Alternativamente, tanto la primera como la segunda cadenas pueden comprender por lo menos 3, tal como 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 unidades de análogo de nucleótido, tal como unidades de ANB.
- 45
- La molécula o moléculas de ARN adicionales preferentemente presentan una longitud de por lo menos 3 unidades de nucleobase, tal como entre 3 y 9 unidades de nucleobase, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 unidades de nucleobase, o tal como entre 4 y 6 unidades de nucleobase.
- 50
- Típicamente, cuanto más corta sea la longitud de la molécula o moléculas de ARN que forman la cadena pasajera, resulta preferente una carga más elevada de análogos de nucleótido de ADN que garantice que la robustez del dúplex es suficiente para permitir la suficiente estabilidad in vivo.
- 55
- En una realización, la cadena pasajera comprende tanto una primera como una segunda molécula de ARN, indicadas anteriormente, y entre 1 y 4 moléculas de ARN adicionales tal como se indica anteriormente, tal como 1, 2, 3 o 4 moléculas de ARN adicionales.
- 60
- En una realización, la cadena pasajera comprende una primera molécula de ARN que presenta una longitud de entre 8 y 13 unidades de nucleobase, tal como 8, 9, 10, 11, 12 o 13 unidades de nucleobase de longitud, tal como entre 9 y 12 unidades de nucleobase de longitud, tal como entre 9 y 11 nucleobases de longitud. Los presentes

inventores han encontrado que las cadenas pasajeras con una primera molécula de ARN que presenta una longitud de 9, 10 o 11 nucleótidos resultan particularmente eficaces. Durante el procesamiento en el complejo CSIA, típicamente se realiza una muesca en la posición 9 de la cadena pasajera. Los presentes inventores han encontrado inesperadamente que, en el contexto de los complejos de ARN según la presente invención, la introducción de una muesca en un ARNip sintético en la posición 10 o 11 mediante la provisión de una primera molécula de ARN que presenta una longitud de 10 o 11 unidades de nucleobase proporciona moléculas de ARNip muy eficaces que aparentemente están mejoradas comparado con complejos de ARNip similares que comprenden una segunda molécula de ARN con una longitud de 9 unidades de nucleobase. En dichas realizaciones puede no haber moléculas de ARN adicionales en la cadena pasajera discontinua. En una realización, que puede ser igual o diferente a la realización anterior, la cadena pasajera comprende una segunda molécula de ARN que presenta una longitud de entre 8 y 14 unidades de nucleobase, tal como 8, 9, 10, 11, 12 o 13 unidades de nucleobase de longitud, tal como entre 9 y 13 unidades de nucleobase de longitud, tal como entre 10 y 13 nucleobases de longitud. Los presentes inventores han encontrado que las cadenas pasajeras con una primera molécula de ARN que presenta una longitud de 11, 12 o 13 nucleótidos pueden resultar particularmente eficaces. En dichas realizaciones puede no haber moléculas de ARN adicionales en la cadena pasajera discontinua.

En una realización, la cadena pasajera comprende una primera molécula de ARN que presenta una longitud de 9 unidades de nucleobase y una segunda molécula de ARN que presenta una longitud de 12 o 13 unidades de nucleobase. Preferentemente, la longitud total de la cadena pasajera discontinua presenta 21 (9/12) o 22 (9/13) nucleobases. En dichas realizaciones puede no haber moléculas de ARN adicionales en la cadena pasajera discontinua.

En una realización, la cadena pasajera comprende una primera molécula de ARN que presenta una longitud de 10 unidades de nucleobase y una segunda molécula de ARN que presenta una longitud de 11 o 12 unidades de nucleobase. En dichas realizaciones puede no haber moléculas de ARN adicionales en la cadena pasajera discontinua.

En una realización, la cadena pasajera comprende una primera molécula de ARN que presenta una longitud de 11 unidades de nucleobase y una segunda molécula de ARN que presenta una longitud de 10 o 11 unidades de nucleobase. En dichas realizaciones puede no haber moléculas de ARN adicionales en la cadena pasajera discontinua.

En una realización, la longitud combinada de la primera y segunda moléculas de ARN, y opcionalmente moléculas de ARN adicionales (es decir, la cadena pasajera discontinua, excluyendo cualesquiera nucleobases de unión opcionales), es de entre 18 y 25 nucleobases, tal como de una longitud de 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleobases, preferentemente de una longitud de entre 21 y 23 nucleobases (21, 22 o 23).

Convenientemente, en una realización, la longitud de la cadena antisentido, excluyendo cualesquiera nucleobases de unión opcionales, presenta la misma longitud que la cadena pasajera discontinua.

En una realización, la primera, la segunda y/o moléculas de ARN adicionales, pueden comprender un análogo de nucleótido. La utilización de análogos de nucleótido puede servir para crear una molécula que forma una estructura de tipo ARN y/o que funciona como una molécula de ARN dentro del contexto de la invención, comprendiendo además menos moléculas de ARN que la cadena pasajera de un ARNip no modificado equivalente, incluyendo pocos o incluso ningún monómero de ARN. Por ejemplo, la utilización de suficientes unidades de ANB dentro de una molécula de ADN puede crear una molécula que funciona como una cadena pasajera. En una realización similar, dentro del contexto de una primera, segunda y/o ulteriores moléculas de ARN (es decir, las moléculas de ARN que forman la cadena pasajera discontinua), pueden utilizarse moléculas que comprenden o consisten de nucleobases diferentes de ARN con la condición de que funcionan como si fueran una molécula de ARN en el contexto de un complejo de silenciamiento de ARNip. Convenientemente, en una realización, la cadena pasajera, tal como la primera, segunda y/o ulteriores molécula de ARN, comprende por lo menos un monómero de ANB y opcionalmente monómeros de ADN, tal como la cadena pasajera o tal como la primera, segunda y/o ulteriores molécula de ARN consistentes de monómeros de ANB y ADN. Entre los patrones adecuados de inclusión de ANB en moléculas de ADN para producir una molécula similar a ARN se incluyen la inserción de un ANB cada dos nucleobases o cada tercera nucleobase (tal como se muestra en la figura 19).

En una realización, la cadena pasajera comprende unidades de nucleobase que sólo son de ANB y ADN, tal como unidades alternantes de ANB y ADN.

En una realización, la cadena pasajera comprende unidades de nucleobase que sólo son de ANB y ARN, tal como unidades alternantes de ANB y ARN.

También se encuentra contemplado que puedan utilizarse residuos de ADN no modificados en las cadenas pasajeras o incluso en una realización, en la cadena antisentido.

5 Sin embargo, en una realización, las cadenas pasajeras y/o las cadenas antisentido no comprenden nucleótidos de ADN no modificados.

10 La combinación de ANB y otros análogos de nucleótido, tal como 2'-O-metilo (2'-OMe) y 2'-fluoro (2'-F) también se considera un posible diseño para las cadenas pasajeras discontinuas o para moléculas de ARN individuales que forman la cadena pasajera discontinua y/o, en una realización, la cadena antisentido. Por ejemplo, ANB y 2'-O-metilo (2'-O-Me) alternantes, ANB y 2'-fluoro alternantes, o 2'-O-metilo (2'-O-Me) y 2'-fluoro alternantes. Dichas cadenas ricas en análogos se consideran especialmente útiles al considerar complejos de ARN que de otro modo presentan una T_f baja. Una ventaja adicional de dichas moléculas y cadenas de 'ARN' ricas en análogos es que pueden utilizarse para proporcionar una molécula altamente estable y resistente a nucleasas in vivo, incluso en el caso de que los enlaces entre nucleósidos sean o incluyan enlaces que de otra manera serían sensibles a nucleasas, tales como los enlaces fosfodiéster o fosfato. Los complejos de ARN que comprenden principalmente o completamente enlaces fosfodiéster puede resultar preferentes, ya que típicamente muestran una toxicidad más baja a dosis altas en comparación con moléculas equivalentes con enlaces fosforotioato.

20 Sin embargo, en algunas realizaciones, tal como en el caso de que se utilicen moléculas o cadenas de ARN que presentan un contenido elevado de ADN o ARN, puede resultar preferible utilizar enlaces resistentes a nucleasa, tales como enlaces fosforotioato. Sin embargo, para algunas aplicaciones, la utilización de complejos de ARN con enlaces fosforotioato puede provocar problemas de toxicidad, por ejemplo al utilizar los oligonucleótidos dentro del cerebro o en la médula/líquido espinal.

25 Los enlaces fosforotioato pueden utilizarse en moléculas de cadena antisentido y/o pasajera. Dichas cadenas/moléculas pueden comprender, en una realización, otros enlaces, o mezclas de diferentes enlaces, por ejemplo enlaces tanto fosfato como fosforotioato, o sólo enlaces fosfato, u otros enlaces, tal como se da a conocer en la presente memoria.

30 El enlace entre nucleósidos puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de: $-O-P(O)_2-O-$, $-O-P(O,S)-O-$, $-O-P(S)_2-O-$, $-S-P(O)_2-O-$, $-S-P(O,S)-O-$, $-S-P(S)_2-O-$, $-O-P(O)_2-S-$, $-O-P(O,S)-S-$, $-S-P(O)_2-S-$, $-O-PO(R^H)-O-$, $O-PO(OCH_3)-O-$, $-O-PO(NR^H)-O-$, $-O-PO(OCH_2CH_2S-R)-O-$, $-O-PO(BH_3)-O-$, $-O-PO(NHR^H)-O-$, $-O-P(O)_2-NR^H-$, $-NR^H-P(O)_2-O-$, $-NR^H-CO-O-$, $-NR^H-CO-NR^H-$, y/o el enlace entre nucleósidos puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de: $-O-CO-O-$, $-O-CO-NR^H-$, $-NR^H-CO-CH_2-$, $-O-CH_2-CO-NR^H-$, $-O-CH_2-CH_2-NR^H-$, $-CO-NR^H-CH_2-$, $-CH_2-NR^H-CO-$, $-O-CH_2-CH_2-S-$, $-S-CH_2-CH_2-O-$, $-S-CH_2-CH_2-S-$, $-CH_2-SO_2-CH_2-$, $-CH_2-CO-NR^H-$, $-O-CH_2-CH_2-NR^H-CO-$, $-CH_2-NCH_3-O-CH_2-$, en los que R^H se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C_{1-4} . Convenientemente, en algunas realizaciones, pueden resultar preferentes los enlaces entre nucleósidos que contienen azufre (S), tal como se han proporcionado anteriormente.

40 La introducción de muescas (o, en una realización, huecos) en la cadena pasajera resultará en una reducción efectiva de la temperatura de fusión del complejo de ARN, provocando de esta manera que el complejo sea más propenso al desensamblaje. En una realización, la temperatura de fusión de cada molécula de cadena discontinua (es decir, cada una de la primera, segunda o posteriores moléculas de ARN que forma la cadena pasajera discontinua) es superior a $37^\circ C$, tal como de por lo menos $40^\circ C$, tal como de por lo menos $45^\circ C$, preferentemente de por lo menos $50^\circ C$. En el caso de que la longitud o el contenido de GC de parte de una molécula de cadena discontinua sea excesivamente baja de manera que resulte en la disociación del dúplex in vivo, pueden utilizarse análogos de nucleótido potenciadores de la afinidad para incrementar la T_f . Sin embargo, en el contexto de la presente invención se cree que cada molécula de cadena discontinua debería presentar una longitud de por lo menos 3 nucleobases, tal como de por lo menos 4, o por lo menos 5, o por lo menos 6, o por lo menos 7, o por lo menos 8 nucleobases.

Entre la primera y la segunda moléculas de ARN, y opcionalmente moléculas de ARN adicionales, que conjuntamente forman la cadena pasajera, existe una discontinuidad.

55 Una discontinuidad altamente preferente de la invención es una muesca. Una muesca debe entenderse como una discontinuidad en una cadena de un ácido nucleico de doble cadena causada por un enlace fosfodiéster faltante (un enlace entre nucleobases adecuado); sin embargo, sin el ácido nucleico de doble cadena al que falta un nucleótido. De esta manera, las bases frente a la muesca todavía se hibridarán con bases en la cadena con muesca.

60 Otra discontinuidad de la invención es una muesca alternativa, que se entiende como una discontinuidad en una cadena de un ácido nucleico de doble cadena causada por un enlace faltante, o más de un enlace faltante en el esqueleto de azúcar-fosfato (en una realización, diferente de un enlace fosfodiéster); sin embargo, sin el ácido

nucleico de doble cadena al que falta una nucleobase. De esta manera, las bases frente a la muesca todavía se hibridarán con bases en la cadena con muesca.

5 Se reconocerá que, en algunas realizaciones, el término muesca tal como se utiliza en la presente memoria puede incluir la expresión 'muesca alternativa'.

Un hueco tal como se utiliza en el presente contexto se refiere a una discontinuidad en la que falta por lo menos un nucleótido o nucleósido, o una nucleobase, en el ácido nucleico de doble cadena.

10 En una realización preferente de la invención, una muesca separa la primera y la segunda moléculas de ARN y opcionalmente una o más moléculas de ARN adicionales que forman la cadena pasajera discontinua.

15 En una realización preferente, la cadena pasajera discontinua no comprende ningún hueco entre la primera y segunda moléculas de ARN y opcionalmente moléculas de ARN adicionales.

Sin embargo, se encuentra contemplado que en una realización la cadena pasajera discontinua no comprenda un hueco (u opcionalmente más de uno) entre la primera y la segunda moléculas de ARN y opcionalmente moléculas de ARN adicionales.

20 En una realización, un hueco separa la primera y la segunda moléculas de ARN. En una realización, el hueco es un hueco de 1 nucleótido. En una realización, el hueco es un hueco de 2 nucleótidos.

25 En una realización, la cadena pasajera discontinua del complejo de ARN puede unirse a la cadena antisentido. En la figura 5 se indican de manera general diversos complejos de ARN en los que la cadena pasajera discontinua se encuentra unida a la cadena antisentido.

De esta manera, en una realización de la invención, la primera molécula de ARN se conecta a la cadena antisentido mediante un conector.

30 En otra realización, la segunda molécula de ARN se conecta a la cadena antisentido mediante un conector.

En todavía otra realización, tanto la primera como la segunda moléculas de ARN se encuentran conectadas a la cadena antisentido mediante un conector.

35 En todavía otra realización de la invención, un conector conecta la primera y la segunda moléculas de ARN de la cadena pasajera discontinua, en la que dicho conector no es un simple enlace entre nucleósidos tal como se indica en la presente memoria, tal como un enlace fosfodiéster (en el caso de que el conector sea un simple enlace fosfodiéster, la cadena pasajera es una cadena pasajera continua típica).

40 Los conectores preferentes de la invención son ADN de cadena sencilla, ARN de cadena sencilla y un conector PEG. En el caso de que la primera y la segunda moléculas de ARN se conecten mediante un ARN de cadena sencilla (u otra secuencia de nucleobases), la discontinuidad resultante de hecho lo que con frecuencia se denomina protuberancia, es decir, en el sitio de discontinuidad la cadena pasajera comprende una secuencia de nucleobases adicional que no es complementaria a las cadenas antisentido, que típicamente consiste de por lo menos una, tal como por lo menos dos o por lo menos tres nucleobases no complementarias. Se reconocerá que la inclusión de una protuberancia podría interferir con la formación del complejo CSIA y por lo tanto resultará deseable mantener el tamaño de la protuberancia en un mínimo, convenientemente la protuberancia típicamente presenta una longitud inferior a 10 nucleobases no complementarias.

50 En una realización, puede utilizarse como conector cualquier cosa capaz de unir funcionalmente las moléculas de ARN del complejo de ARN. Sin embargo, es típico que el conector sea una entidad orgánica que se une covalentemente a cada una de las moléculas unidas, y es diferente de los enlaces entre nucleobases que forman el esqueleto (es decir, las nucleobases que forman híbridos complementarios con la cadena contraria, considerando la posibilidad de una no correspondencia y un extremo 3'-protuberante) de la cadena antisentido o una primera, segunda u opcionalmente posteriores moléculas de ARN que forman la cadena pasajera discontinua.

Sin embargo, en una realización preferente, el conector no es un ARN de cadena sencilla.

60 En una realización, el conector no es una molécula de ADN de cadena sencilla.

En una realización, el conector no comprende nucleobases.

En una realización, se seleccionan conectores de la invención de manera que no afecten a las propiedades de apareamiento de bases de la cadena antisentido y/o la cadena pasajera.

5 Sin embargo, en el caso de que la temperatura de fusión de la primera molécula de ARN sea excesivamente baja para el apareamiento de bases a una temperatura dada, la conexión de dicha primera molécula de ARN con la cadena antisentido podría incrementar la temperatura de fusión efectiva. De esta manera, en otra realización, se seleccionan conectores para incrementar la temperatura de fusión de por lo menos la primera molécula de ARN.

10 También pueden seleccionarse conectores de la invención de manera que proporcionen sitios de conjugación que permitan la conjugación de otras moléculas con el complejo de ARN. Dichas otras moléculas pueden ser, por ejemplo, portadores que ayuden a la incorporación del complejo de ARN en una célula u organismo. O pueden ser moléculas que afecten directamente a la incorporación de la cadena guía en un CPGA, por ejemplo para garantizar adicionalmente que sólo se incorpora la cadena antisentido.

15 En una realización preferente de la invención, la cadena pasajera del complejo de ARN comprende una primera y una segunda moléculas de ARN que no se encuentran unidas covalentemente entre sí y tampoco se encuentran unidas covalentemente con la cadena antisentido. De esta manera, el complejo de ARN puede comprender tres moléculas de ARN individuales: la cadena antisentido y la primera y segunda moléculas de ARN, que conjuntamente forman la cadena pasajera discontinua. Claramente en el caso de que la cadena pasajera comprenda moléculas de
20 ARN adicionales, el complejo de ARN puede comprender más de tres moléculas de ARN individuales.

En una realización, la utilización del término ARN en el presente contexto se refiere a una secuencia polinucleobase que, hibridada con la cadena antisentido, forma un complejo que es capaz de funcionar como un ARNip y/o que es capaz de formar una conformación de forma A.

25 En una realización, las moléculas de ARN/cadena pasajera/cadena antisentido comprenden por lo menos 10% de nucleótidos de ARN en comparación con el número total de nucleobases en las moléculas de ARN/cadena pasajera/cadena antisentido, respectivamente, tal como por lo menos 20%, tal como por lo menos 30%, tal como por lo menos 40%, tal como por lo menos 50%, tal como por lo menos 60%, tal como por lo menos 70%, tal como por lo
30 menos 80%, tal como por lo menos 90% de nucleótidos de ARN, o incluso 100% de nucleótidos de ARN.

En otra realización preferente, la cadena pasajera del complejo de ARN comprende 3 moléculas de ARN que no se encuentran unidas covalentemente. En otras realizaciones, la cadena pasajera comprende 4, 5 y 6 moléculas de ARN que no se encuentran unidas covalentemente entre sí y que tampoco se encuentran unidas a la cadena
35 antisentido.

Al utilizar una cadena pasajera del complejo de ARN, que comprende dos o más moléculas de ARN que no se encuentran unidas covalentemente, la síntesis química puede resultar más fácil que la síntesis de una cadena pasajera continua, es decir, resulta más fácil sintetizar y purificar dos o más moléculas cortas de ARN que una
40 molécula de ARN más larga.

Además, la utilización de dos o más moléculas de ARN proporciona más libertad sintética con respecto a la conjugación con las moléculas de ARN. Una ventaja es que las moléculas separadas de ARN pueden conjugarse separadamente; de esta manera puede utilizarse la misma química en cada molécula de ARN. Otra ventaja es más
45 puntos de conjugación. Por ejemplo, los dos extremos 5' pueden conjugarse, cada uno, con un grupo particular, tal como un ligando o una molécula efectora.

La cadena pasajera del complejo de ARN de la invención puede comprender más de una discontinuidad. En una realización, la cadena pasajera comprende 2 discontinuidades. En otras realizaciones, la cadena pasajera
50 comprende 3 discontinuidades, 4 discontinuidades y 5 discontinuidades, respectivamente.

La discontinuidad de la cadena pasajera discontinua puede encontrarse situada en diversas posiciones. De esta manera, en una realización, la cadena pasajera discontinua presenta una discontinuidad en la posición 3, calculada en la dirección 5' a 3' desde el primer nucleótido de la cadena pasajera apareada con la cadena antisentido.

En otras realizaciones, la discontinuidad se encuentra en la posición 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,
55 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26, respectivamente.

Las discontinuidades preferentes pueden seleccionarse de entre el grupo que consiste de la posición 8, 9, 10, 11, 12 o 13, contada desde el extremo 5' de la cadena pasajera, la mayoría una única discontinuidad en la cadena pasajera
60 en una de dichas posiciones, tal como entre las posiciones 9 y 12.

Preferentemente, los extremos 5' del complejo de ARN se encuentran fosforilados o se encuentran disponibles para la fosforilación. Disponible para la fosforilación se refiere a que el grupo 5'-hidroxi no ha sido bloqueado, por ejemplo mediante conjugación directa o mediante otra conjugación con otros grupos en vecindad del grupo 5'-hidroxi, que evitará que el grupo 5'-hidroxi sea fosforilado.

5 Por lo tanto, en una realización preferente de la invención, la primera molécula de ARN comprende un grupo 5'-fosfato y un grupo 3'-hidroxi.

10 En otra realización, la segunda molécula de ARN comprende un fosfato en el extremo 5' y un grupo 3'-hidroxi.

15 En todavía otra realización, la cadena antisentido comprende un fosfato en el extremo 5' y un grupo 3'-hidroxi.

20 En una realización preferente, las moléculas de ARN que forman la cadena pasajera discontinua, tal como la primera molécula de ARN, la segunda molécula de ARN y/o moléculas de ARN adicionales son capaces de hibridarse con la cadena antisentido formando un dúplex con una T_f de por lo menos 37°C, tal como por lo menos 40°C, por lo menos 50°C, por lo menos 55°C, o por lo menos 60°C. En un aspecto, la T_f es de entre 37°C y 80°C, tal como de entre 50°C y 70°C.

25 Medición de la T_f

30 Se mezcló una solución 3 mM del compuesto en fosfato sódico 10 mM/NaCl 100 mM/EDTA 0,1 nM, pH 7,0, con su oligonucleótido de ADN o ARN complementario (preferentemente ARN) a una concentración de 3 mM en fosfato sódico 10 mM/NaCl 100 mM/EDTA 0,1 nM, pH 7,0, a 90°C durante un minuto y se dejó que se enfriase hasta la temperatura ambiente. A continuación, se determinó la curva de fusión del dúplex mediante la medición de la absorbancia a 260 nm con una tasa de calentamiento de 1°C/min. en el intervalo de entre 25°C y 95°C. Se midió la T_f como el máximo de la primera derivada de la curva de fusión.

35 En el contexto de la presente invención, el término "complementario" se refiere a la capacidad de apareamiento preciso mutuo entre dos secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, en el caso de que un nucleótido en una posición determinada de un oligonucleótido sea capaz de enlace de hidrógeno con un nucleótido en la posición correspondiente de una molécula de ADN o ARN, el oligonucleótido y el ADN o ARN se considera que son complementarios entre sí en esa posición. El ADN o ARN y el oligonucleótido se consideran complementarios entre sí en el caso de que un número suficiente de nucleótidos en el oligonucleótido puede formar enlaces de hidrógeno con nucleótidos correspondientes en el ADN o ARN diana para permitir la formación de un complejo estable. Para ser estable in vitro o in vivo la secuencia no necesita ser complementaria al 100% con su ácido nucleico diana, es decir, puede comprender uno o más nucleótidos o análogos de nucleótido que no se aparean con el nucleótido correspondiente en el ADN o ARN diana; estos se denominan en la presente memoria "no correspondencias". Los términos "complementario" e "hibridable" implican, de esta manera, que el compuesto de la invención se une de manera suficientemente fuerte y específicamente a la molécula diana, proporcionando la interferencia deseada con la función normal de la diana o dianas. Convenientemente, la secuencia puede comprender una o dos no correspondencias. Sin embargo, en una realización, aparte de la posibilidad de extremos 3'-protuberantes, la cadena pasajera discontinua y la cadena antisentido del complejo de ARN según la invención son complementarios aunque sin no correspondencias. En una realización, el término complementario se refiere a 100% complementario a lo largo de la región del dúplex (es decir, excluyendo los extremos 3'-protuberantes).

45 En algunas realizaciones de la invención resulta preferente que el complejo de ARN comprenda uno o más análogos de nucleótido.

50 La utilización de análogos de nucleótido puede resultar favorecida por varios motivos. Estos pueden utilizarse, por ejemplo, para incrementar la temperatura de fusión de la región nuclear de doble cadena. En el caso de que la primera y/o la segunda moléculas de ARN sean cortas, pueden presentar una temperatura de fusión que no permita el apareamiento de bases estable a una temperatura dada. En este caso, pueden utilizarse análogos de nucleótido tales como ANB para incrementar la temperatura de fusión. También pueden utilizarse análogos de nucleótido para reducir la temperatura de fusión de la región nuclear de doble cadena. Con este fin pueden utilizarse nucleótidos abásicos. Además, pueden utilizarse análogos de nucleótidos por razones relacionadas con el coste o la facilidad de síntesis.

55 De acuerdo con lo anterior, en una realización preferente, la cadena antisentido comprende análogos de nucleótido.

60 En otra realización preferente, la cadena pasajera discontinua comprende análogos de nucleótido.

- En todavía otra realización preferente, la primera y la segunda moléculas de ARN de la cadena pasajera comprenden, cada una, nucleótidos de análogo.
- 5 En una realización de la invención el número de análogos de nucleótido en la cadena antisentido es de 10. En otras realizaciones de la invención, el número de análogos de nucleótido en la cadena antisentido es de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1, respectivamente.
- En otra realización, todos los nucleótidos de la cadena antisentido son análogos de nucleótido.
- 10 En una realización de la invención, el número de análogos de nucleótido en la cadena antisentido es de 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 o 11.
- En una realización, la cadena antisentido comprende entre 0 y 10, tal como entre 1 y 8, tal como entre 2 o 3 y 8 análogos de nucleótido.
- 15 En una realización de la invención el número de análogos de nucleótido en la cadena antisentido es de 10. En otras realizaciones de la invención, el número de análogos de nucleótido en la cadena antisentido es de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1, respectivamente.
- 20 En otra realización, todos los nucleótidos de la cadena pasajera son análogos de nucleótido.
- En una realización de la invención, el número de análogos de nucleótido en la cadena pasajera es de 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 o 11.
- 25 En una realización, la cadena pasajera comprende entre 0 y 10, tal como entre 1 y 8, tal como entre 2 o 3 y 8 análogos de nucleótido.
- En una realización preferente, tanto la cadena antisentido como la cadena pasajera comprenden análogos de nucleótido.
- 30 En una realización, los análogos de nucleótido del complejo de ARn son idénticos, es decir, son todos, por ejemplo, ANB. En otra realización, se utilizan diversos análogos de nucleótido diferentes en el mismo complejo de ARN.
- 35 En una realización, los análogos de nucleótido de la cadena pasajera son idénticos, es decir, son todos, por ejemplo, ANB. En otra realización, se utilizan diversos análogos de nucleótido diferentes en la misma cadena pasajera.
- En una realización, los análogos de nucleótido de la cadena antisentido son idénticos, es decir, son todos, por ejemplo, ANB. En otra realización, se utilizan diversos análogos de nucleótido diferentes en la misma cadena antisentido.
- 40 En una realización, la primera molécula de ARN de la cadena pasajera comprende uno o más análogos de nucleótido.
- En una realización, la primera molécula de ARN de la cadena pasajera comprende por lo menos 2 análogos de nucleótido.
- 45 En una realización, la segunda molécula de ARN de la cadena pasajera comprende uno o más análogos de nucleótido.
- En una realización, la segunda molécula de ARN de la cadena pasajera comprende por lo menos 2 análogos de nucleótido.
- 50 En una realización, un análogo de nucleótido se localiza dentro de las tres unidades de nucleobase terminales de la primera y/o segunda molécula de ARN (5' o 3', respectivamente), tal como la posición 1, 2 o 3 de las unidades de nucleobase terminales respectivas.
- 55 En una realización, por lo menos una de las moléculas de ARN adicionales de la cadena pasajera comprende por lo menos un análogo de nucleótido.
- En una realización, cada molécula de ARN adicional que forma parte de la cadena pasajera discontinua comprende por lo menos un análogo de nucleótido.
- 60 En una realización, la cadena pasajera discontinua comprende un análogo de nucleótido en las posiciones 10 y 12 desde el extremo 5' de la cadena pasajera.

- En una realización, cada molécula de ARN adicional que forma parte de la cadena pasajera discontinua comprende por lo menos un análogo de nucleótido.
- 5 En una realización, la temperatura de fusión (T_f) de cada una de la primera, segunda y opcionalmente posteriores moléculas de ARN que forman la cadena pasajera discontinua es de por lo menos 40°C.
- En una realización, la longitud de cada una de la primera, segunda y opcionalmente posteriores moléculas de ARN que forman la cadena pasajera discontinua es de por lo menos tres unidades de nucleobase.
- 10 En una realización, la cadena antisentido comprende por lo menos 1 análogo de nucleótido.
- En una realización, la cadena antisentido comprende por lo menos 1 análogo de nucleótido dentro de la región dúplex formada con la cadena pasajera discontinua.
- 15 En una realización, la cadena antisentido comprende por lo menos un análogo de nucleótido en una posición que se encuentra dentro de las 4 nucleobases contadas desde el extremo 3' de la cadena antisentido, tal como la posición 1, 2, 3 y/o 4 desde el extremo 3' de la cadena antisentido.
- 20 En una realización, por lo menos una de las nucleobases presentes en las 9 unidades de nucleobase más hacia el extremo 5' de la cadena antisentido es un análogo de nucleótido.
- En una realización, por lo menos una de las nucleobases presentes en la región dentro de las 4 a 10 nucleobases desde el extremo 3' de la cadena antisentido es un análogo de nucleótido.
- 25 En una realización, la cadena antisentido presenta un análogo de nucleótido en la posición 11 desde el extremo 5' de la cadena antisentido.
- En una realización, la cadena antisentido presenta nucleótidos de ARN en las posiciones 10 y 12 desde el extremo 5' de la cadena antisentido.
- 30 En una realización, las unidades de nucleobase más 5' de la cadena antisentido es una unidad de nucleótido de ARN.
- En una realización, la cadena antisentido comprende por lo menos 2 análogos de nucleótido.
- 35 En una realización, los análogos de nucleótido son compatibles con la formación de una conformación de forma A (o en una realización, una forma A/B, es decir, una forma entre las conformaciones de formas A y B) en un dúplex con una molécula de ARN complementaria que consiste únicamente de unidades de ARN unidas mediante enlaces de fosfato.
- 40 En una realización, los análogos de nucleótido presentes en la cadena antisentido y/o la cadena pasajera se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste de: monómeros de 2'-O-alkil-ARN (tal como 2'-OMe), monómeros de 2'-amino-ADN, monómeros de 2'-fluoro-ADN, monómeros de ácido arabino-nucleico (ANA), monómeros 2'-fluoro-ANA, monómeros de ANB y monómeros de INA.
- 45 En una realización, los análogos de nucleótido presentes en la cadena pasajera discontinua (o la cadena antisentido, o ambas, como entidades separadas o como un total combinado de análogos de nucleótido dentro del complejo de ARN) incluyen por lo menos uno de los análogos de nucleótido anteriormente indicados (individualmente, por ejemplo sólo 2'-OMe, o colectivamente, tal como los seleccionados de entre los anteriormente indicados), tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 monómeros de nucleótido.
- 50 Entre los monómeros de nucleótido preferentes, aparte de ANB, se incluyen los monómeros de 2'-O-alkil-ARN (tales como 2'-OMe) y los monómeros de 2'-fluoro-ADN.
- 55 En una realización, el número de análogos de nucleótido presente en la cadena antisentido o la cadena pasajera (o ambas, como entidades separadas o como un total combinado de análogos de nucleótido dentro del complejo de ARN) se selecciona de entre el grupo que consiste de: por lo menos un análogo de nucleótido, tal como por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9, por lo menos 10, por lo menos 11, por lo menos 12, por lo menos 13, por lo menos 14, por lo menos 15, por lo menos 16, por lo menos 17, por lo menos 18, por lo menos 19, por lo menos 20, por lo menos 21, por lo menos 22, por lo menos 23, por lo menos 24 y por lo menos 25 análogos de nucleótido. Convenientemente, el número de análogos de nucleótido puede ser inferior a 20, tal como inferior a 18, tal como inferior a 16, tal como inferior a 14, tal como inferior a 12, tal como inferior a 10.
- 60

- 5 En una realización, los análogos de nucleótido presentes en la cadena pasajera discontinua (o la cadena antisentido, o ambas, como entidades separadas o como un total combinado de análogos de nucleótido dentro del complejo de ARN) incluyen por lo menos un monómero 2-O-alkuil-ARN (tal como 2'-OMe), tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 monómeros de 2'-O-alkuil-ARN (tal como 2'-OMe).
- 10 En una realización, que puede ser igual o diferente, los análogos de nucleótido presentes en la cadena pasajera discontinua (o la cadena antisentido, o ambas, como entidades separadas o como un total combinado de análogos de nucleótido dentro del complejo de ARN) incluyen por lo menos un monómero 2'-fluoro-ADN, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 monómeros de 2'-fluoro-ADN.
- 15 En una realización, los análogos de nucleótido presentes en la cadena pasajera discontinua incluyen por lo menos una unidad de ácido nucleico bloqueado (ANB).
- 20 En una realización, que puede ser igual o diferente, los análogos de nucleótido presentes en la cadena pasajera discontinua (o la cadena antisentido, o ambas, como entidades separadas o como un total combinado de análogos de nucleótido dentro del complejo de ARN) incluyen por lo menos un monómero de ANB, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 monómeros de ANB.
- 25 En una realización, la unidad o unidades de ANB se seleccionan independientemente de entre el grupo que consiste de oxi-ANB, tio-ANB y amino-ANB, en configuraciones D- β y L- α o combinaciones de las mismas.
- 30 En una realización, los análogos de nucleótido presentes en la cadena antisentido incluyen por lo menos una unidad de ácido nucleico bloqueado (ANB), tal como por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9, por lo menos 10, por lo menos 11, por lo menos 12, por lo menos 13, por lo menos 14, por lo menos 15, por lo menos 16, por lo menos 17, por lo menos 18, por lo menos 19 o por lo menos 20 unidades de ANB. Convenientemente, el número de ANB puede ser inferior a 20, tal como inferior a 18, tal como inferior a 16, tal como inferior a 14, tal como inferior a 12, tal como inferior a 10.
- 35 En una realización, todos los análogos de nucleótido presentes en la cadena antisentido son unidades de ácido nucleico bloqueado (ANB).
- 40 En una realización preferente, la cadena antisentido sólo comprende unas cuantas unidades de análogo de nucleótido, tal como unidades de ANB. Típicamente, resulta preferente que las unidades de nucleótido presentes en la cadena antisentido se sitúan dentro de la mitad 3' de la cadena antisentido, tal como entre las posiciones 1 y 9 de la cadena antisentido, tal como la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de la cadena antisentido, tal como dentro de la región de un extremo 3' protuberante, o dentro de las primeras 3, tal como la primera, segunda o tercera posiciones de nucleobase del dúplex medidas desde el extremo 3' de la cadena antisentido.
- 45 En una realización, los análogos de nucleótido presentes en la cadena pasajera (o cadena antisentido, o ambas, como entidades separadas o como un total combinado de análogos de nucleótido dentro del complejo de ARN) incluyen por lo menos una unidad de ácido nucleico bloqueado (ANB), tal como por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9, por lo menos 10, por lo menos 11, por lo menos 12, por lo menos 13, por lo menos 14, por lo menos 15, por lo menos 16, por lo menos 17, por lo menos 18, por lo menos 19 o por lo menos 20 unidades de ANB. Convenientemente, el número de ANB puede ser inferior a 20, tal como inferior a 18, tal como inferior a 16, tal como inferior a 14, tal como inferior a 12, tal como inferior a 10.
- 50 En una realización, todos los análogos de nucleótido presentes en la cadena pasajera son unidades de ácido nucleico bloqueado (ANB).
- 55 En una realización, por lo menos uno de los análogos de nucleótido presentes en la cadena pasajera discontinua forma un par de bases con un análogo de nucleótido complementario presente en la cadena antisentido.
- 60 En una realización, todos los análogos de nucleótido presentes en la cadena pasajera discontinua forman un par de bases con un análogo de nucleótido complementario presente en la cadena antisentido, diferente de los análogos de nucleótido presentes en el extremo 3' protuberante (en caso de hallarse presente).
- En una realización, todos los análogos de nucleótido presentes en la cadena antisentido forman un par de bases con un análogo de nucleótido complementario presente en la cadena pasajera discontinua, diferente de los análogos de nucleótido presentes en el extremo 3' protuberante (en caso de hallarse presente).

En una realización, la cadena pasajera consiste de o comprende una molécula de ARN de 9 a 11 nucleótidos (nucleobases), tal como una molécula de ARN de 10 nucleótidos, con 1 a cinco análogos de nucleótido, tal como unidades de ANB, tal como dos unidades de ANB, y una molécula de ARN de 11 a 13 nucleótidos, tal como una molécula de ARN de 12 nucleótidos, que comprende entre 1 y 5 unidades de análogo de nucleótido, tal como unidades de ANB, tal como tres residuos de ANB.

En una realización, por lo menos una de las tres nucleobases 3'-terminales de la segunda molécula de ARN de las cadenas pasajeras es un análogo de nucleótido, tal como ANB. En dicha realización, las nucleobases 3'-terminales de la segunda molécula de ARN de la cadena pasajera pueden comprender uno de los motivos de nucleobases siguientes: Xxx-3', XXx-3', xXx-3', xxX-3', XXX-3', en los que x representa un monómero de ARN y X representa una unidad de análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB. En dicha realización, la segunda molécula de ARN de las cadenas pasajeras puede comprender uno o más monómeros de análogo de nucleótido adicionales, tal como uno o más monómeros de ANB adicionales en una posición, tal como en la posición 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 contada desde los extremos 3' de la segunda molécula de ARN. En una realización, la segunda molécula de ARN de la cadena pasajera comprende 3, 4 o 5 unidades de análogo de nucleótido, tal como unidades de monómero de ANB.

En una realización, por lo menos una de las tres nucleobases 3'-terminales de la segunda molécula de ARN de las cadenas pasajeras es un análogo de nucleótido, tal como ANB. En dicha realización, las nucleobases 3'-terminales de la segunda molécula de ARN de la cadena pasajera pueden comprender uno de los motivos de nucleobases siguientes: Xxx-3', XXx-3', xXx-3', xxX-3', XXX-3', en los que x representa un monómero de ARN y X representa una unidad de análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB. En dicha realización, la segunda molécula de ARN de las cadenas pasajeras puede comprender uno o más monómeros de análogo de nucleótido adicionales, tal como uno o más monómeros de ANB adicionales en una posición, tal como en la posición 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 contada desde los extremos 3' de la segunda molécula de ARN. En una realización, la segunda molécula de ARN de la cadena pasajera comprende 3, 4 o 5 unidades de análogo de nucleótido, tal como unidades de monómero de ANB.

En una realización, por lo menos una de las tres nucleobases 5'-terminales de la primera molécula de ARN de las cadenas pasajeras es un análogo de nucleótido, tal como ANB. En dicha realización, las nucleobases 5'-terminales de la primera molécula de ARN de la cadena pasajera pueden comprender uno de los motivos de nucleobases siguientes: 5'-Xxx, 5'-xXx, 5'-xxX y 5'-XXX, en los que x representa un monómero de ARN y X representa una unidad de análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB. En dicha realización, la primera molécula de ARN de las cadenas pasajeras puede comprender uno o más monómeros de análogo de nucleótido adicionales, tal como uno o más monómeros de ANB adicionales en una posición, tal como en la posición 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 contada desde los extremos 5' de la primera molécula de ARN. En una realización, la primera molécula de ARN de la cadena pasajera comprende 3, 4 o 5 unidades de análogo de nucleótido, tal como unidades de monómero de ANB.

Convenientemente, la cadena pasajera puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 análogos de nucleótido, tal como un análogo de nucleótido, tal como un monómero de ANB en una posición desde el extremo 3' seleccionada de entre el grupo que consiste de: la posición 1, la posición 2, la posición 3, la posición 4, la posición 5, la posición 6, la posición 7, la posición 8, la posición 9, la posición 10, la posición 11, la posición 12, la posición 13, la posición 14, la posición 15, la posición 16, la posición 17, la posición 18, la posición 19, la posición 20, la posición 21, la posición 22, la posición 23 o la posición 24.

En una realización, la segunda molécula de ARN de la cadena pasajera discontinua comprende una o más unidades de 2'-adamantil-amino y/o 2'-pireno-ANB.

La figura 20 ilustra que la introducción de moléculas de ANB en la primera y segunda moléculas de ARN de la cadena pasajera discontinua del complejo de ARN según la invención proporciona un silenciamiento altamente eficaz del ARN diana en comparación con una molécula de ARN equivalente en la que la cadena pasajera comprende únicamente unidades de ARN. En efecto, una combinación de tanto los análogos de nucleótido de incorporación, tales como ANB, en la cadena pasajera, y la discontinuidad de la cadena pasajera, permite la producción de un complejo de silenciamiento de ARN altamente eficaz y estable, adecuada para la utilización terapéutica (ver la figura 20).

Convenientemente, los análogos de nucleótido presentes en la cadena pasajera pueden ser nucleótidos (de ARN o ADN) modificados con un sustituyente 2', tales como unidades de ARN o ADN sustituidas con 2'-halo (tales como 2'-F-ADN) o 2'-O-Me-ARN (ver la figura 21).

La figura 22 ilustra que mediante la introducción de una cadena pasajera discontinua, tal como las cadenas pasajeras discontinuas según la presente invención, los presentes inventores han encontrado que la cadena

pasajera puede tolerar análogos de nucleótido más modificados o funcionalizados, tales como ANB o ANB funcionalizado.

5 En realizaciones adicionales, la segunda molécula de ARN de la cadena pasajera discontinua presenta una secuencia (5' a 3') seleccionada de entre el grupo que consiste de: xxXxXxxxxXXx, xxxXxxxxXXx, en la que x representa un monómero de ARN y X representa una unidad de análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB.

10 En realizaciones adicionales, que pueden ser iguales o diferentes de la anteriormente indicada, la primera molécula de ARN de la cadena pasajera discontinua presenta una secuencia (5' a 3') seleccionada de entre el grupo que consiste de: xxXxxxxXx, en la que x representa un monómero de ARN y X representa una unidad de análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB.

15 La utilización de una cadena antisentido que comprende análogos de nucleótido, tal como ANB, puede reducir significativamente o incluso destruir la capacidad de silenciamiento de un complejo de silenciamiento de ARN. Esta sensibilidad de la cadena antisentido frente a la modificación de los nucleótidos (introducción de análogos) ha sido una dificultad para el desarrollo de terapéuticos basados en ARNip, ya que la introducción de análogos de nucleótido, considerada necesaria para la estabilidad in vivo, podría destruir efectivamente las capacidades terapéuticas de la molécula, particularmente a la dosis de análogos de nucleótido estabilizadores necesaria para una
20 estabilidad in vivo suficiente. Mediante la introducción de una cadena pasajera discontinua, tal como las cadenas pasajeras discontinuas según la presente invención, los presentes inventores han encontrado que la cadena antisentido puede tolerar dosis considerablemente más altas de análogos de nucleótido, tal como ANB (ver las figuras 23, 24 y 25) y otros análogos de nucleótido, tal como 2'-F-ADN o 2'-O-Me-ARN. La ventaja se observa incluso en el caso de que la cadena antisentido presente análogos de nucleótido en la región cadena arriba de las
25 tres unidades de nucleobase 3'-terminales de la cadena antisentido (típicamente el área menos sensible a las modificaciones de nucleótidos). En efecto, en la figura 24 los presentes inventores muestran que una cadena antisentido que comprende únicamente análogos de nucleótido, tal como 2'-F-ADN o 2'-O-Me-ARN puede, al emparejarla con una cadena pasajera discontinua, proporcionar todavía un efecto de silenciamiento razonable de la diana.

30 En una realización, la cadena antisentido comprende por lo menos 1 análogo de nucleótido que se encuentra fuera de los tres residuos de nucleobase 3'-terminales de la cadena antisentido.

35 En una realización, todas las nucleobases de la cadena antisentido son análogos de nucleótido, tal como análogos de nucleótido con una sustitución en 2', tal como 2'-F-ADN o 2'-O-Me-ARN.

40 En una realización, la cadena antisentido puede comprender uno de los motivos de nucleobase siguientes: 5'-Xxx, 5'-XXx, 5'-xXx, 5'-xxX y 5'-XXX, en los que x representa un monómero de ARN y X representa una unidad de análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB.

45 Convenientemente, la cadena antisentido puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 análogos de nucleótido, tal como un monómero de ANB, en una posición desde el extremo 5' seleccionada de entre el grupo que consiste de: la posición 1, la posición 2, la posición 3, la posición 4, la posición 5, la posición 6, la posición 7, la posición 8, la posición 9, la posición 10, la posición 11, la posición 12, la
50 posición 13, la posición 14, la posición 15, la posición 16, la posición 17, la posición 18, la posición 19, la posición 20, la posición 21, la posición 22, la posición 23 o la posición 24. La cadena antisentido puede comprender análogos de nucleótido con el extremo 3' protuberante, tal como en las posiciones 1, 2, 3 desde el extremo 3', y/o dentro del dúplex con la cadena pasajera. En una realización, el monómero más hacia el extremo 5' de la cadena antisentido es un nucleótido de ARN. La cadena pasajera puede comprender análogos de nucleótido con el extremo 3'-
protuberante, tal como en las posiciones 1, 2, 3 desde el extremo 3', y/o dentro del dúplex con la cadena antisentido.

55 En una realización, que puede ser igual o diferente, la cadena antisentido comprende por lo menos tres análogos de nucleótido, tal como unidades de ANB. Convenientemente, por lo menos una de las unidades de análogo de nucleótido se encuentra situada fuera de los tres monómeros de nucleótido 3'-terminales de la cadena antisentido, tal como por lo menos dos de las unidades de análogo de nucleótido se encuentran situadas fuera de los tres
60 monómeros de nucleobase 3'-terminales de la cadena antisentido, tal como por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 22 de las unidades de análogo de nucleótido se encuentran situadas fuera de los tres monómeros de nucleobase 3'-terminales de la cadena antisentido, tal como entre 1 y 10 de las unidades de análogo de nucleótido se encuentran situadas fuera de los tres monómeros de nucleobase 3'-terminales de la cadena antisentido.

En una realización, la cadena antisentido comprende entre 3 y 10 unidades de análogo de nucleótido, tal como monómeros de ANB, tal como entre 4 y 6 monómeros de análogo de nucleótido.

En una realización preferente, la cadena antisentido comprende uno o más análogos de nucleótido, tal como ANB, dentro de la región de la cadena antisentido que forma un dúplex complementario con la cadena pasajera.

5 En una realización, la cadena antisentido puede comprender un motivo de nucleobase 5'-xxXxxX.

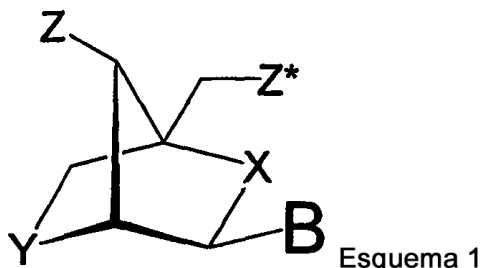
En una realización, la cadena antisentido puede comprender uno de los motivos de nucleobase siguientes: 5'-Xxx, 5'-XXx, 5'-xXx, 5'-xxX y 5'-XXX, en los que x representa un monómero de ARN y X representa una unidad de análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB.

10 En una realización, la cadena antisentido puede comprender uno de los motivos de nucleobase siguientes: 5'-xxxxX, 5'-xxxXx, 5'-xxXxx, 5'-xXxxx, 5'-Xxxxx, 5' xxxXX, 5' xxXXx, 5' xXXxx, 5' XXxxx, 5' xxXXX, 5' xXXXx, 5' XXXxx, 5' xXXXX, 5' XXXXx, 5' XxxxX, 5' XxxXx, 5' XxXxx, 5' XXxxx, 5' XXxxX, 5' XxxXX, 5' XxXxX, 5' XXxXX, 5' XXXXX, en los que x representa un monómero de ARN y X representa una unidad de análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB.

15 En una realización, la cadena antisentido puede comprender una secuencia 5'xxXxxXxxxxXxxXxxxxXXx3', en la que x representa un monómero de ARN y X representa una unidad de análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB.

20 En una realización, por lo menos una de las tres nucleobases 3'-terminales de la segunda molécula de ARN de las cadenas pasajeras es un análogo de nucleótido, tal como ANB. En dicha realización, las nucleobases 3'-terminales de la segunda molécula de ARN de la cadena pasajera pueden comprender uno de los motivos de nucleobases siguientes: Xxx-3', XXx-3', xXx-3', xxX-3', XXX-3', en los que x representa un monómero de ARN y X representa una unidad de análogo de nucleótido, tal como una unidad de ANB. En dicha realización, la segunda molécula de ARN de la cadena pasajera comprende unidades de análogo de nucleótido adicionales, tal como unidades de ANB.

25 El ácido nucleico bloqueado (ANB) utilizado en el complejo de ARN según la invención presenta la estructura de fórmula general siguiente:



30 X e Y se seleccionan independientemente de entre los grupos -O-, -S-, -N(H)-, N(R)-, -CH₂- o -CH- (en caso de ser parte de un doble enlace), -CH₂-O-, -CH₂-S-, -CH₂-N(H)-, -CH₂-N(R)-, -CH₂-CH₂- o -CH₂-CH- (en caso de ser parte de un doble enlace), -CH=CH-, en la que R se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C₁₋₄; Z y Z* se seleccionan independientemente de entre un enlace entre nucleótidos, un grupo terminal o un grupo protector; B constituye una nucleobase natural o no natural, y los grupos asimétricos pueden encontrarse en cualquiera de las dos orientaciones.

35 Pueden resultar preferentes los enlaces fosforotioato. Sin embargo, las moléculas que forman el complejo de ARN pueden comprender otros enlaces, o mezclas de diferentes enlaces (por ejemplo tanto enlaces fosfato como fosforotioato), o sólo enlaces fosfato u otros enlaces, tal como se da a conocer en la presente memoria.

40 El término "tio-ANB" comprende un nucleótido bloqueado en el que por lo menos uno de entre X e Y en el Esquema 1 se selecciona de entre S o -CH₂-S-. El tio-ANB puede encontrarse en configuración tanto beta-D como alfa-L.

45 El término "amino-ANB" comprende un nucleótido bloqueado en el que X o Y en el Esquema 1 (-N(H)-, N(R)-, CH₂-N(H)- y -CH₂-N(R)-), en el que R se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C₁₋₄. El amino-ANB puede encontrarse en configuración tanto beta-D como alfa-L.

50 El término "oxi-ANB" comprende un nucleótido bloqueado en el que por lo menos uno de entre X e Y en el Esquema 1 se selecciona de entre -O- o -CH₂-O-. El oxi-ANB puede encontrarse en configuración tanto beta-D como alfa-L.

El término "ena-ANB" comprende un nucleótido bloqueado en el que Y en el Esquema 1 es -CH₂-O- (en el que el átomo de oxígeno de -CH₂-O- se encuentra unido a la posición 2 respecto a la nucleobase B).

El término "alfa-L-ANB" comprende un nucleótido bloqueado representado tal como se muestra en el Esquema 2 (estructura a la derecha).

5 La expresión "derivados de ANB" comprende todos los nucleótidos bloqueados en el Esquema 1, así como beta-D-metilén-ANB, por ejemplo tio-ANB, amino-ANB, alfa-L-oxi-ANB y ena-ANB, excepto beta-D-oxi-ANB.

La expresión "nucleótido bloqueado" se refiere a una 'nucleobase bloqueada', y no se utiliza en el mismo contexto que el término 'nucleótido', tal como se define en la presente memoria.

10 En el Esquema 1, los 4 centros quirales se muestran en una configuración fija. Sin embargo, las configuraciones en el Esquema 1 no se encuentran necesariamente fijadas. También se encuentran comprendidos en la presente invención los compuestos del Esquema general 1, en el que se encuentran centros quirales en las diferentes configuraciones, tales como los representados en el Esquema 2. De esta manera, la intención de la ilustración del Esquema 1 es no limitar la configuración del centro quiral. Cada centro quiral en el Esquema 1 puede existir en la configuración R o S. La definición de R ('rectus') y S ('sinister') se proporciona en IUPAC, 1974, Recommendations, sección E, Fundamental Stereochemistry. Las normas pueden encontrarse en Pure Appl. Chem. 45:13-30, 1976, y en "Nomenclature of Organic Chemistry", Pergamon, New York, 1979.

20 Z y Z* se seleccionan independientemente de entre un enlace entre nucleósido, un grupo terminal o un grupo protector.

25 El enlace entre nucleósidos puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de: -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -S-P(O)₂-O-, -S-P(O,S)-O-, -S-P(S)₂-O-, -O-P(O)₂-S-, -O-P(O,S)-S-, -S-P(O)₂-S-, -O-PO(R^H)-O-, O-PO(OCH₃)-O-, -O-PO(NR^H)-O-, -O-PO(OCH₂CH₂S-R)-O-, -O-PO(BH₃)-O-, -O-PO(NHR^H)-O-, -O-P(O)₂-NR^H-, -NR^H-P(O)₂-O-, -NR^H-CO-O-, -NR^H-CO-NR^H-, y/o el enlace entre nucleósidos puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de: -O-CO-O-, -O-CO-NR^H-, -NR^H-CO-CH₂-, -O-CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-, -CO-NR^H-CH₂-, -CH₂-NR^H-CO-, -O-CH₂-CH₂-S-, -S-CH₂-CH₂-O-, -S-CH₂-CH₂-S-, -CH₂-SO₂-CH₂-, -CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-CO-, -CH₂-NCH₃-O-CH₂-, en los que R^H se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C₁₋₄.

30 Los grupos terminales se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, prot-O-, act-O-, mercapto, prot-S-, act-S-, alquiltio C₁₋₆, amino, prot-N(R^H)-, act-N(R^H)-, mono- o di-(alquilo C₁₋₆)amino, alcoxi C₁₋₆ opcionalmente sustituido, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, alqueno C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquenoilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquinoilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquinoilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, monofosfato, monotiofosfato, difosfato, ditiofosfato, trifosfato, tritiofosfato, intercalantes de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos informadores, ligandos, carboxi, sulfono, hidroximetilo, prot-O-CH₂-, act-O-CH₂-, aminometilo, prot-N(R^H)-CH₂-, act-N(R^H)-CH₂-, carboximetilo, sulfonometilo, en los que Prot es un grupo de protección para -OH, -SH y -NH(R^H), respectivamente, Act es un grupo de activación para -OH, -SH y -NH(R^H), respectivamente, y R^H se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C₁₋₆.

40 Los grupos de protección de los sustituyentes hidroxilo comprende tritilo sustituido, tal como 4,4'-dimetoxitritiloxi (DMT), 4-monometoxitritiloxi (MMT) y tritiloxi, 9-(9-fenil)xanteniloxi (pixilo) opcionalmente sustituido, metoxitetrahidropiranioloxi (mthp) opcionalmente sustituido, sililoxi, tal como trimetilsililoxi (TMS), triisopropilsililoxi (TIPS), terc-butildimetilsililoxi (TBDMS), trietilsililoxi y fenildimetilsililoxi, terc-butil-éteres, acetales (incluyendo dos grupos hidroxilo), aciloxi, tal como acetilo o acetilos sustituidos con halógenos, por ejemplo cloroacetiloxi o fluoroacetiloxi, isobutiriloxi, pivaloiloxi, benzoiloxi y benzoilos sustituidos, metoximetiloxi (MOM), éteres bencilicos o bencil-éteres sustituidos, tales como 2,6-diclorobenciloxi (2,6-Cl₂Bzl). Alternativamente, en el caso de que Z o Z* sea hidroxilo, pueden protegerse mediante la unión a un soporte sólido, opcionalmente mediante un conector.

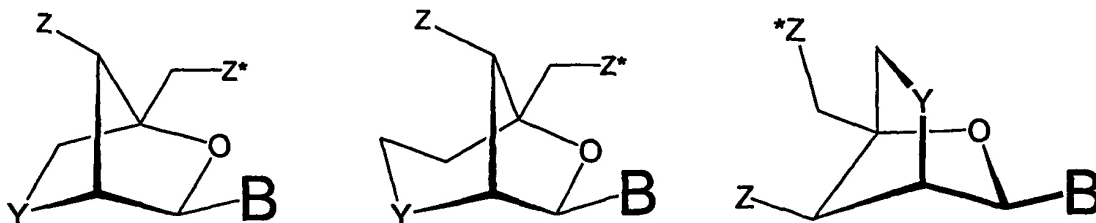
50 En la realización anteriormente indicada, act se refiere a un grupo de activación para -OH, -SH y -NH(R^H), respectivamente. Dichos grupos de activación se seleccionan, por ejemplo, de entre O-fosforamidita opcionalmente sustituida, O-fosforotriéster opcionalmente sustituido, O-fosforodiéster opcionalmente sustituido, H-fosfonato opcionalmente sustituido y O-fosfonato opcionalmente sustituido.

55 En el presente contexto, el término "fosforamidita" se refiere a un grupo de fórmula -P(OR^X)-N(R^Y)₂, en la que R^X se refiere a un grupo alquilo opcionalmente sustituido, por ejemplo metilo, 2-cianoetilo o bencilo, y cada R^Y se refiere a grupos alquilo opcionalmente sustituidos, por ejemplo etilo o isopropilo, o el grupo -N(R^Y)₂ forma un grupo morfolino (-N(CH₂CH₂)₂O). R^X preferentemente se refiere a 2-cianoetilo y los dos R^Y preferentemente son idénticos y se refieren a isopropilo. De esta manera, una fosforamidita especialmente relevante es N,N-diisopropil-O-(2-cianoetil)-fosforamidita.

60 B constituye una nucleobase natural o no natural y se selecciona de entre adenina, citosina, 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, guanina, timina, uracilo, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 5-propinil-6-fluorouracilo, 5-metiltiliazoluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina, 7-propín-7-deaza-adenina, 7-propín-7-

deaza-guanina y 2-cloro-6-aminopurina. En algunas realizaciones, el ácido nucleico bloqueado (ANB) utilizado en el compuesto oligomérico de la invención comprende nucleobases que son nucleobases modificadas seleccionadas de entre el grupo que consiste de 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina.

5 Preferentemente, el ácido nucleico bloqueado (ANB) utilizado en el compuesto oligomérico, tal como un oligonucleótido antisentido, de la invención, comprende por lo menos un nucleótido que comprende una unidad de ácido nucleico bloqueado (ANB) según cualquiera de las fórmulas siguientes:



Esquema 2

10 en las que Y es -O-, -S-, -NH- o N(R^H); Z y Z* se seleccionan independientemente de entre un enlace entre nucleósidos, un grupo terminal o un grupo protector, y B constituye una nucleobase natural o no natural.

Los monómeros de ANB y su preparación se describen en el documento n° WO 99/14226 y las solicitudes posteriores n° WO 00/56746, n° WO 00/56748, n° 00/66604, n° 00/125248, n° WO 02/28875, n° WO 2002/094250 y n° WO 2003/006475. Un ejemplo particular de un monómero timidín-ANB es (1S,3R,4R,7S)-7-hidroxi-1-hidroximetil-5-metil-3-(timinil)-2,5-dioxa-biciclo[2.2.1]heptano.

En el Esquema 3 se muestran unidades ANB específicamente preferentes, en el que B y Z* y Z son tal como se ha definido anteriormente y en el que R^H se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C₁₋₄.

20 En una realización, el análogo de nucleótido es un monómero pirén-2'-amino-ANB o un monómero adamantil-2-amino-ANB.

Además de monómeros de ANB (por ejemplo alfa-L-ANB, tio-ANB, amino-ANB, ENA), entre otros análogos de nucleótido que pueden utilizarse se encuentran aquellos que no alteran la configuración de forma A del complejo de ARN_p o aquellos que de hecho fomentan la configuración de forma A. En una realización pueden utilizarse ácidos nucleicos HNA-hexitol, por ejemplo como el único análogo de nucleótido o conjuntamente con nucleótidos de ANB.

30 En una realización preferente, el complejo de ARN comprende enlaces fosforotioato.

Son análogos de nucleótido preferentes de la invención, los análogos de nucleótido seleccionados de entre el grupo de monómeros 2'-O-alkil-R, los monómeros de 2'-amino-ADN, los monómeros de 2'-fluoro-ADN, los monómeros de ANB y los monómeros de INA.

35 En una realización, la cadena pasajera, tal como la primera y/o la segunda moléculas de ARN, comprende uno o más monómeros de ANB (análogos de nucleótido).

En una realización, la cadena antisentido comprende uno o más monómeros de ANB (análogos de nucleótido).

40 En una realización, el complejo de ARN de la invención presenta efectos inespecíficos reducidos en comparación con los complejos de ARN nativos con una cadena pasajera continua, tal como se ha indicado de manera general anteriormente en la memoria.

45 En otra realización, el complejo de ARN de la invención presenta una respuesta inmunológica reducida en comparación con los complejos de ARN nativos con una cadena pasajera continua.

En todavía otra realización, los complejos de ARN de la invención presentan un efecto prolongado en comparación con los complejos de ARN nativos con una cadena pasajera continua. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en un una realización preferente, el efecto de los complejos de ARN de la invención resulta eficaz para un periodo de tiempo más prolongado que con los complejos de ARN nativos con una cadena pasajera continua.

50 En todavía otra realización, los complejos de ARN de la invención presentan un efecto incrementado en comparación con los complejos de ARN nativos con una cadena pasajera continua. De acuerdo con lo anterior, en

una realización preferente, el complejo de ARN media en el ARNi más eficazmente que el complejo de ARN antivo, por ejemplo mediante una degradación más eficiente del ARNm diana o mediante una inhibición de la traducción más eficiente del ARNm diana.

5 Otro aspecto de la invención es un método para preparar el complejo de ARN de la invención, que comprende incubar la cadena antisentido con la cadena pasajera bajo condiciones en las que se forma un complejo de ARN que comprende una región nuclear de doble cadena, siendo capaz dicho complejo de ARN de mediar en la interferencia de ARN de dicho ARN celular correspondiente.

10 En todavía otro aspecto, los complejos de ARN de la invención pueden utilizarse en un método de mediación de la modificación de los ácidos nucleicos de un ácido nucleico diana en una célula u organismo, que comprende las etapas siguientes:

- 15 a. poner en contacto una célula u organismo con el complejo de ARN de la invención bajo condiciones en las que puede producirse la modificación de un ácido nucleico diana,
b. mediando de esta manera en la modificación de un ácido nucleico diana.

En una realización, el método de mediación de la modificación de ácidos nucleicos de un ácido nucleico diana se lleva a cabo in vitro (aunque todavía dentro de la célula).

20 En una realización, el método de mediación de la modificación de ácidos nucleicos de un ácido nucleico diana se lleva a cabo in vivo (en un organismo).

En todavía otra realización, el método se lleva a cabo en una célula aislada.

25 En una realización preferente, la modificación de ácidos nucleicos del método es interferencia de ARN, preferentemente la degradación del ARNm diana o la inhibición de la traducción del ARNm diana o la inhibición de otros tipos de ARN, por ejemplo ARN no codificante.

30 En otra realización, la modificación del ácido nucleico diana es la metilación del ADN.

Otro aspecto de los complejos de ARN de la invención puede utilizarse en un método de examen de la función de un gen en una célula u organismo, que comprende:

35 a. introducir un complejo de ARN de la invención con diana en el ARN codificado por el gen, tal como un ARNm u otro ARN funcional, para la degradación o el silenciamiento, en la célula u organismo, produciendo de esta manera una célula de ensayo u organismo de ensayo, produciendo de esta manera una célula de ensayo u organismo de ensayo.

b. El mantenimiento de la célula de ensayo u organismo de ensayo bajo condiciones en las que se produce la degradación o el silenciamiento del ARN codificado por el gen, produciendo de esta manera una célula de ensayo u organismo de ensayo en el que los niveles de ARN del gen se encuentran reducidos.

40 c. Observación del genotipo de la célula u organismo de ensayo producido en la etapa b., y opcionalmente la comparación del fenotipo observado con el fenotipo de una célula de control u organismo de control apropiado, proporcionando de esta manera información sobre la función del gen.

45 El complejo de ARN de la invención puede introducirse en las células, por ejemplo mediante transfección, tal como se indica de manera general en los ejemplos adjuntos.

El fenotipo del organismo o célula puede observarse utilizando, por ejemplo, proteómica para evaluar los niveles de proteína, o utilizando micromatrices para evaluar los niveles de ARNm. También puede utilizarse un fenotipo más definido, por ejemplo la expresión de un gen particular.

50 La información obtenida sobre la función de un gen puede utilizarse para determinar si un producto génico es una diana adecuada para la intervención terapéutica en relación a una enfermedad particular. De esta manera, en el caso de que se demuestra que un determinado producto génico actúa en una determinada ruta bioquímica que es conocido que resulta afectada en, por ejemplo, un subtipo específico de cáncer, el producto génico podría ser una diana adecuada para la intervención terapéutica para el tratamiento del subtipo anteriormente indicado de cáncer.

55 En una realización preferente del método de examen de la función de un gen en una célula u organismo, las modificaciones de ácidos nucleicos del método son la interferencia de ARN, la degradación preferente del ARNm diana o la inhibición de la traducción del ARNm diana.

60 En otra realización, la modificación del ácido nucleico es la metilación del ADN.

En realizaciones preferentes del método de examen de la función de un gen en una célula u organismo, el método se lleva a cabo in vitro.

En todavía otra realización, el método se lleva a cabo en una célula aislada.

5 Otro aspecto de los complejos de ARN de la invención puede utilizarse en un método de evaluación de si un agente actúa sobre un producto génico, comprendiendo las etapas siguientes:

a. introducción del complejo de ARN de la invención correspondiente a dicho gen en una célula u organismo, produciendo de esta manera una célula de ensayo u organismo de ensayo,

10 b. mantenimiento de la célula de ensayo u organismo de ensayo bajo condiciones en las que se produce la modificación de un ácido nucleico diana,

c. introducción del agente en la célula de ensayo u organismo de ensayo,

15 d. Observación del genotipo de la célula u organismo de ensayo producido en la etapa c., y opcionalmente la comparación del fenotipo observado con el fenotipo de una célula de control u organismo de control apropiado, proporcionando de esta manera información sobre si el agente actúa sobre el producto génico.

Un control preferente en la etapa d. es una célula de ensayo u organismo de ensayo en el que no se ha introducido el complejo de ARN de la etapa a.

20 En una realización preferente del método de evaluación de si un agente actúa sobre un gen o producto génico, las modificaciones de ácidos nucleicos del método son la interferencia de ARN, la degradación preferente del ARNm diana o la inhibición de la traducción del ARNm diana. En otra realización, la modificación del ácido nucleico es la metilación del ADN.

25 En todavía otra realización, el método se llevó a cabo en una célula aislada.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de preparación de un complejo de ARN que comprende incubar una cadena antisentido tal como se indica en la presente memoria con por lo menos dos moléculas de ARN que forman una cadena pasajera discontinua tal como se indica en la presente memoria, y opcionalmente moléculas de ARN adicionales de la cadena pasajera tal como se indica en la presente memoria, bajo condiciones en las que se forma un complejo de ARN que comprende una región nuclear de doble cadena. Convenientemente, dicho complejo de ARN es capaz de mediar en la interferencia de ARN de un ARN celular correspondiente.

35 En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de preparación de una composición farmacéutica que comprende un complejo de ARN, que comprende incubar una cadena antisentido tal como se indica en la presente memoria con por lo menos dos moléculas de ARN que forman una cadena pasajera discontinua tal como se indica en la presente memoria, y opcionalmente moléculas de ARN adicionales de la cadena pasajera tal como se indica en la presente memoria, bajo condiciones en las que se forma un complejo de ARN que comprende una región nuclear de doble cadena, siendo capaz dicho complejo de ARN de mediar en la interferencia de ARN de un ARN celular correspondiente, en el que dicha incubación se produce dentro de un diluyente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable, o dicho complejo de ARN se mezcla posteriormente con un diluyente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

45 La invención proporciona la utilización de un complejo de ARN tal como se define en la presente memoria, a modo de medicamento.

La invención proporciona la utilización de un complejo de ARN tal como se define en la presente memoria, a modo de medicamento para el tratamiento del cáncer.

50 La invención proporciona la utilización de un complejo de ARN tal como se define en la presente memoria, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.

55 Todavía otro aspecto de la invención es el complejo de ARN y un diluyente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable (es decir, la invención se refiere a una composición farmacéutica o a una composición terapéutica que comprende el complejo de ARN según la invención). Resultará evidente para el experto en la materia que los complejos de ARN de la invención pueden diseñarse con diana en genes y productos génicos específicos. Debe entenderse que los complejos de ARN tendrán diana en una secuencia de ADN o secuencia de ARN y no en una proteína. Sin embargo, el nivel de un producto génico, tal como una proteína, resultará afectado indirectamente, en el caso de que su ARNm resulte modificado, por ejemplo mediante degradación del ARNm o inhibición de la traducción. Además, puede resultar afectada la expresión del gen codificante de la proteína, por ejemplo debido a la metilación del ADN.

60

De esta manera, otro aspecto es el complejo de ARN de la invención para la utilización a modo de medicamento. Tras validar una diana terapéutica, el experto en la materia podrá diseñar complejos de ARN que afectarán al nivel y actividad de la diana, debido a que la especificidad de los complejos de ARN se encuentra exclusivamente en la secuencia de la cadena antisentido. Para los complejos de ARN nativos con una cadena pasajera continua, sigue existiendo el problema de los efectos inespecíficos debido a que la cadena pasajera actúa como secuencia guía.

Composición farmacéutica

Pueden encontrarse directrices para la preparación de composiciones farmacéuticas en: "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", de Alfonso R. Gennaro, y a continuación.

Preferentemente, el compuesto de la invención se incluye en una formulación unitaria tal como en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable, en una cantidad suficiente para administrar en un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz sin provocar efectos secundarios graves en el paciente tratado. Sin embargo, en algunas formas de terapia, pueden resultar aceptables efectos secundarios graves en términos de garantizar un resultado positivo del tratamiento terapéutico.

La dosis de la composición farmacéutica es dependiente de la gravedad y sensibilidad del estado de enfermedad que debe tratarse, y el curso de tratamiento dura entre varios días y varios meses, o hasta que se consigue la curación o la disminución del estado de enfermedad. Pueden calcularse los programas de administración óptimos para mediciones de la acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Las dosis óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los oligonucleótidos individuales. Generalmente puede estimarse basándose en las EC_{50} que se ha observado que resultan eficaces en modelos animales in vitro e in vivo. En general, la dosis es de entre 0,01 mg y 1 g por kg de peso corporal, y puede administrarse una o más veces al día, semana, mes o año, o incluso una vez cada 2 a 10 años, o mediante infusión continua durante horas hasta durante varios meses. Las tasas de repetición para la administración pueden estimarse basándose en los tiempos de residencia medidos y las concentraciones del fármaco en los líquidos o tejidos corporales. Tras el tratamiento con éxito, puede resultar deseable someter al paciente a terapia de mantenimiento para evitar la recurrencia del estado de enfermedad.

El fármaco formulado puede comprender agentes de unión y adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Las cápsulas, tabletas y píldoras, etc. pueden contener, por ejemplo, los compuestos siguientes: celulosa microcristalina, goma o gelatina como ligantes; almidón o lactosa como excipientes; estearatos como lubricantes; y diversos agentes edulcorantes o saborizantes. Para las cápsulas, la unidad de administración puede contener un portador líquido, tal como aceites grasos. De manera similar, los recubrimientos de azúcar o agentes entéricos pueden ser parte de la unidad de administración. Las formulaciones de oligonucleótidos también pueden ser emulsiones de los ingredientes farmacéuticos activos y lípidos que forman una emulsión micelar.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de varias maneras, dependiendo de si se desea el tratamiento local o sistémico y del área que debe tratarse. La administración puede ser: (a) oral, (b) pulmonar, por ejemplo mediante inhalación o insuflado de polvos o aerosoles, incluyendo mediante nebulizador; intratraqueal o intranasal, (c) tópica, incluyendo epidérmica, transdérmica, oftálmica y en membranas mucosas, incluyendo la administración vaginal y rectal, o (d) parenteral, incluyendo intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal, o inyección o infusión intramuscular, o intracraneal, por ejemplo intratecal o intraventricular. En una realización, el oligo activo se administra por vía i.v., i.p., oral, tópica o en forma de una inyección de bolo o se administra directamente en el órgano diana.

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, sprays, supositorios, líquidos y polvos. Pueden resultar necesarios o deseables portadores farmacéuticos convencionales, bases acuosas, polvos o aceitosas, espesantes y similares. Entre las formulaciones tópicas preferentes se incluyen aquellas en las que los oligonucleótidos de la invención se encuentran en mezcla con un agente de administración tópica, tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácido graso, esteroides, agentes quelantes y surfactantes. Entre las composiciones y formulaciones para la administración oral se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, tabletas o minitables. Entre las composiciones y formulaciones para la administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluirse las soluciones acuosas estériles, que pueden contener además tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados, tales como, aunque sin limitarse a ellos, intensificadores de la penetración, compuestos portadores y otros portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Entre las composiciones farmacéuticas de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una diversidad de componentes, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes. La administración de fármaco en el tejido tumoral puede

incrementarse mediante la administración mediada por portador, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, liposomas catiónicos, ciclodextrinas, derivados de porfirina, dendrímeros de cadena ramificada, polietilenimina, polímeros, nanopartículas y microesferas (Dass C.R., J Pharm Pharmacol 54(1):3-27, 2002). Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse convenientemente en forma de administración unitaria, pueden prepararse siguiendo técnicas convencionales bien conocidas de la industria farmacéutica. Entre dichas técnicas se incluyen la etapa de asociar los ingredientes activos con el portador o portadores o excipiente o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima los ingredientes activos con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos, o ambos, y después, en caso necesario, conformando el producto.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse en cualquiera de entre muchas formas de administración posibles, tales como, aunque sin limitarse a ellas, tabletas, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos y supositorios. Las composiciones de la presente invención también pueden formularse en forma de suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión puede contener además estabilizadores.

Para la administración parenteral, subcutánea, intradérmica o tópica, la formulación puede incluir un diluyente estéril, tampones, reguladores de la tonicidad y antibacterianos. El compuesto activo puede prepararse con portadores que protegen frente a la degradación o la eliminación inmediata del cuerpo, incluyendo implantes o microcápsulas con propiedades de liberación controlada. Para la administración intravenosa los portadores preferentes son solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato.

Puede mezclarse un complejo de ARN de la invención con cualquier material que no altere la acción deseada, o con un material que complemente la acción deseada. Entre ellos podrían incluirse otros fármacos, incluyendo otros compuestos nucleósidos.

Opcionalmente el farmacéutico según la invención comprende agentes terapéuticos, tales como compuestos antisentido adicionales, compuestos quimioterapéuticos, compuestos antiinflamatorios, compuestos antivíricos y/o compuestos inmunomoduladores. También pueden combinarse en composiciones de la invención fármacos antiinflamatorios, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, fármacos y corticoesteroides antiinflamatorios no esteroideos, fármacos antivíricos y fármacos inmunomoduladores.

Pueden utilizarse dos o más compuestos agrupados, conjuntamente o secuencialmente, es decir, el compuesto (complejo de ARN) según la invención puede utilizarse antes, durante o después de uno o más de los otros agentes terapéuticos a los que se hace referencia en la presente memoria.

Los oligonucleótidos utilizados en los complejos de ARN según la invención también pueden conjugarse además con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo aspirina, ibuprofeno, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

En una realización, la composición farmacéutica según la invención comprende además por lo menos un agente quimioterapéutico. Dicho agente quimioterapéutico preferentemente se selecciona de entre el grupo que consiste de adrenocorticoesteroides, tales como prednisona, dexametasona o decadron, altretamina (hexalén, hexametilmelamina (HMM)), amifostina (etioli), aminoglutetimida (Cytadren), amsacrina (M-AMSA), anastrozol (Arimidex), andrógenos tales como testosterona, asparaginasa (Elspar), Bacillus calmette-Guerin, bicalutamida (Casodex), bleomicina (blenoxano), busulfán (Myleran), carboplatino (paraplatino), carmustina (BCNU, BiCNU), clorambucilo (Leukeran), clorodesoxiadenosina (2-CDA, cladribina, leustatina), cisplatino (platinol), citosina arabinósido (citarabina), dacarbazina (DTIC), dactinomicina (actinomicina D, cosmegen), daunorrubicina (cerubidina), docetaxel (taxotere), doxorubicina (adriomicina), epirubicina, estramustina (Emcyt), estrógenos, tales como dietilestilbestrol (DES), etopósido (VP-16, VePesid, etopofos), fludarabina (fludara), flutamida (eulexina), 5-FUDR (floxuridina), 5-fluorouracilo (5-FU), gemcitabina (Gemzar), goserelina (Zodalex), herceptina (trastuzumab), hidroxiaurea (Hydrea), idarrubicina (idamicina), ifosfamida, IL-2 (proleuquina, aldesleuquina), interferón-alfa (intrón A, roferón A), irinotecán (Camptosar), leuprólido (Lupron), levamisol (Ergamisol), lomustina (CCNU), mecloratamina (mustargeno, mostaza nitrogenada), melfalán (Alkeran), mercaptopurina (purinetol, 6-MP), metotrexato (mexato), mitomicina C (mutamucina), mitoxantrona (novantrona), octeótidio (sandostatina), pentostatina (2-desoxicoformicina, nipent), plicamicina (mitracina), prorocarbazina (matulano), estreptozocina, tamoxifina (nolvadex), taxol (paclitaxel), tenipósido (vumon, VM-26), tiotepa, topotecán (hycamtin), tretinoína (vesanoide, ácido retinoico todo-trans, vinblastina (valban), vincristina (oncovina) y vinorelbina (navelbina).

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen: (a) uno o más complejos de ARN tal como se indica en la presente memoria, y (b) otro u otros agentes quimioterapéuticos que funcionan mediante un mecanismo no antisentido. Utilizados con los compuestos (complejos

de ARN) de la invención, dichos agentes quimioterapéuticos pueden utilizarse individualmente (por ejemplo mitramicina y oligonucleótido), secuencialmente (por ejemplo mitramicina y oligonucleótido durante un periodo de tiempo, seguido de otro agente y oligonucleótido) o en combinación con otro u otros de dichos agentes quimioterapéuticos o en combinación con radioterapia. Todos los agentes quimioterapéuticos conocidos por el experto en la materia se incorporan en la presente memoria como tratamientos de combinación con compuesto según la invención.

En otra realización, las composiciones de la invención pueden contener uno o más complejos de ARN con diana en un primer ácido nucleico y uno o más compuestos adicionales, tales como oligonucleótidos antisentido con diana en un segundo ácido nucleico diana. Pueden utilizarse dos o más compuestos agrupados, conjuntamente o secuencialmente, es decir, el compuesto según la invención puede utilizarse antes, durante o después de uno o más de los otros agentes terapéuticos a los que se hace referencia en la presente memoria.

La composición farmacéutica de la invención puede constituir un profármaco. Por lo tanto, en una realización de la invención, el complejo de ARN de la invención puede encontrarse en forma de un profármaco. Los oligonucleótidos son iones cargados negativamente. Debido a la naturaleza lipofílica de las membranas celulares, la incorporación celular de los oligonucleótidos se encuentra reducida en comparación con equivalentes neutros o lipofílicos. Este "impedimento" de la polaridad puede evitarse mediante la utilización del enfoque de profármaco (ver, por ejemplo, Crooke R.M., 1998, en: Crooke S.T. Antisense Research and Application, Springer-Verlag, Berlin, Alemania, vol. 131, páginas 103-140). En dicho enfoque, los oligonucleótidos se preparan de una manera protegida, de manera que el oligo es neutro al administrarlo. Estos grupos de protección se diseñan de manera que puedan eliminarse al ser incorporado el oligo por las células. Son ejemplos de dichos grupos de protección, S-acetiltioetilo (SATE) o S-pivaloiltioetilo (t-butil-SATE). Dichos grupos de protección son resistentes a nucleasas y son eliminados selectivamente dentro de la célula.

Preferentemente la composición farmacéutica de la invención comprende además compuestos antiinflamatorios y/o compuestos antivíricos.

Conjugados

En una realización de la invención, uno o más de los oligonucleótidos que forman el complejo de ARN pueden unirse a ligandos/conjugados, los cuales pueden utilizarse, por ejemplo, para incrementar la incorporación celular del complejo de ARN. Dicha conjugación puede tener lugar en las posiciones terminales 5'/3'-OH, aunque los ligandos también pueden en los azúcares y/o las bases. Debido a que el complejo de ARN según la invención típicamente comprende más terminales (debido a la cadena pasajera discontinua), existen más sitios con los que conjugar fracciones que incrementan la incorporación química.

En una realización preferente, por lo menos una de las moléculas que forma el complejo de ARN, preferentemente la primera, segunda y/o moléculas adicionales de ARN que forman la cadena pasajera se conjugan con una fracción que mejora la incorporación in vivo del complejo de ARN, tal como el colesterol (ver Soutschek et al., Nature 432(11):173-178).

En una realización, el factor de crecimiento con el que puede conjugarse el oligonucleótido, puede comprender transferrina o folato. Los complejos de transferrina-polilisina, oligonucleótido o los complejos de folato-polilisina-oligonucleótido pueden prepararse para la incorporación por las células que expresan niveles elevados de receptor de transferrina o folato. Otros ejemplos de conjugados/ligandos son las fracciones de colesterol, intercalantes de dúplex tales como acridina, poli-L-lisina, "adición terminal de caperuzas" con uno o más grupos de unión resistentes a nucleasas, tales como fosfomonotioato y similares.

La invención proporciona además un conjugado que comprende el complejo de ARN según la invención tal como se indica en la presente memoria y por lo menos una fracción no nucleótida o no polinucleótida unida covalentemente a dicho complejo.

En una realización preferente, la composición farmacéutica según la invención comprende un agente de administración de ácidos nucleicos, es decir, un agente que potencia la incorporación y distribución del agente terapéutico dentro del cuerpo. Entre los agentes de administración preferentes se incluyen el quitosano, que es conocido que es un agente muy bueno que se une a ácidos nucleicos, de baja toxicidad y que típicamente resulta bien tolerado en el cuerpo. Se cree que minimiza la carga del nucleótido, permitiendo de esta manera una mejor incorporación. Un agente de administración alternativo que puede utilizarse, opcionalmente con otros agentes, tales como el quitosano, incluye la polietilenimina. De esta manera, las formulaciones del complejo de ARN y los agentes de administración son una realización preferente de la invención. Dichas realizaciones pueden combinarse con las realizaciones de conjugación indicadas anteriormente, por ejemplo la incorporación de un terminal, tal como

mediante la incorporación de una nucleobase conjugada con colesterol 3'-terminal durante la síntesis del oligonucleótido.

Dianas terapéuticas adecuadas

5

Meramente a título de ejemplo se indican las siguientes.

10

ApoB: tal como se indica en el documento nº WO 2007/031081, el ARNm de ApoB es una diana adecuada para la intervención terapéutica, por ejemplo para el tratamiento de, por ejemplo, aterosclerosis, hipercolesterolemia o hiperlipidemia.

15

Survivina: tal como se indica en el documento nº WO 2006/050732, el ARNm de la survivina es una diana adecuada para la intervención terapéutica, por ejemplo para el tratamiento de, por ejemplo, el cáncer. Hif-1-alfa: tal como se indica en el documento nº WO 2006/050734, el ARNm de Hif-1-alfa es una diana adecuada para la intervención terapéutica, por ejemplo para el tratamiento de, por ejemplo, enfermedades de cáncer, enfermedades inflamatorias y enfermedades del ojo, tales como el cáncer: mieloma múltiple, cáncer renal, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer cerebral y cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer renal, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer cerebral y cáncer de mama, otros: aterosclerosis, soriasis, retinopatía diabética, degeneración macular, artritis reumatoide, asma, enfermedad intestinal inflamatoria, verrugas, dermatitis alérgica, inflamación e inflamación de la piel.

20

Bcl2: tal como se indica en el documento nº WO 2005/061710, el ARNm de Bcl2 es una diana adecuada para la intervención terapéutica, por ejemplo para el tratamiento de, por ejemplo, el cáncer, tal como un cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste de leucemia mielocítica aguda, linfoma difuso de las células B, leucemia linfocítica aguda, cáncer hepático, cáncer renal, cáncer del tracto urinario y cáncer colorrectal.

25

P21-Ras: tal como se indica en el documento nº PCT/DK2006/000512, los ARNm de p21ras, tales como K-ras, Haras y N-ras son dianas adecuadas para la intervención terapéutica, por ejemplo para el tratamiento del cáncer, tales como tumores sólidos, carcinoma, sarcoma o glioma.

30

A título de ejemplo, las dianas y condiciones anteriormente indicadas pueden ser dianas de las composiciones farmacéuticas según la invención.

Se indican realizaciones adicionales que pueden combinarse con otras realizaciones de la invención dadas a conocer en la presente memoria:

35

1. Un complejo de ARN capaz de mediar en la interferencia del ARN, que comprende una región nuclear de doble cadena de entre 15 y 40 pares de bases, comprendiendo dicha región nuclear de doble cadena una cadena antisentido y una cadena pasajera discontinua que se hibrida con la cadena antisentido, en la que la discontinuidad en la cadena pasajera es una muesca, o un hueco de 1 o 2 nucleótidos, y en la que el complejo de ARN comprende análogos de nucleótido de ANB que incrementan la temperatura de fusión de la región nuclear de doble cadena y en la que la cadena pasajera discontinua comprende una primera y una segunda moléculas de ARN que conjuntamente forman la cadena pasajera discontinua.

40

2. Un complejo de ARN según la reivindicación 1, en el que dicha modificación de ácido nucleico se selecciona de entre el grupo de interferencia de ARN y metilación de ADN.

45

3. Un complejo de ARN según la realización 2, en el que la interferencia de ARN media en la degradación de un ARN diana o la inhibición de la traducción de un ARN diana o una combinación de ambas.

4. Un complejo de ARN según la realización 1, en el que la región nuclear de doble cadena comprende un número de pares de bases de entre 15 y 40.

50

5. Un complejo de ARN según la realización 4, en el que la región nuclear de doble cadena comprende un número de pares de bases seleccionado de entre el grupo de 18 pares de bases, 19 pares de bases, 20 pares de bases, 21 pares de bases, 22 pares de bases y 23 pares de bases.

6. Un complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones 1 a 5, que comprende un extremo protuberante.

7. Un complejo de ARN según la realización 6, que comprende dos extremos protuberantes.

8. Un complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones 6 y 7, en el que la cadena antisentido comprende un extremo 3'-protuberante.

55

9. Un complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones 6 y 7, en el que la cadena pasajera comprende un extremo 3'-protuberante.

10. Un complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones 6 a 9, en el que la longitud del extremo protuberante es de entre 1 y 8 nucleótidos.

60

11. Un complejo de ARN según la realización 10, en el que la longitud del extremo protuberante se selecciona de entre el grupo de extremos protuberantes con una longitud de 1 nucleótido, 2 nucleótidos y 3 nucleótidos.

12. Un complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones 1 a 6, que comprende por lo menos un extremo romo.

13. Un complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones 1 a 5, en el que el complejo de ARN presenta ambos extremos romos.
14. Un complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones 1 a 5, en el que la región nuclear de doble cadena comprende 18 a 22 pares de bases, y en el que la cadena antisentido y la cadena pasajera comprenden, cada una, un extremo 3'-protuberante de 1 a 3 nucleótidos.
15. Un complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la cadena pasajera discontinua comprende una primera y una segunda moléculas de ARN, que conjuntamente forman la cadena pasajera discontinua, en la que la primera molécula de ARN se hibrida con la parte posterior de la cadena antisentido y la segunda molécula de ARN se hibrida con la parte anterior de la cadena antisentido.
16. Un complejo de ARN según la realización 15, en el que la primera y la segunda moléculas de ARN se encuentran separadas por una muesca.
17. Un complejo de ARN según la realización 15, en el que la primera y la segunda moléculas de ARN se encuentran separadas por un hueco, seleccionado de entre: un hueco de 1 nucleótido, un hueco de 2 nucleótidos, un hueco de 3 nucleótidos, un hueco de 4 nucleótidos, un hueco de 5 nucleótidos, un hueco de 6 nucleótidos, un hueco de 7 nucleótidos, un hueco de 8 nucleótidos, un hueco de 9 nucleótidos, un hueco de 10 nucleótidos, un hueco de 11 nucleótidos y un hueco de 12 nucleótidos.
18. Un complejo según las realizaciones 15 a 17, en el que la primera molécula de ARN se encuentra conectada a la cadena antisentido mediante un conector.
19. Un complejo de ARN según las realizaciones 15 a 17, en el que la segunda molécula de ARN se encuentra conectada a la cadena antisentido mediante un conector.
20. Un complejo de ARN según las realizaciones 18 y 19, en el que la primera molécula de ARN se encuentra conectada a la cadena antisentido mediante un primer conector y la segunda molécula de ARN se encuentra conectada a la cadena antisentido mediante un segundo conector.
21. Un complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones 15 a 20, en el que la primera y la segunda moléculas de ARN se encuentran separadas por un conector.
22. Un complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones 15 a 21, en el que un conector no es un conector de ARN de cadena sencilla.
23. Un complejo de ARN según la realización 15, en el que la primera y la segunda moléculas de ARN no se encuentran unidas de manera que el complejo de ARN comprende tres moléculas individuales de ARN, es decir, la cadena antisentido, y la primera y la segunda moléculas de ARN que forman conjuntamente la cadena pasajera discontinua.
24. Un complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones 15 a 23, en el que la cadena pasajera discontinua presenta una discontinuidad en una posición seleccionada de entre el grupo de: la posición 3, la posición 4, la posición 5, la posición 6, la posición 7, la posición 8, la posición 9, la posición 10, la posición 11, la posición 12, la posición 13, la posición 14, la posición 15, la posición 16, la posición 17, la posición 18, la posición 19, la posición 20, la posición 21, la posición 22, la posición 23, la posición 24 y la posición 25, en la que la posición se cuenta, en la dirección 5' a 3', desde el primer nucleótido de la cadena pasajera de bases apareadas con la cadena antisentido de la cadena pasajera.
25. Un complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que los extremos 5' del complejo se encuentran fosforilados o disponibles para la fosforilación.
26. Un complejo de ARN según la realización 15, en el que la primera molécula de ARN comprende un fosfato en el extremo 5' y un grupo 3'-hidroxi.
27. Un complejo de ARN según la realización 15, en el que la segunda molécula de ARN comprende un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo 3'-hidroxi.
28. Un complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el complejo de ARN comprende análogos de nucleótido.
29. Un complejo de ARN según la realización 28, en el que la cadena antisentido comprende análogos de nucleótido.
30. Un complejo de ARN según la realización 28, en el que la cadena pasajera comprende análogos de nucleótido.
31. Un complejo de ARN según las realizaciones 28 a 30, en el que la primera y la segunda moléculas de ARN de la cadena pasajera comprenden nucleótidos de análogo.
32. Un complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones 28 a 31, en el que los análogos de nucleótido se seleccionan de entre el grupo de monómeros 2'-O-alkil-ARN, los monómeros de 2'-amino-ADN, los monómeros de 2'-fluoro-ADN, los monómeros de ANB, los monómeros de ANP y los monómeros de INA.
33. Un complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones 1 a 32, que presenta efectos inespecíficos reducidos en comparación con un complejo de ARN nativo que comprende una cadena pasajera no modular.
34. Un complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones 1 a 32, que produce una respuesta inmunológica reducida en comparación con un complejo de ARN nativo que comprende una cadena pasajera no modular.
35. Un complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones 1 a 32, que presenta un efecto prolongado sobre los ácidos nucleicos diana en comparación con un complejo de ARN que comprende una cadena pasajera no modular.
36. Un complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones 1 a 32, que presenta un efecto incrementado sobre los ácidos nucleicos diana en comparación con un complejo de ARN que comprende una cadena pasajera no modular.

37. Un método para preparar el complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones 1 a 36, que comprende incubar la cadena antisentido con la cadena pasajera bajo condiciones en las que se forma un complejo de ARN que comprende una región nuclear de doble cadena, siendo capaz dicho complejo de ARN de mediar en la interferencia de ARN de un ARN celular correspondiente.
- 5 38. Método in vitro de mediar en modificaciones de ácido nucleico de un ácido nucleico diana en una célula o un organismo, que comprende las etapas siguientes:
- a. poner en contacto una célula u organismo con el complejo de ARN según cualquiera de la realizaciones 1 a 36 bajo condiciones en las que puede producirse modificaciones específicamente de ácidos nucleico diana,
- 10 b. mediando de esta manera una modificación de un ácido nucleico diana guiada por la cadena antisentido del complejo de ARN.
39. Un método según la realización 38, llevando a cabo dicho método in vitro.
40. Un método según la realización 39, llevando a cabo dicho método en una célula aislada.
41. Un método in vitro de examen de la función de un gen en una célula u organismo, que comprende:
- 15 a. introducir un complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones 1 a 36 con diana en ARNm para la degradación en la célula u organismo, produciendo de esta manera una célula de ensayo o un organismo de ensayo,
- b. mantener la célula de ensayo u organismo de ensayo bajo condiciones en las que se produce la degradación del ARNm del gen, produciendo de esta manera una célula de ensayo u organismo de ensayo en el que los niveles de ARNm del gen se encuentran reducidos,
- 20 c. observar el genotipo de la célula u organismo de ensayo producido en la etapa b., y opcionalmente comparar el fenotipo observado con el fenotipo de una célula de control u organismo de control apropiado, proporcionando de esta manera información sobre la función del gen.
42. Un método según la realización 41, utilizado para la determinación de si un producto génico es una diana adecuada para la intervención terapéutica.
- 25 43. Un método según las realizaciones 41 y 42, llevando a cabo dicho método in vitro.
44. Un método según la realización 43, llevando a cabo dicho método en una célula aislada.
45. Un método in vitro de evaluación de si un agente actúa sobre un producto génico, que comprende las etapas siguientes:
- 30 a. introducir un complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones 1 a 36 con diana en ARNm para la degradación en la célula u organismo, produciendo de esta manera una célula de ensayo o un organismo de ensayo,
- b. mantener la célula de ensayo u organismo de ensayo bajo condiciones en las que se produce la degradación del ARNm del gen, produciendo de esta manera una célula de ensayo u organismo de ensayo en el que los niveles de ARNm del gen se encuentran reducidos,
- 35 c. introducción del agente en la célula de ensayo u organismo de ensayo,
- d. observación del genotipo de la célula u organismo de ensayo producido en la etapa c., y opcionalmente la comparación del fenotipo observado con el fenotipo de una célula de control u organismo de control apropiado, proporcionando de esta manera información sobre si el agente actúa sobre el producto génico.
- 40 46. Un método según la realización 45, llevando a cabo dicho método in vitro.
47. Un método según la realización 46, llevando a cabo dicho método en una célula aislada.
48. Una composición farmacéutica que comprende el complejo de ARN de las realizaciones 1 a 36 y un diluyente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
49. El complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones 1 a 36 para la utilización como medicamento.
- 45 50. La utilización in vitro del complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones 1 a 36 para mediar en la modificación de ácido nucleico de un ácido nucleico diana al que corresponde.
51. Utilización según la realización 50, en el que dicha modificación de ácido nucleico se selecciona de entre el grupo de interferencia de ARN y metilación de ADN.
52. Utilización según la realización 51, en el que la interferencia de ARN media en la degradación de un ARN diana o la inhibición de la traducción de un ARN diana o una combinación de ambas.
- 50 53. Utilización según cualquiera de las realizaciones 50 a 52 con efectos inespecíficos reducidos.
54. Utilización según cualquiera de las realizaciones 50 a 52 con una respuesta al interferón reducida.
55. Utilización del complejo de ARN según cualquiera de las realizaciones 1 a 36 para el diagnóstico o el pronóstico.

Ejemplos

55 *Parte experimental:*

Los oligonucleótidos de ANB pueden prepararse y purificarse según los métodos dados a conocer o referenciados en el documento nº PCT/DK2006/00512 o nº WO2005/073378.

60 Se sintetizaron los oligonucleótidos utilizando técnicas estándares de síntesis de ARN y de síntesis de ANB.

El ANB es un oligonucleótido que contiene uno o más ribonucleótidos unidos mediante 2'-O,4'-C-metileno (nucleótidos de ANB) [M. Petersen, J. Wengel, Trends Biotechnol. 2003, 21, 74-81].

El ANB es un oligonucleótido que contiene uno o más ribonucleótidos unidos mediante 2'-O,4'-C-metileno (nucleótidos de ANB).

- 5 El ARNip modificado con ANB (ANBip) es un constructo de ARNip que contiene uno o más ribonucleótidos unidos mediante 2'-O,4'-C-metileno (nucleótidos de ANB).

Constructos

- 10 La línea celular de cáncer de pulmón humano H1299 producido para expresar establemente PFVM (semivida de PFVM: 2 h) se obtuvo cortesía de Dr. Anne Chauchereau (CNRS, Villejuif, Francia). Los dos constructos informadores, pISO_{antisentido-diana} y pISO_{sentido-diana}, se construyeron mediante hibridación de cantidades equimolares de los oligos de ADN siguientes: 5'-GCGACGTAAACGGCCACAAGTTC-3' (SEC ID n° 29) y 3'-TCGACGCTGCATTGCCGGTGTTC AAGGATC-5' (SEC ID n° 30) (diana antisentido) o 5'-CTAGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCT-3' (SEC ID n° 31) y 3'-CGCTGCATT-TGCCGGTGTTC AAG-5' (SEC ID n° 32) (diana sentido) en pISO digerido con *SacI/NheI* (amablemente proporcionado por David Bartel) (Lewis B.P. et al., Cell 115:787-798, 2003) después de la secuencia codificante de la luciferasa de luciérnaga.

Preparación de oligonucleótidos

- 20 Se prepararon oligos de ARN modificados con ANB en un sintetizador de ADN automatizado tal como se ha indicado anteriormente (Singh S.K. y Wengel J., Chem. Commun. 1247-8, 1988).

- 25 Síntesis de los derivados Nu-2 (mediante Nu-1) para permitir la incorporación en el ARN del monómero adamantilo-amino-ANB aT (figura 18) en un sintetizador automatizado utilizando la amidita Nu-2 y métodos convencionales tales como los descritos en la literatura (Singh S.K. y Wengel J., Chem. Commun. 1247-8, 1988).

- 30 A) Síntesis de (1R,3R,4R,7S)-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-7-hidroxi-5-(1-adamantilmetilcarbonil)-3-(timín-1-il)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptano (Nu-1). Se llevó a cabo la N-acilación del nucleósido de partida (572 mg, 1,0 mmol) (nucleósido 3f' en Sørensen M. D., Petersen M. y Wengel, J., Chem. Commun. 2130-1, 2003) con ácido 1-adamantano-acético (233 mg, 1,2 mmoles) en presencia de EDC·HCl (230 mg, 1,2 mmoles) en CH₂Cl₂ anhidro (10 ml). Tras agitar a temperatura ambiente hasta completarla (~6 h), la mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂, se lavó con NaHCO₃ acuoso sat. (dos veces) y se secaron las fases orgánicas agrupadas (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron a sequedad bajo presión reducida. El residuo obtenido tras el procedimiento final se purificó mediante cromatografía de columna (EtOAc al 80-95% en petróleo ligero, v/v), proporcionando una mezcla rotamérica (~1:1 según RMN-¹H) del nucleósido Nu-1 (680 mg, 91%) en forma de un material sólido blanco. RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,66 (s, 1H), 7,63 (s, 1H), 7,48-7,44 (m, 4H), 7,37-7,20 (m, 14H), 6,85-6,81 (m, 8H), 5,53 (s, 1H), 5,44 (s, 1H), 5,14 (s, 1H), 4,65 (s, 1H), 4,35 (s, 2H), 3,77 (s, 12H), 3,61-3,42 (m, 8H), 2,29 (d, J = 13,8 Hz, 1H), 2,18 (d, J = 13,9 Hz, 1H), 1,97 (d, J = 5,6 Hz, 1H), 1,93-1,89 (m, 9H), 1,73-1,60 (m, 28H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 171,4, 171,3, 164,7, 164,5, 158,7, 158,6, 150,3, 149,8, 144,5, 135,6, 135,5, 135,4, 135,3, 135,1, 134,9, 130,2, 130,1, 128,2, 128,0, 127,1, 113,4, 110,3, 110,0, 88,9, 88,1, 87,5, 87,2, 86,7, 70,2, 68,6, 64,4, 61,6, 59,6, 59,3, 55,2, 53,5, 51,3, 47,6, 47,4, 42,8, 37,1, 36,8, 36,7, 33,8, 33,5, 28,9, 28,7, 28,6, 12,6; EMAR MALDI: m/z 770,3396 ([M+Na]⁺, C₄₄H₄₉N₃O₈Na⁺ calc.: 770,3417).

- 45 B. Síntesis de (1R,3R,4R,7S)-7-(2-cianoetoxi(diisopropilamino)fosfinoxi)-1-(4,4'-dimetoxitritiloximetil)-5-(1-adamantilmetilcarbonil)-3-(timín-1-il)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptano (Nu-2). Se añadió gota a gota 2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidocloridita (247 mg, 1,04 mmoles) a una solución bajo agitación de nucleósido Nu-1 (650 mg, 0,87 mmoles) y N,N-(diisopropil)etilamina (1,0 ml) en CH₂Cl₂ anhidro (10 ml). Tras agitar durante 14 h a temperatura ambiente, se diluyó la mezcla de reacción con CH₂Cl₂ (50 ml). La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ acuoso sat. (2x50 ml), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía de columna (EtOAc al 50-60% en n-hexano, v/v), proporcionando el nucleósido amidita Nu-2 (685 mg, 83%) en forma de una espuma blanca. RMN ³¹P (CDCl₃) δ 151,1, 151,0, 150,7, 149,4; EMAR MALDI: m/z 970,4457 ([M+Na]⁺, C₅₃H₆₆N₅O₉PNa⁺ calc.: 970,4496).

- 55 La incorporación en el ARN del monómero pirenil-amino-ANB pT (figura 18) en un sintetizador automatizado se llevó a cabo tal como se describe en la literatura (Sørensen M. D., Petersen M. y Wengel J., Chem. Commun. 2130-1, 2003).

- 60 Oligonucleótidos utilizados en el presente estudio:
controles de ARNip:
eGFPsiRNA

SEC ID n° 1 5'-GACGUAAACGGCCACAAGUUC
SEC ID n° 2 3'-CGCUGCAUUUGCCGGUGUUCA

ARNip no corresp.

SEC ID nº 3 5'-GACUUAGACUGACACAAGUUC
SEC ID nº 4 3'-CGCUGAAUCUGACUGUGUUC

siRNA-BCR-ABL

5 SEC ID nº 5 5'-GCAGAGUUCAAAAGCCCUUUU
SEC ID nº 6 3'-UUCGUCUCAAGUUUUCGGGAA

Oligonucleótidos de sentido:

SEC ID nº 7, también denominado W004: 5'-GAC^{MeL}GUAAAC^{MeL}G
SEC ID nº 8, también denominado W005: 5'-GCC^{MeL}AC^{MeL}AAGUTLC^{MeL}U
SEC ID nº 9, también denominado W037: 5'-GAC^{MeL}GUAAAC^{MeL}GCC^{MeL}AC^{MeL}AAGUTLC^{MeL}U
SEC ID nº 10, también denominado JW1106: 5'-GAC^{MeL}GUAAAC^{MeL}GGCCAC^{MeL}AAGUTLC^{MeL}U
SEC ID nº 11, también denominado W034: 5'-GAC^{MeL}GUAAAC^{MeL}GG
SEC ID nº 12, también denominado W035: 5'-C^{MeL}AC^{MeL}AAGUTLC^{MeL}U
SEC ID nº 13, también denominado W036: 5'-GC^{MeL}AC^{MeL}AAGUTLC
SEC ID nº 14, también denominado W040: 5'-GACGUAAACG
SEC ID nº 15, también denominado W041: 5'-GCCACAAGUUCU
SEC ID nº 17, también denominado JW1105: 5'-GA^LCG^LUAAACGGCCACAAGUT^LC^{MeL}U

10

Oligonucleótidos antisentido:

SEC ID nº 16, también denominado JW1103: 5'-ACUUGUGCCCGUUUACGUCG^LC^{MeL}U
SEC ID nº 18, también denominado W010: 5'-ACT^LUGT^LGGCCGUUT^LACGT^LCG^LC^{MeL}U

Oligonucleótidos adicionales

15

SEC ID nº 19 W006_GFP1-a ACUUGUGCCCGUUUACGUCG^LC^{MeL}U
SEC ID nº 20 W038_GFP1-s GAC^MGUAAAC^MG
SEC ID nº 21 W039_GFP1-s GCC^MAC^MAAGUU^MC^MU
SEC ID nº 22 W056_GFP1-s GAC^TGUAAAC^TG
SEC ID nº 23 W057_GFP1-s GCC^ACAAGUT^TC^TU
SEC ID nº 24 W058_GFP1-s GCC^ACAAGUT^TC^TU
SEC ID nº 25 W074_GFP1-a ACUUGUGCCCGUUUACGUCG^LC
SEC ID nº 26 W075_GFP1-a ACUUGUGCCCGUUUACGUC^{MeL}G^LC
SEC ID nº 27 W038_GFP1-s GAC^MGUAAAC^MG
SEC ID nº 28 W039_GFP1-s GCC^MAC^MAAGUU^MC^MU

Cadenas cortas de ARNipis para cadena pasajera de múltiples cadenas:

Dos cadenas cortas para la utilización con W004:		
SEC ID nº 33	W141	5'-GC ^{MeL} C ^{MeL} AC ^{MeL}
SEC ID nº 34	W142	5'-AA ^L G ^L UT ^L C ^{MeL} U
Tres cadenas cortas para la utilización en lugar de W004 + W005:		
SEC ID nº 35	W143	5'-GAC ^{MeL} GT ^L A
SEC ID nº 36	W144	5'-AAC ^{MeL} GG ^L C C
SEC ID nº 37	W145	5'-AC ^{MeL} AAG ^L UT ^L C ^{MeL} U

Cadenas cortas para la utilización en estudios de Tf relacionados con constructos de ARNipis:		
SEC ID nº 38	W146	5'-GAC GUA
SEC ID nº 39	W147	5'-GAC ^{MeL} GUA
SEC ID nº 40	W148	5'-GAC G ^L UA
SEC ID nº 41	W149	5'-GAC ^{MeL} G ^L T ^L A
SEC ID nº 42	W150	5'-G ^L AC GUA
SEC ID nº 43	W151	5'-GAC GUA ^L

20

W037 corresponde a una versión continua de W004 y W005. W034 y W035 es una variante de la pareja de W004 y W005 en la que la muesca se ha desplazado una posición hacia el extremo 3'. W040 y W041 son las versiones de ARN de W004 y W005. W036 es equivalente a W005 pero sin un residuo de U 3'-terminal.

W004 es 5'SS1, W005 es 3'SS1, WO37 es SS1, WO34 es 5'SS3, WO35 es 3'SS3, WO36 es 3'SS5 y JW1103 es AS1.

Una "L" pequeña en el superíndice indica que el residuo es una nucleobase de ANB.

5 Una "MeL" pequeña en el superíndice indica que el residuo es una nucleobase de ANB con una base de 5-metilcitosina.

Una "M" mayúscula en el superíndice indica que el residuo es una nucleobase 2'-O-Me.

10 Una "f" minúscula en el superíndice indica que el residuo es una nucleobase 2'-fluoro.

Los complejos de ARNipis terapéuticos para la utilización en composiciones de la presente invención.

ApoB-1- ARNipis	SEC ID 52	5'-GUC ^{MeL} AUC ^{MeL} CAC-3'
	SEC ID 53	5'-UG ^{MeL} AAUAC ^{MeL} AAU -CI-3'
	SEC ID 54	3'-CAC ^{MeL} AG ^{MeL} UAGUGUGAC ^{MeL} UUAUG ^{MeL} UUA-5'
ApoB-1- ARNipis	SEC ID 55	5'-GUC ^{MeL} AUC ^{MeL} CAC-3'
	SEC ID 56	5'-UG ^{MeL} AAUAC ^{MeL} AAU -CI-3'
	SEC ID 57	3'-CAC ^{MeL} AGUAGUGUGACUUAUGUUA-5'
ApoB-2- ARNipis	SEC ID 58	5'-AG ^{MeL} G ^{MeL} UGUAUGG -3'
	SEC ID 59	5'-CUUCC ^{MeL} AACC ^{MeL} CUG-CI -3'
	SEC ID 60	3'-UC ^{MeL} UC ^{MeL} -CACAUACCGAAG ^{MeL} UUGGG ^{Me} AC-5'
ApoB-2- ARNipis	SEC ID 61	5'-AG ^{MeL} G ^{MeL} UGUAUG -3'
	SEC ID 62	5'-G ^{MeL} CUUCC ^{MeL} AACC ^{MeL} CUG-CI - 3'
	SEC ID 63	3'-UC ^{MeL} UC ^{MeL} CACAUACCGAAGUUGGGAC-5'
ARNipis de survivina-1	SEC ID 64	5'-GC ^{MeL} AUUC ^{MeL} GUC ^{MeL} C-3'
	SEC ID 65	5'-GG ^{MeL} UUGCG ^{MeL} CUUU-CI-3'
	SEC ID 66	3'-UUC ^{MeL} GUAAG ^{MeL} CAGGCCAACGCGA-5'
ARNipis de survivina-2a	SEC ID 67	5'-UUUC ^{MeL} UGAG ^{MeL} CU-3'
	SEC ID 68	5'-GCAG ^{MeL} GUUC ^{MeL} UU -CI-3'
	SEC ID 69	3'-AG ^{MeL} AC ^{MeL} UCGACGUCCAAGGUU-5'
ARNipis de survivina-2b	SEC ID 70	5'-UUUC ^{MeL} UGAG ^{MeL} CU-3'
	SEC ID 71	5'-GCAG ^{MeL} GUUC ^{MeL} UU -CI-3'
	SEC ID 72	3'-AG ^{MeL} AC ^{MeL} UCGACGUCCAAG ^{Me} GUU-5'

-CI-3' indica un oligonucleótido conjugado con colesterol 3'-terminal.

15 Los compuestos terapéuticos de ARNipis se conjugan opcionalmente con colesterol en el extremo 3' de la molécula de ARN, tal como la primera o segunda cadena pasajera o la cadena antisentido.

20 Las composiciones farmacéuticas según la invención comprenden convenientemente quitosano, que puede añadirse, por ejemplo, en forma de partículas formadas utilizando 800 µl de quitosano en una solución 1 mg/ml a pH 5,5 a la que se añadieron 200 µl de un tampón de acetato sódico 0,2 M a pH 5,5. Pueden prepararse complejos utilizando, por ejemplo, 20 µl de solución de ARNipis 250 µM.

25 Utilizando los diseños de ARNipis tal como se indica en la presente memoria, también pueden diseñarse complejos terapéuticos de ARNipis contra numerosas otras dianas terapéuticas, por ejemplo contra dianas en las que se han utilizado ARNip previamente, tal como las secuencias diana identificadas en las referencias siguientes:

survivina:

Beltramiet al., J.Biol.Chem., 279, 2077-2084.

Coma, S. et al, Oligonucleotides, 14, 100-113.

30 Ning et a,' Int.J.Oncol., 25, 1065-1071.

ApoB:

Soutschek, et al., Nature, 432, 173-178.

Hif-1a:

Jiang G et al., Eur J Pharmacol. 2007 Feb 8

35 Jiang M et al., J Vasc Res. 2006;43(6):511-21.

Ono Y et al., J Cell Biochem. 2006 Jun 1;98(3):642-9.

K-ras:

Chen LM et al., World J Gastroenterol. 2005 Feb 14;11(6):831-8.

siRNA Sequence:

40 Kim IA, et al., Cancer Res. 2005 Sep 1;65(17):7902-10.

Bcl2:

Miura Yet al., Apoptosis. 2006 Oct;11(10):1825-35.

Transfección

5 Se mezclaron las cadenas de sentido y antisentido en tampón de hibridación (Tris-HCl 10 mM, pH 7,3, NaCl 50 mM) a una concentración equimolar de 20 mM y se incubaron a 95°C durante 1 min. y a 1 h a 37°C. Las células utilizadas para la citometría de flujo se sembraron en placas de 6 pocillos y se cultivaron en RPMI-1640 que contenía SFB al 10%, penicilina/estreptomina al 1% hasta una confluencia de 60% a 80%. Las células se transfectaron utilizando el reactivo Mirus TransIT-TKO siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración final del complejo de ARN era de 10 a 50 nM. Tras 24 h de incubación se añadió medio fresco y las células se incubaron durante 24 h adicionales antes del análisis del ARN y las proteínas. Se cuantificó la expresión de proteína PFVM mediante análisis de citometría de flujo contando aproximadamente 5×10^4 células y calculando el promedio. Las células utilizadas para el análisis northern y western se sembraron a una confluencia de aproximadamente 20% y se transfectaron utilizando reactivo de transfección Silentfect de Bio-Rad (concentración final de ARN: 50 nM) siguiendo las instrucciones del fabricante. 24 h después se proporcionó medio fresco a las células y se incubaron durante 24 h adicionales antes de la retransfección con lipofectamina 2000 (concentración final de ARN: 50 nM) siguiendo las instrucciones del fabricante o se recolectaron para el análisis western o northern. Se llevó a cabo el análisis de transferencia western de la manera siguiente: las células se lavaron dos veces en PBS y se lisó una cantidad igual de células tampón para muestras 2xSDS [dodecilsulfato sódico (SDS) al 4%, glicerol al 20%, Tris/HCl 125 mM, pH 6,8, azul bromofenol 0,01 mg/ml, b-mercaptoetanol al 10%] a 90°C durante 2x10 min. separado por pipeteado suave. Se separaron las proteínas en geles de SDS-acrilamida al 12% y se electrotransfirieron durante la noche a una membrana de PVDF (Immobilon). Se bloqueó el filtro durante 1 h con PBS que contenía leche al 10% p/v. Se detectó la proteína EGFP utilizando una dilución 1:1.000 de un anticuerpo policlonal de conejo anti-PFVM. El anticuerpo de ratón RNPC1hn se obtuvo cortesía de Seraphin Pinol-Roma. Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (prp) (DAKO) con reactivo ECL (Amersham Biosciences) para la visualización. Se analizó el ARNm de PFVM mediante transferencia northern siguiendo procedimientos estándares.

Cuantificación del ARNm y las proteínas

30 La expresión de la proteína PFVM se analizó mediante análisis de citometría de flujo. Se llevó a cabo el análisis de transferencia western de la manera siguiente: Las células se lavaron dos veces en PBS y se lisó una cantidad igual de células tampón para muestras 2xSDS [dodecilsulfato sódico (SDS) al 4%, glicerol al 20%, Tris/HCl 125 mM, pH 6,8, azul bromofenol 0,01 mg/ml, b-mercaptoetanol al 10%] a 90°C durante 2x10 min. separado por pipeteado suave. Se separaron las proteínas en geles de SDS-acrilamida al 8% y se electrotransfirieron durante la noche a una membrana de PVDF (Immobilon). Se bloqueó el filtro durante 1 h con PBS que contenía leche al 10% p/v. Se detectó la proteína PFVM utilizando una dilución 1:1.000 de un anticuerpo policlonal de conejo anti-PFVM (Santa Cruz Biotechnology). El anticuerpo de ratón RNPC1hn se obtuvo cortesía de Seraphin Pinol-Roma. Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (prp) (DAKO) con reactivo ECL (Amersham Biosciences) para la visualización. Se analizó el ARNm de PFVM mediante transferencia northern siguiendo procedimientos estándares.

Ensayo de estabilidad

45 Los complejos de ARN/ANB se incubaron a 37°C en suero de feto bovino al 10% (Gibco) diluido en D-MEM (Gibco). Se recogieron muestras de 5 µl en los puntos temporales indicados y se congelaron inmediatamente sobre hielo seco en 15 µl de tampón de carga de 1,33xTBE/glicerol al 10% y se sometieron a PAGE no desnaturante en un gel al 15%. Se visualizaron los ARN con oro SYBR (Invitrogen).

Ensayo de respuesta al interferón

50 Se transfectaron variantes de ARNip (80 nM) o poli(I:C) (0,8 µg/ml) en células T98G utilizando el reactivo de transfección TransIT-TKO® (Mirus) siguiendo el protocolo del fabricante. Se cultivaron células T98G en SFB al 10% en DMEM (Gibco). Se purificó el ARN total utilizando Trizol (Invitrogen), se trató con ADNasa y se sometió a transcripción inversa cebada con oligo-dT. Se llevó a cabo la qPCR utilizando la supermezcla de qPCR SYBR® verde con platino (Invitrogen) en un sistema de qPCR Mx3005p de Stratagene. Los cebadores utilizados para la amplificación de ISG56 fueron: 5'-AAGGCAGGCTGTCCGCTTA-3' y 5'-TCCTGTC-CTTCATCCTGAAGCT-3'. Cebadores para amplificar GADPH: 5'-GAAGGTGAAGGTGGAGT-3' y 5'-GAAGATGGT-GATGGGATTTTC-3'.

60 Las condiciones de la PCR fueron: 1 ciclo: 95°C 10 min. 40 ciclos: 95°C 30 s, 55°C 1min, 72°C 30 s. 1 ciclo: 95°C 30 s, 55°C 1 min, 95°C 1 min. Se llevó a cabo la cuantificación relativa de los niveles de ARNm mediante la utilización del método de $\Delta\Delta CT$. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y se normalizaron los niveles de ISG56 para las células tratadas con ARNip respecto a los controles tratados con TransIT-TKO.

Ensayo dual de luciferasa

Se sembraron células H1299 en placas de 6 pocillos en RPMI complementado con suero de feto bovino al 10% y se cultivaron hasta una confluencia de 40% a 60%. Se cotransfectaron pISO_{antisentido-diana} y pISO_{sentido-diana} (1 µg) con 0,002 µg de pRLuc-N2 (Perkin-Elmer) y los dúplex de ARNip (concentración final: 10 nM) mediante la utilización simultánea de 6 µl de TransIT-LT1 (Mirus) y 6 µl de TransIT-TKO (Mirus) siguiendo el protocolo del fabricante. El ensayo dual de luciferasa se llevó a cabo 48 horas después de la transfección utilizando el "sistema de ensayo de informador dual de luciferasa" (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. Se midieron las actividades de luciferasa en un luminómetro Lumat LB 950 (Berthold) y se normalizaron respecto a la señal de la luciferasa de *Renilla*.

EJEMPLO 1:

Formación de un complejo de ARN trimérico con elevada estabilidad en suero

El ARN interfiriente pequeño internamente segmentado (ARNipis) se refiere a un dúplex que contiene una cadena antisentido discontinua y una cadena antisentido continua. Los presentes inventores sometieron a ensayo inicialmente un constructo de ARNipis compuesto de una cadena antisentido que contenía dos residuos de ANB próximos al extremo 3' (JW1103) y una cadena pasajera discontinua que comprendía dos moléculas de ARN: W004, una molécula de ARN de 10 nucleótidos con dos residuos de ANB, y W005, una molécula de ARN de 12 nucleótidos que comprendía tres residuos de ANB.

El ARNipis modificado con ANB era significativamente más estable en suero al 10% que el ARNip ordinario (ARNip-PFVM), que fue acortado rápidamente en unos cuantos nucleótidos en unas pocas horas y degradado adicionalmente en 1 a 2 días (figura 7, comparar el panel superior). En contraste, se observó sólo una reducción muy pequeña del tamaño del ARNipis durante un periodo de incubación de 5 días, lo que podría reflejar la eliminación del residuo 3'-U en el extremo 3' de W005 (figura 7, panel inferior). Debido a que este U sólo se añade como nucleótido no modificado extra para facilitar la síntesis, lo anterior sólo incrementaría la potencia del ARNipis. Al comparar el ARNipis con un constructo modificado con ANB ordinario (ANBip que comprende JW1103 y JW1106; figura 7, panel intermedio) sin una muesca en la cadena de sentido, la estabilidad global era similar, aunque el ANBip ordinario rindió un producto de degradación ligeramente más corto. El motivo exacto de esta diferencia en el cambio de movilidad no fue caracterizado adicionalmente.

EJEMPLO 2

Actividad de ARNi del ARNipis

Un ARNip que contiene una cadena de sentido con muesca es totalmente funcional: Conjuntamente con un ARNip estándar y ARNip de control no relacionado, se sometieron a ensayo los constructos mediante transfección en una línea celular de carcinoma pulmonar H1299 que expresaba establemente PFVM desestabilizado. A continuación, se realizó un seguimiento del nivel de expresión de ARNm y proteína de PFVM basándose en microscopía de fluorescencia, transferencia northern, transferencia western y citometría de flujo. El tratamiento de las células con ARNipis o ARNip modificado con ANB 50 nM rindió una inactivación de 10 veces comparable tras 48 horas. La omisión de una o ambas cadenas de sentido cortas (5'SS1 o 3'SS1) eliminó la actividad del ARNipis, sugiriendo que la actividad del ARNipis modificado con ANB era estrictamente dependiente de la presencia de las tres cadenas. Por lo tanto, el diseño de ARNipis presentaba una eficiencia similar de potente silenciamiento que los ARNip estándares en estudios a corto plazo.

Para eliminar la incorporación de la cadena de sentido en CSIA activado, los presentes inventores aplicaron un nuevo diseño de ARNip caracterizado por una cadena antisentido intacta complementada con dos cadenas de sentido más cortas. Los presentes inventores anticiparon que mediante la incorporación de nucleótidos de ANB en dicho constructo trimolecular, podía conseguirse una estabilidad y mimetismo estructural de ARNdc suficientes para permitir la actividad de interferencia de ARN. Los presentes inventores inicialmente diseñaron un ARNipis compuesto de cadenas de sentido de 10 nt y 12 nt dirigidas a una diana funcional previamente establecida en el ARNm codificante de proteína fluorescente verde mejorada (PFVM). Para estabilizar el constructo de ARNipis los presentes inventores incorporaron ANB en dos y cuatro posiciones en las semicadenas 5' y 3' de sentido, y en proximidad al extremo 3' de la cadena antisentido, y se ensambló el constructo a partir de dichas tres cadenas (JW1103, W004 y W005). El ARNipis, que comprende una cadena antisentido y una cadena pasajera discontinua (JW1103, W004 y W005), se mantiene totalmente activo según la inspección visual de la expresión de PFVM en las células (figura 8) y su capacidad de inactivar la proteína PFVM (figura 9A) y el ARNm de PFVM (figura 9B, carriles 1 a 6).

Resulta importante que ambas cadenas de sentido se encuentren presentes (las dos moléculas de ARN que constituyen la cadena pasajera discontinua), ya que la omisión de W004 o W005 o ambos del complejo anula por completo la actividad de interferencia, tanto al nivel del ARNm como de expresión de proteína (figuras 8 y 9).

5 Para someter a ensayo el rendimiento del ARNipis modificado con ANB y los ARNip estándares en la inactivación a largo plazo, se retransfectaron las células tras 48 horas y se recolectaron tras 120 (5 días) o 180 horas (7,5 días). Tras 120 horas, las células tratadas con ARNip habían recuperado aproximadamente 50% del ARNm de PFVM y algunas, la expresión de la proteína PFVM (figura 9B). En contraste, las células tratadas con ARNipis modificado con ANB mantuvieron niveles bajos de tanto ARNm de PFVM como de expresión de proteína (figuras 9 y 10). Incluso tras 180 horas, todavía se observaba una inactivación significativa de la expresión de PFVM en las células tratadas con ARNipis modificado con ANB, mientras que la expresión de la PFVM se había recuperado totalmente en las células tratadas con el ARNip estándar (figura 10A). Por lo tanto, el ARNipis muestra una actividad de silenciamiento prolongada en cultivo celular en comparación con los ARNip estándares.

15 EJEMPLO 3

Comparación de la actividad del ARNipis con otros constructos de ARNip/ANB

20 Con el fin de evaluar la eficacia del ARNipis en comparación con ARNip/ANB ordinario, los presentes inventores transfectaron células HT1092 con ARNipis, dos constructos de ARNip (JW1103+JW1105 y JW1103+JW1106) que habían sido previamente caracterizados como constructos de ANBip altamente activos y ARNip ordinario.

Las eficiencias del ARNipis, el ANBip y el ARNip normal eran muy similares, proporcionando todas una inactivación de 80% a 90% a concentraciones de entre 10 y 50 nM (figura 11A).

25 Con el fin de investigar si las diferencias de actividad podían detectarse a una concentración más baja, los dúplex se aplicaron a concentraciones de entre 10 pM y 100 nM. Además, se incluyó un dúplex continuo (JW1103 y W037), que contenía un patrón idéntico de modificación con ANB al de ARNipis. Nuevamente no se observaron diferencias significativas de potencia del ARNi (figura 11B). Se destaca que todos los dúplex resultaron en una inactivación de aproximadamente 50% al aplicar el dúplex a una concentración muy baja de 10 pM.

30 EJEMPLO 4

Optimización del diseño de ARNipis

35 Con el fin de investigar la flexibilidad del diseño del ARNipis, los presentes inventores sometieron a ensayo na serie de diferentes diseños de cadena de sentido y antisentido.

40 La utilización de los ARN de sentido discontinuos no modificados, W040 y W041 correspondientes a W004 y W005, respectivamente, resultó en un complejo que indujo actividad de ARNi, aunque con una actividad algo reducida en comparación con el ARNipis modificado con ANB (comparar las columnas 1 y 2 en la figura 12).

45 El desplazamiento de la muesca en la cadena de sentido del ARNipis un nucleótido hacia el extremo 3' (diseño 11+11) no interfirió con la actividad de ARNi (columna 5, figura 12).

50 Por motivos técnicos en la síntesis se encontraba presente un residuo de U adicional en el extremo 3' de W005. Para someter a ensayo si este residuo afectaba a la actividad del complejo de ARN, se sintetizó un nuevo oligo sin el residuo de U terminal (W036). Este cambio no alteró la actividad del constructo de manera significativa (columna 4, figura 12).

55 JW1103 sólo contenía 2 residuos de ANB en proximidad al extremo 3', ya que los presentes inventores habían encontrado previamente que la modificación extensiva de la cadena antisentido interfiere fuertemente con la actividad de ARNi. Con el fin de investigar si la cadena de sentido discontinua podría influir sobre la necesidad de una cadena antisentido con un número limitado de nucleótidos modificados, los presentes inventores sometieron a ensayo el mismo grupo de cadena sentido con una cadena antisentido fuertemente modificada que contenía 6 residuos de ANB (W010). Dicha cadena antisentido era esencialmente inactiva al emparejarla con una cadena de sentido modificada continua (W037, columna 8, figura 12).

60 Resulta interesante que dicho requisito era menos restrictivo al utilizar una cadena de sentido discontinua en la que únicamente se observó una reducción de la eficiencia de inactivación de aproximadamente dos veces (comparar las columnas 6, 7, 9 y 10 con la 1, 2, 4 y 5, respectivamente; figura 12).

De esta manera, al utilizar una cadena pasajera discontinua resulta posible utilizar una cadena antisentido potencialmente más estable con más residuos de ANB.

EJEMPLO 5

5

Respuesta inmunológica de ARNipis

Las modificaciones químicas de los ácidos nucleicos pueden presentar una influencia drástica sobre la respuesta inmunológica celular en células en cultivo y en animales. Con el fin de analizar las propiedades inmunogénicas de los constructos de ARNipis, los presentes inventores transfectaron la línea celular de glioblastoma humano T98G con 80 nM de los diferentes constructos de ARNip y se midió la inducción de ISG56, que resulta fuertemente inducido tanto por IFN de tipo I como ARNdc. La inducción de ISG56 mediada por PKR tras la transfección con ARNip ha sido informada previamente en células T98G, aunque no se han observado diferencias significativas en la inducción de ISG56 entre ANBipis, ANBip y ARNip no modificado (figura 13). En contraste, poli(I/C) indujo ISG56 en varios cientos de veces. Los presentes inventores concluyeron que el ARNipis no induce el interferón-alfa en ninguna medida significativa a una concentración de ARNip de 80 nM.

10

15

EJEMPLO 6

20

Efectos inespecíficos reducidos

La discontinuidad de la cadena pasajera deseada probablemente eliminará su incorporación en el complejo de CSIA. Para someter a ensayo esta hipótesis, se insertó la secuencia diana de PFVM en la orientación de sentido o antisentido dentro de la 3'-UTR de un constructo informador de luciferasa (figura 14). Esta estrategia permitió a los presentes inventores evaluar el efecto de inactivación derivado de la incorporación de la cadena pasajera. Tal como se pretendía, el constructo de ANBipis era significativamente más específico que los dúplex de ARNip y ANBip equivalentes. La expresión de luciferasa a partir del ARNm que incluía la diana de sentido de PFVM se había reducido 8 veces más con ARNipis que a partir del ARNm que contenía la diana invertida. En comparación, el ANBip y el ARNip sólo diferenciaron entre los dos constructos con una diferencia de aproximadamente 3 veces. Esta ganancia de especificidad resulta inesperada, considerando que la secuencia diana de PFVM utilizada en el presente estudio corresponde a un ARNip de PFVM comercial de Dharmacon que satisface la mayoría de las normas termodinámicas para ser una diana óptima. Con el fin de someter a ensayo si resultaba posible forzar de todos modos la cadena pasajera subóptima en el CSIA, se sintetizó un nuevo ARNipi modificado con ANB con una cadena pasajera intacta y una cadena antisentido con muesca (ANBipis_{inversa}) y se sometió a ensayo para la capacidad de inactivar el ARNm que contenía una diana directa y una diana inversa. Aunque la preferencia de diana no se había invertido por completo, el ANBipis_{inversa} mostró la inactivación más fuerte (50%) de los transcritos que contenían la diana inversas que ninguno de los demás constructos de ARNip, y fue la menos activa sobre la diana de sentido (figura 14). Estos datos demuestran claramente que el ARNipis era significativamente más específico para la diana deseada.

25

30

35

40

EJEMPLO 7

Estabilidad en suero al 80%

Se sometió a ensayo adicionalmente la estabilidad de ARNip, ARNipis y ANBip mediante incubación en SFB al 80% (figura 15). Tanto ARNipis como ANBip mostraron una estabilidad en suero incrementada en comparación con ARNip no modificado.

45

50

EJEMPLO 8

Posición y tamaño de la muesca en la cadena de sentido del ARNipis

Con el fin de investigar adicionalmente el diseño del ARNipis, los presentes inventores sometieron a ensayo una serie de diferentes cadenas de sentido y antisentido. En un experimento, la posición del hueco en la cadena de sentido se desplazó una posición hacia el extremo 5' (AS1+5'SS4+3'SS4; ARNipis₉₊₁₃), que desde el inicio de este trabajo se ha informado que es el sitio de corte natural para Ago2 en CSIA, o una posición hacia el extremo 3' (AS1+5'SS3+3'SS3; ARNipis₁₁₊₁₁). Para el diseño de ARNipis₁₁₊₁₁ sólo se observó una reducción menor, mientras que el diseño de ARNipis₉₊₁₃ fue ligeramente menos eficiente en el silenciamiento génico (figura 16A). El incremento del tamaño de hueco de la cadena de sentido a 1-2 nucleótidos resultó en una reducción drástica de la actividad del ARNipis con independencia de la posición del hueco (datos no mostrados). Por lo tanto, el diseño del ARNipis₁₀₊₁₂ ha demostrado ser el más eficiente de entre todos los ARNipis sometidos a ensayo. Se diseñó inicialmente la cadena 3'SS1 para que contuviese un residuo de U adicional en el extremo 3' con el fin de facilitar la síntesis química. Para someter a ensayo si este residuo afectaba a la actividad de ARNipis, se sintetizó 3'SS5 sin dicho

55

60

residuo de U terminal (3'SS5). Esta alteración no cambió la actividad del constructo de manera significativa (comparar las columnas 2 y 4, figura 16B).

EJEMPLO 9

5

La discontinuidad de la cadena de sentido elimina completamente su actividad de guía

10 Con el fin de someter a ensayo si la discontinuidad de la cadena de sentido deseada eliminaba su contribución al silenciamiento génico, los presentes inventores insertaron la secuencia diana del PFVM para la cadena antisentido o de sentido del ARN_{ip}^{PFVM} dentro de la 3'-UTR de un constructo informador de luciferasa (figura 17). Esta estrategia permitió a los presentes inventores evaluar el efecto de inactivación derivado de la incorporación de la cadena antisentido y de la cadena de sentido. Tal como se había predicho, el constructo de ARN_{ip} modificado con ANB era significativamente más específico que los dúplex de ARN_{ip} y ARN_{ip} modificado con ANB equivalentes, ya que se observó constantemente una inactivación de aproximadamente 50% respecto a la cadena de sentido con el diseño de diseño de ARN_{ip} estándar (columnas 1 y 2, figura 17). En contraste, el diseño de ARN_{ip} anuló por completo el silenciamiento de la "diana de sentido" en comparación con los controles de no correspondencia, sin comprometer la potente inactivación mediada por la cadena antisentido (columna 3, figura 17). Con el fin de someter a ensayo si resultaba posible anular la función de silenciamiento de una cadena antisentido de otro modo óptima con una muesca, se sometió a ensayo otro ARN_{ip} modificado con ANB con una cadena de sentido intacta y una cadena antisentido discontinua (5'AS2, 3'AS2, SS3) para la capacidad de inactivar las dianas antisentido y de sentido. Este diseño eliminó por completo el silenciamiento de la diana antisentido, aunque conservó el silenciamiento de la diana de sentido en un nivel comparable al ARN_{ip} estándar (columna 4, figura 17). En conjunto, estos datos demuestran claramente que el constructo de ARN_{ip} muestra un nivel mucho más alto de especificidad para la diana deseada que el diseño de ARN_{ip} habitual.

25

EJEMPLO 10: el diseño del ARN_{ip} es compatible con niveles más altos de modificación de la cadena antisentido

30 Los presentes inventores y otros han encontrado previamente que la modificación extensiva con ANB de las cadenas antisentido interfiere fuertemente con la actividad de ARNi en diseños de ARN_{ip} estándares (figura 18, columna 5 y datos no mostrados) (Elmen J. et al., *Nucleic Acids Res* 33:439-447, 2005; Braasch D.A. et al., *Biochemistry* 42:7967-7975, 2003). Por lo tanto, los presentes inventores diseñaron inicialmente AS1 para que contuviese únicamente dos residuos de ANB próximos al extremo 3'. Con el fin de investigar si la discontinuidad de la cadena de sentido influye sobre la necesidad de residuos no modificados en el cuerpo de la cadena antisentido, los presentes inventores sometieron a ensayo un ARN_{ip} modificado con ANB con una cadena antisentido altamente modificada que contenía seis residuos de ANB (AS2). Dicha cadena antisentido se encuentra esencialmente inactiva al emparejarla con una cadena de sentido totalmente de ARN (datos no mostrados) o una cadena de sentido modificada con ANB (dúplex de ARN_{ip} modificada con ANB AS2+SS1, figura 18B, columna 2). Resulta interesante que el requisito de residuos no modificados en la cadena antisentido sea menos restrictivo al utilizar el diseño de ARN_{ip} (comparar las columnas 2 y 3, figura 18B). Se observó una mejora similar de la eficiencia de inactivación utilizando el constructo de sentido acortado en el extremo 3' y el diseño de ARN_{ip}₁₁₊₁₁ modificado con ANB. Lo anterior sugiere que el diseño de ARN_{ip} podría rescatar parcialmente la carga alterada de las cadenas antisentido fuertemente modificadas en el CSIA activado. Con el fin de someter a ensayo si se aplica un efecto similar a otros tipos de modificación química que no incrementan la estabilidad termodinámica del ARN_{ip}, los presentes inventores sometieron a ensayo tres diseños que contenían modificaciones adicionales de un único N2'-adamantilo (AS4 y AS5) o N2'-pirén-1-il-2'-amino-ANB-T (AS6) (figura 18A) en la cadena antisentido. Estos tipos de modificación convierten el ARN_{ip} en prácticamente no funcional al emparejarlo con SS1 en un diseño de ARN_{ip} estándar (modificado con ANB) (figura 18B, columnas 4, 6 y 8). Sin embargo, en el contexto del diseño de ARN_{ip}, las cadenas antisentido modificadas tanto con adamantilo como con pirenilo causaron un incremento significativo, de ~2,5 a 4 veces, en la eficiencia de inactivación (figura 18B, columnas 5, 7 y 9). En conjunto, lo anterior demuestra que el diseño de ARN_{ip} puede incluir una gran diversidad de modificaciones químicas voluminosas que de otro modo serían incompatibles con la actividad del ARN_{ip} estándar.

55 Con el fin de caracterizar adicionalmente el mecanismo de restrictividad relajada de la estructura antisentido, los presentes inventores investigaron el destino de la cadena de sentido (SS1) en el ARN_{ip} modificado con antisentido ligero altamente funcional (AS1, SS1) en comparación con los ARN_{ip} modificados con antisentido pesados (AS2, SS1; AS4, SS1; AS5, SS1; AS6, SS1). Los ARN_{ip} modificados con ANB (AS1, SS1) causaron una reducción de ~2,5 veces de los niveles de informador respecto a la diana inversa (figura 18C, columna 2), mientras que no se observó ninguna reducción significativa para esta diana utilizando ARN_{ip} altamente modificados (AS2, SS1; AS4, SS1; AS5, SS1; AS6, SS1) (figura 18C, columnas 6, 10, 14 y 18). Lo anterior sugiere fuertemente que la carga de CSIA resulta defectuosa para ambas cadenas en el caso de que la cadena antisentido se modifique fuertemente y que el diseño de ARN_{ip} podría facilitar la carga de CSIA de dúplex de ARN_{ip} fuertemente modificados y no afectar a la selección de cadenas antes o durante la carga de CSIA.

60

EJEMPLO 11: evaluación de diferentes entropías de quitosano-ARNip en la administración de nariz a cerebro y en la administración de nariz a pulmón.

5 Se utilizaron las propiedades mucoso adhesiva y de mucopermeación del quitosano para la administración mucosal del ARNip y el ARNipis, por ejemplo las vías nasal, pulmonar, oral y vaginal en un ratón transgénico para PFVM y modelos animales de enfermedad. Además, se evaluaron las vías locales de administración, tales como la intraperitoneal y la intradérmica, utilizando el sistema basado en el quitosano. En un estudio realizado recientemente, se investigó la diferencia en la distribución al pulmón y a la región olfactiva de ARNip y ARNipis marcados con Cy3 y formulados en partículas discretas con quitosano a diferentes entropías o de ARNip
10 administrado con quitosano en una mezcla preparada inmediatamente antes de la administración nasal. En el presente estudio, los ratones recibieron 30 µl de volumen (15 µl en cada fosa) que contenían 5 µg de ARNip-Cy3 los días 1 y 3 administrados por vía intranasal. A continuación, se llevó a cabo la perfusión de cuerpo completo el día 5. Se diseccionaron y seccionaron el pulmón, hígado y cerebro en el Stereology Research Laboratory, AU y el Orthopaedic Research Laboratory, respectivamente.

15 Optimización de la administración y eficacia de ARNip y ARNipis en la administración pulmonar

Los presentes inventores implementaron un sistema nebulizador basado en catéteres para la administración endotraqueal de formulaciones aerosolizadas (quitosano/ARNip y ARNip desnudo) y se demostró una mejor
20 deposición pulmonar a dosis más baja que la administración intranasal de formulaciones líquidas.

Análisis de la respuesta de interferón y efectos inespecíficos in vitro e in vivo

25 Se llevó a cabo el perfilado de la expresión en el genoma completo con el fin de evaluar los efectos inespecíficos/inducidos por interferón que se inducían con ARNi por diferentes constructos de ARNip y ARNipis en un ensayo in vitro. En un estudio in vivo, se perfilaron muestras de sangre procedentes de ratones tratados con el mismo grupo de ARNip modificados utilizando diferentes vías de administración (pulmonar, intravenosa e intraperitoneal), para la expresión de citoquinas utilizando el sistema de perfilado de expresión Luminex.

30 Evaluación de las propiedades farmacocinéticas de inhibidores de ARNip y ARNipis químicamente modificados contra genes informadores en modelos de ratón informadores

35 Se sometieron a ensayo diferentes ARNip, ANBip y ARNipis en ratones PFVM transgénicos para propiedades funcionales, incluyendo la eficacia, la biodisponibilidad, la distribución en órganos, la estabilidad del ARNip (semivida y eliminación), la toxicidad y la respuesta inmunológica. Se exploraron diferentes vías de administración (ex vivo, nasal, pulmonar, intravenosa, intraperitoneal y local). Los inhibidores de ARNi optimizados se sometieron a ensayo en combinación con sistemas de administración (desnudo, quitosano polyplex y liposomas). Se analizó en ratones la posibilidad de dirigir ARNip conjugado con ligando a células o tejidos específicos. Se utilizó ARNip marcado radioactivamente o fluorescentemente para visualizar la localización.

40 EJEMPLO 12: evaluación del efecto de inactivación de ANBip y ARNipis de la expresión de PFVM en el pulmón tras la administración nasal y la administración intravenosa.

45 El objetivo del presente estudio era someter a ensayo la inactivación de la PFVM en células epiteliales de bronquiolos pulmonares tras la administración nasal o la inyección intravenosa de ANBip desnudo y ARNipis desnudo o formulado con quitosano.

Formulación y preparación de artículo de ensayo

50 Se utilizó quitosano de alto peso molecular (APM) para formar nanopartículas que contenían ARNipis, en tampón de acetato (0,2 M, pH 5,5) a razón de 250 µg/mg de ARNipis. Se concentraron las partículas en tampón de acetato (para las formulaciones intranasales) utilizando columnas concentradoras Vivaspin a 1 mg/ml de ARNipis.

55 Se concentró ANBip/ARNipis no formulado en PBS (1 mg/ml) para la administración intravenosa y en tampón de acetato para la administración intranasal.

Constructos:

ARNip	SEC ID nº 44 SEC ID nº 45	5'-GACGUAAAACGGCCACAAGUUC 3'-CGCUGCAUUUGCCGGUGUJCA
ARNip-no correspondencia	SEC ID nº 46 SEC ID nº 47	5'-GACUUAGACUGACACAAGUUC 3'-CGCUGAAUCUGACUGUGUUC
ANBip	SEC ID nº 48	5'-GAC <u>G</u> UAAA <u>C</u> GGCC <u>A</u> AGUT <u>C</u> -3'

	SEC ID nº 49	3'- UCGCUGCAUUUGCCGGUGUUCA -5'
ARNipis	SEC ID nº 50	5'- GACG UAA ACG GCCACAAGU TCU -3'
	SEC ID nº 51	3'- UCGCUGCAUUUGC -CGGUGUUCA-5'
Residuos en negrita = ANB		

Régimen y grupos de administración

Se distribuyeron 15 ratones transgénicos para PFVM en los grupos siguientes y se trataron con:

- 5 grupo 1: ANBip desnudo, vía intranasal (3 ratones)
- Grupo 2: ANBipis desnudo, vía intranasal (3 ratones)
- Grupo 3: partículas de quitosano-ARNipis, vía intranasal (3 ratones)
- Grupo 4: ARNipis desnudo, vía intranasal (3 ratones)
- 10 Grupo 5: administración nasal de control, ARNip-no correspondencia (3 ratones)

Bajo anestesia cada ratón cada día durante 5 días sucesivos recibió 30 µl de volumen (15 µl en cada fosa), en la administración por vía intranasal, o 50 µl, en la administración por vía intravenosa.

- 15 A continuación, se llevó a cabo la perfusión de cuerpo completo y se diseccionaron los órganos (pulmones, hígado, bazo, cabeza y riñones).

EJEMPLO 13: inactivación de PFVM en los pulmones de ratones verdes transgénicos utilizando la aerosolización por catéter

- 20 El objetivo del presente estudio era someter a ensayo la inactivación de PFVM en células epiteliales de bronquiolos pulmonares tras la administración intratraqueal de ARNip, ANBip y ARNipis formulados con quitosano.

- 25 El estudio investigaba la eficiencia de inactivación de las partículas de quitosano que contenían ARNip contra la PFVM en pulmones de ratones verdes transgénicos. Las partículas se administraron mediante la vía endotraqueal utilizando un catéter de nebulización para incrementar la administración del ARNip a regiones pulmonares profundas, tales como los alveolos.

Constructos:

ARNip	Tal como el Ejemplo 11
ARNip-no correspondencia	Tal como el Ejemplo 11
ARNipis	Tal como el Ejemplo 11

- 30 Diseño del estudio:

Recibieron dos dosis los 12 ratones transgénicos que expresaban PFVM.

- 35 grupo 1: quitosano/ARNip (4 ratones)
- grupo 2: quitosano/ARNip no correspondiente (4 ratones)
- grupo 3: quitosano/ARNipis (4 ratones)

- 40 Bajo anestesia, cada ratón recibió 2 dosis cada uno que administraban 2 µl de la solución de partículas el día 1 y 2 dosis nuevamente al día siguiente (día 2). Cuarenta y ocho horas después, se fijó el tejido mediante perfusión de cuerpo completo (día 4).

Se obtuvieron secciones de los pulmones y se investigaron para la inactivación de la PFVM.

- 45 Se formaron partículas utilizando 800 µl de quitosano en una solución 1 mg/ml a pH 5,5 a la que se añadieron 200 µl de un tampón de acetato sódico 0,2 M a pH 5,5. Se prepararon complejos utilizando 20 µl de una solución de ARNip 250 µM.

EJEMPLO 14: modelo de cultivo celular

- 50 Se prepararon los constructos de ARNipis siguientes siguiendo los métodos dados a conocer en el documento nº WO2005/073378.

- 55 El efecto de los ARNipis sobre la expresión de los ácidos nucleicos diana puede someterse a ensayo en cualquiera de entre una diversidad de tipos celulares, con la condición de que el ácido nucleico diana se encuentre presente a niveles medibles. La diana puede expresarse endógenamente o mediante transfección transitoria o estable de un ácido nucleico codificante de dicho ácido nucleico. El nivel de expresión de ácido nucleico diana puede determinarse

rutinariamente utilizando, por ejemplo, ensayos de análisis de transferencia northern, PCR en tiempo real y ensayos de protección frente a ribonucleasas. Los tipos celulares siguientes se proporcionan con fines ilustrativos, aunque pueden utilizarse rutinariamente otros tipos celulares, con la condición de que la diana se expresa en el tipo celular seleccionado.

5 Se cultivaron células en el medio apropiado tal como se indica posteriormente y se mantuvieron a 37°C bajo una humedad de 95%-98% y con 5% de CO₂. Las células se subcultivaron rutinariamente 2 a 3 veces a la semana.

- BNCL-2: la línea celular de hígado de ratón BNCL-2 se obtuvo de la ATCC y se cultivó en DMEM (Sigma) con FBS al 10% + Glutamax I + aminoácidos no esenciales + gentamicina.

10 - Hepa1-6: la línea celular de hígado de ratón Hepa1-6 se obtuvo de la ATCC y se cultivó en DMEM (Sigma) con FBS al 10% + Glutamax I + aminoácidos no esenciales + gentamicina.

- HepG2: la línea celular de hígado de ratón HepG2 se obtuvo de la ATCC y se cultivó en Eagle MEM (Sigma) con SFB al 10% + Glutamax I + aminoácidos no esenciales + gentamicina.

15 EJEMPLO 15: tratamiento con terapéuticos de ARNipis

Se utilizaron los ejemplos siguientes a título ilustrativo de cómo pueden utilizarse complejos de ARNipis en la regulación negativa de una diana terapéutica. En general, pueden utilizarse ARNipis utilizando procedimientos similares a los utilizados para oligonucleótidos de ARNip o antisentido. Sin embargo, resulta preferente que los complejos de ARN estén acomplejados con colesterol o se formulen con quitosano, tal como se ha indicado anteriormente. Típicamente se requieren una dosis de ARNipis (o ARNip) entre 3 y 5 veces la dosis de oligonucleótido antisentido.

Por ejemplo, ver los protocolos detallados que se dan a conocer en:

- 25 Bcl2: documento nº WO2005/061710
 survivina: documento nº WO2006/050732
 Hif1-alfa: documento nº WO2006/050734
 P21-ras: documento nº PCT/ES2007/000430
 Apo-B: documento nº PCT/ES2006/000481

30 Se conocen de la técnica anterior numerosos diseños terapéuticos de ARNip. El presente análisis los somete a ensayo en forma de ARNipis, tal como terapéuticos de ANBipis. Convenientemente se utilizan ARNipis con diana en ApoB.

35 EJEMPLO 16: tratamiento con oligonucleótido antisentido

se sembraron células BNCL-2 y Hepa1-6 en placas de 12 pocillos a 37°C (5% de CO₂) en medio de cultivo complementado con FBS al 10%, Glutamax I y gentamicina. Al llegar las células a una confluencia de 60-70%, se transfectaron por duplicado con diferentes concentraciones de oligonucleótidos (0,04 a 25 nM) utilizando lipofectamina 2000 (5 µg/ml). Las transfecciones se llevaron a cabo esencialmente tal como describen Dean et al., (JBC 269:16416-16424, 1994). Brevemente, las células se incubaron durante 10 min. con lipofectamina en OptiMEM seguido de la adición de oligonucleótido a un volumen total de 0,5 ml de mezcla de transfección en cada pocillo. Tras 4 horas, se sacó la mezcla de transfección, se lavaron las células y se cultivaron a 37°C durante aproximadamente 20 horas (análisis de ARNm y análisis de las proteínas) en el medio de cultivo apropiado. A continuación las células se recolectaron para el análisis de las proteínas y el ARN.

EJEMPLO 17: Extracción de ARN y síntesis del ADNc

Aislamiento del ARN total

50 Se aisló el ARN total utilizando el minikit RNeasy (Qiagen). Las células se lavaron con PBS y tampón de lisis celular (RTL, Qiagen) complementado con mercaptoetanol al 1% añadido directamente a los pocillos. Tras unos cuantos minutos, se procesaron las muestras siguiendo las instrucciones del fabricante.

55 Síntesis de primera cadena

La síntesis de primera cadena se llevó a cabo utilizando el kit de transcriptasa inversa OmniScript o transcriptasa inversa de M-MLV (esencialmente tal como indica el fabricante (Ambion)) siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen). Al utilizar la transcriptasa inversa OmniScript, 0,5 µg de ARN total en cada muestra, se ajustó a 12 µl y se mezcló con 0,2 µl de poli(dT)₁₂₋₁₈ (0,5 µg/µl) (Life Technologies), 2 ml de mezcla de dNTP (5 mM cada uno), 2 µl de 10x tampón RT, 0,5 µl de inhibidor de ARNasa RNAGuardTM (33 unidades/ml, Amersham) y 1 µl de transcriptasa inversa OmniScript, seguido de la incubación a 37°C durante 60 min. y la inactivación por calor a 93°C durante 5 min.

Tras llevar a cabo la síntesis de primera cadena utilizando decámeros aleatorios y transcriptasa inversa de M-MLV (esencialmente tal como indicaba el fabricante (Ambion)), se ajustaron 0,25 µg de ARN total de cada muestra a 10,8 µl en H₂O. Se añadieron 2 µl de decámeros y 2 µl de mezcla de dNTP (2,5 mM cada uno). Se calentaron muestras a 70°C durante 3 min. y se enfriaron inmediatamente en agua helada y se añadieron 3,25 ml de una mezcla que contenía 2 µl de 10x tampón RT, 1 µl de transcriptasa inversa de M-MLV, 0,25 µl de inhibidor de ARNasa. Se sintetizó el ADNc a 42°C durante 60 min. seguido de la etapa de inactivación por calor a 95°C durante 10 min. y finalmente se enfrió a 4°C.

EJEMPLO 18: análisis de la inhibición con oligonucleótidos de la expresión de Apo-B100 mediante PCR en tiempo real

La modulación con antisentido de la expresión de ApoB-100 puede someterse a ensayo en una diversidad de modos conocidos de la técnica. Por ejemplo, los niveles de ARNm de ApoB-100 pueden cuantificarse mediante, por ejemplo, análisis de transferencia northern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) competitiva o PCR en tiempo real. La PCR cuantitativa en tiempo real actualmente resulta preferente. El análisis del ARN puede llevarse a cabo en ARN celular total o en ARNm.

Los métodos de aislamiento de ARN y de análisis de ARN tales como el análisis de transferencia northern son rutinarios en la técnica y se enseñan en, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons. La PCR cuantitativa en tiempo real puede llevarse a cabo convenientemente utilizando el sistema de detección de PCR en tiempo real iQ Multi-Color comercialmente disponible de BioRAD. La PCR cuantitativa en tiempo real es una técnica bien conocida y se enseña en, por ejemplo, Held et al., Real time quantitative PCR, Genome Research 6: 986-994.

Análisis de PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de ARNm de Apo-B100

Con el fin de determinar el nivel relativo de ARNm de ApoB de ratón en muestras tratadas y no tratadas, el ADNc generado se utilizó en el análisis de PCR cuantitativa utilizando un iCycler de BioRad.

A 8 µl de ADNc diluido 5 veces (Gapdh y beta-actina) se añadieron 52 µl de una mezcla que contenía 29,5 µl de qPCR Platinum.

Supermix-UDG (Invitrogen), 1030 nM de cada cebador, 0,57 X SYBR verde (Molecular Probes) y 11,4 nM de fluoresceína (Molecular Probes).

Se sometieron 25 µl por duplicado a Q-PCR: 50°C durante 120 s, 95°C durante 120 s y 40 ciclos [95°C durante 30 s y 60°C durante 60 s].

Se cuantificó la expresión de ApoB utilizando un ADNc diluido 50 veces y un protocolo de Q-PCR estándar. Los cebadores (conc. final de cebadores directo e inverso: 0,6 mM y 0,9 mM) y sonda (conc. final: 0,1 mM) se mezclaron con 2x supermezcla UDG de PCR cuantitativa Platinum (nº de cat. 11730, Invitrogen) y se añadieron a 3,3 µl de ADNc hasta un volumen final de 25 µl. Se analizó cada muestra por duplicado. Programa de PCR: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C, 15 segundos y 60°C, 1 minuto.

Se normalizó la expresión del ARNm de ApoB respecto a la β-actina de ratón o el ARNm de Gapdh, que se cuantificó de manera similar utilizando QPCR.

Cebadores:

mGapdh: 5'-agcctcgctcccgtagacaaaat-3' (SEC ID nº 73) y 5'-gttgatggcaacaatctccactt-3' (SEC ID nº 74)

mβ-actina: 5'-ccttctcttgggtatggaa-3' (SEC ID nº 75) y 5'-gctcaggaggagcaatgatct-3' (SEC ID nº 76)

mApoB: 5'-gccattgtggacaagttgatc-3' (SEC ID nº 77) y 5'-ccaggactggaggcttggga-3' (SEC ID nº 78)

sonda Taqman de mApoB: 5'-fam-aagccagggcctatctccgatcc-3' (SEC ID nº 79)

Se utilizaron diluciones de 2 veces de ADNc sintetizado a partir de la línea celular de hepatocitos de ratón no tratados (células Hep1-6) (diluidos 5 veces y que expresaban tanto ApoB como β-actina o Gapdh) para preparar curvas de estándares para los ensayos. Se determinaron las cantidades relativas de ARNm de ApoB a partir del ciclo umbral calculado utilizando el software del sistema de detección en tiempo real iCycler iQ.

EJEMPLO 19: análisis de transferencia western de los niveles de proteína Apo-B100

Se determinó mediante transferencia western el efecto in vitro de los oligos de Apo-B100 sobre los niveles de proteína Apo-B100 en células transfectadas.

Se recolectaron las células y se lisaron en Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, glicerol al 10%, SDS al 2,5%, DTT 5 mM y urea 6 M complementada con cóctel de inhibidor de proteasa (Roche). Se midieron las concentraciones de proteínas totales utilizando un kit de ensayo de proteína BCA (Pierce). Se hicieron migrar 50 µg de proteínas totales en geles de Bis-Tris al 10-12% en tampón MOPS o en geles de Tris-acetato al 3-8% y se transfirieron a membranas de PVDF siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Tras la incubación durante la noche en tampón de bloqueo (PBS-T complementado con leche desnatada en polvo al 5%), las membranas se incubaron durante la noche con anticuero primario de detección de ApoB-100. Como control de carga se detectó tubulina o actina utilizando anticuerpos monoclonales de Neomarker. A continuación, se incubaron las membranas con anticuerpos secundarios y se visualizó ApoB-100 utilizando un kit de inmunodetección cromogénico (Invitrogen) o un kit de detección ECL⁺ de quimioluminiscencia (Amersham).

EJEMPLO 20: inhibición con antisentido de la expresión de Apo-B100 humana utilizando oligonucleótidos antisentido

Según la presente invención, se diseñó una serie de oligonucleótidos de ARNipis con diana en diferentes regiones del ARNipis de Apo-B100 humana. Se evaluaron los compuestos para su potencial de inactivación del ARNm de Apo-B100 en hepatocitos de ratón (células Hepa1-6) tras la incorporación asistida por lípidos y la comparación de la inactivación de Apo-B100 en BNLCL2 por complejos de ARNipis y en células Hepa1-6.

Se realizó un seguimiento del estado de equilibrio de transcritos mediante PCR en tiempo real y se normalizó respecto al estado de equilibrio de transcritos de GAPDH. Aparentemente del análisis inicial se concluye que ARNipis resulta efectivo.

EJEMPLO 20: regulación negativa in vivo de la diana con compuestos oligonucleótidos que contienen ANB

En ratones C57BL/6 (20 g) se administraron 50 mg/kg i.v. en tres días consecutivos (tamaño de grupo: 7 ratones) de ARNipis redisueltos en solución salina al 0,9% (NaCl) y se les proporcionaron 10 ml/kg de peso corporal (~0,2 ml en cada inyección). En el momento del sacrificio se registró el peso del hígado. Los tejidos para la medición de la expresión del ARNm de ApoB se almacenaron en RNAlater (Ambion) a -20°C hasta la utilización. Se llevó a cabo el análisis del ARNm en yeyuno e hígado, y del colesterol total en el plasma, 24 h después de la última inyección i.v.

EJEMPLO 21: niveles de colesterol en plasma

Se midió el nivel del colesterol total en plasma utilizando un ensayo colorimétrico Cholesterol CP de ABX Pentra. Se midió el colesterol tras la hidrólisis y oxidación enzimáticas. Se añadieron 21,5 µl de agua a 1,5 µl de plasma. Se añadieron 250 µl de reactivo y dentro de los 5 min. posteriores se midió el contenido de colesterol a una longitud de onda de 540 nm. Las mediciones en cada animal se realizaron por duplicado. Se sometió a ensayo la sensibilidad y linealidad con un compuesto de control (control de ABX Pentra N) diluido 2 veces. Se determinó el nivel relativo de colesterol restando el fondo y se expresó respecto a los niveles de colesterol en plasma de ratones tratados con solución salina.

EJEMPLO 22: regulación negativa in vivo de la diana con compuestos oligonucleótidos de ANB

Los ratones C57BL/6 (20 g) recibieron 25 o 50 mg/kg i.v. en tres días consecutivos (tamaño del grupo: 7 ratones). Se disolvieron los constructos de ARNipis en solución salina al 0,9% (NaCl) y se les proporcionaron 10 ml/kg de peso corporal (~0,2 ml en cada inyección). Los tejidos para la medición de la expresión del ARNm de ApoB se almacenaron para su uso posterior (Ambion) a -20°C hasta la utilización. Se llevó a cabo el análisis del ARNm en yeyuno e hígado, y del colesterol total y colesterol-LDL en el plasma, 24 h después de la última inyección i.v.

Aparentemente los constructos de ARNipis con diana en ApoB pueden resultar efectivos en la regulación negativa del ARNm de ApoB, de proteína ApoB y de los niveles relativos de colesterol.

Se ilustran ejemplos adicionales en las figuras 19 a 27.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Complejo de ARN capaz de mediar en la interferencia del ARN, que comprende una región nuclear de doble cadena de entre 15 y 40 pares de bases, comprendiendo dicha región nuclear de doble cadena una cadena antisentido y una cadena pasajera discontinua que se hibrida con la cadena antisentido, en la que la discontinuidad en la cadena pasajera es una muesca, o un hueco de 1 o 2 nucleótidos, y en la que el complejo de ARN comprende análogos de nucleótido de ANB que incrementan la temperatura de fusión de la región nuclear de doble cadena y en la que la cadena pasajera discontinua comprende una primera y una segunda moléculas de ARN que conjuntamente forman la cadena pasajera discontinua.
- 10 2. Complejo de ARN según la reivindicación 1, en el que la discontinuidad en la cadena pasajera es una muesca.
- 15 3. Complejo de ARN según la reivindicación 1 o 2, en el que la primera y la segunda moléculas de ARN comprenden por lo menos un análogo de nucleótido de ANB.
- 20 4. Complejo de ARN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la cadena antisentido comprende por lo menos un análogo de nucleótido de ANB dentro de la región dúplex formada con la cadena pasajera discontinua.
- 25 5. Complejo de ARN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la primera y/o la segunda moléculas de ARN de la cadena pasajera discontinua comprende por lo menos un análogo de nucleótido de ANB y la cadena antisentido comprende por lo menos un análogo de nucleótido de ANB dentro de la región dúplex formada con la cadena pasajera discontinua.
- 30 6. Complejo de ARN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la cadena pasajera comprende entre 2 y 10 análogos de nucleótido de ANB.
- 35 7. Complejo de ARN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la primera molécula de ARN de la cadena pasajera discontinua comprende por lo menos 2 análogos de nucleótido de ANB.
- 40 8. Complejo de ARN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la segunda molécula de ARN de la cadena pasajera discontinua comprende por lo menos 2 análogos de nucleótido de ANB.
- 45 9. Complejo de ARN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la cadena antisentido comprende entre 2 y 8 análogos de nucleótido de ANB.
- 50 10. Complejo de ARN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que por lo menos uno de los análogos de nucleótido de ANB presente en la cadena pasajera discontinua forma un par de bases con un análogo de nucleótido de ANB complementario presente en la cadena antisentido.
- 55 11. Complejo de ARN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la cadena antisentido y la cadena pasajera o ambas de dicho complejo de ARN comprenden un extremo 3'-protuberante de 1 a 3 nucleótidos.
12. Complejo de ARN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la región nuclear de doble cadena de dicho complejo de ARN comprende un número de pares de bases seleccionado de entre el grupo de 18 pares de bases, 19 pares de bases, 20 pares de bases, 21 pares de bases, 22 pares de bases y 23 pares de bases.
13. Complejo de ARN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la primera molécula de ARN de la cadena pasajera presenta una longitud de entre 8 y 13 nucleótidos y la segunda molécula de ARN de la cadena pasajera presenta una longitud de entre 8 y 14 nucleótidos.
14. Complejo de ARN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la nucleobase situada más hacia el extremo 5' de la cadena antisentido es una unidad de nucleótido de ARN.
15. Complejo de ARN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la utilización a modo de medicamento.

Figura 1A



Figura 1B

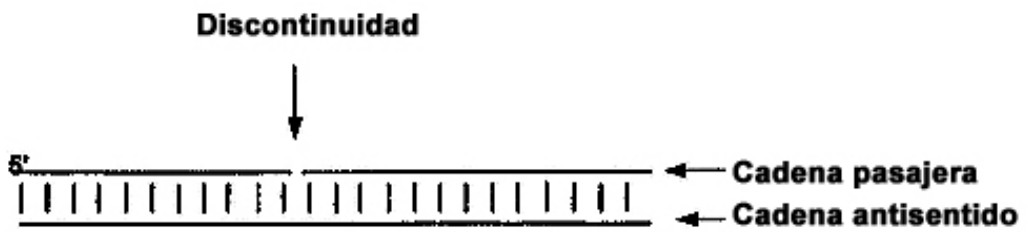


Fig. 1

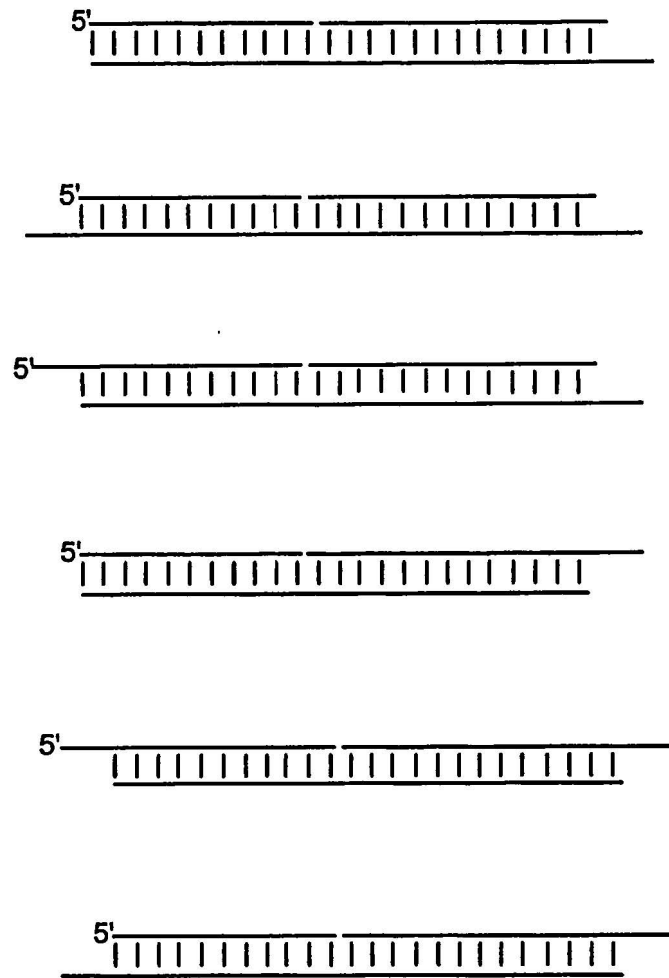


Fig. 2

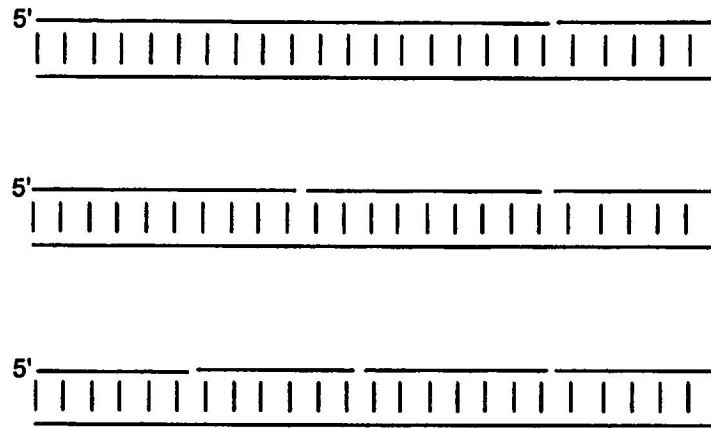


Fig. 3

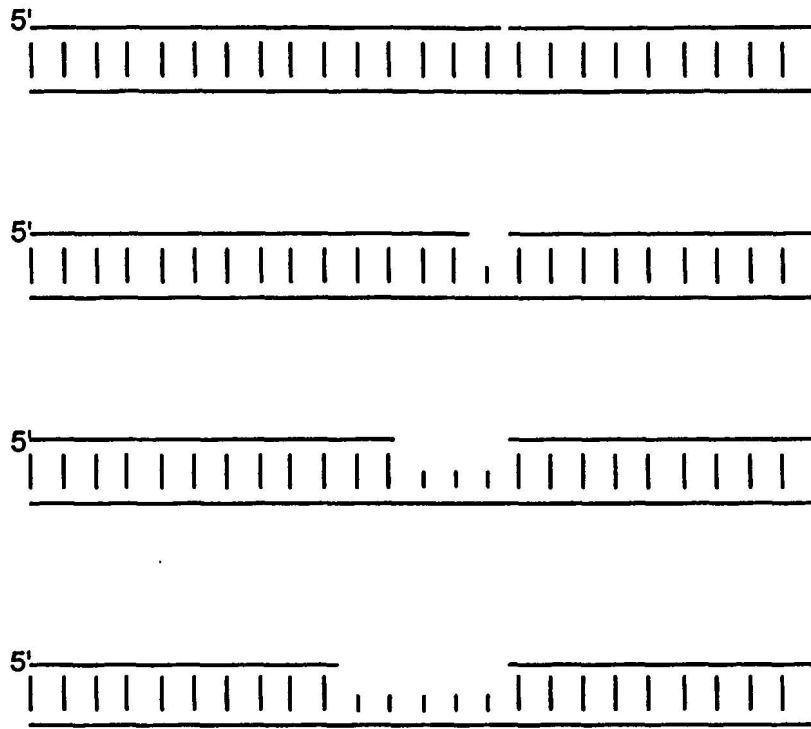


Fig. 4

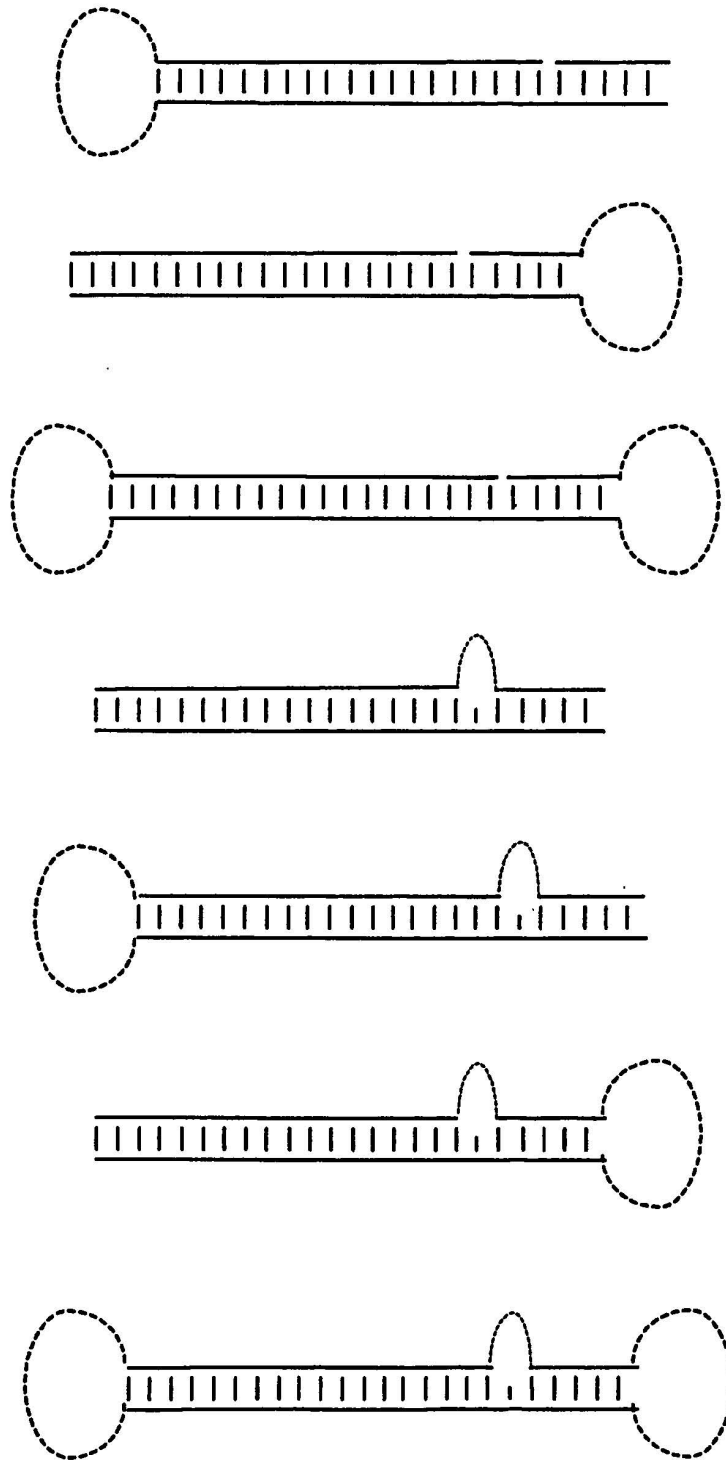


Fig. 5

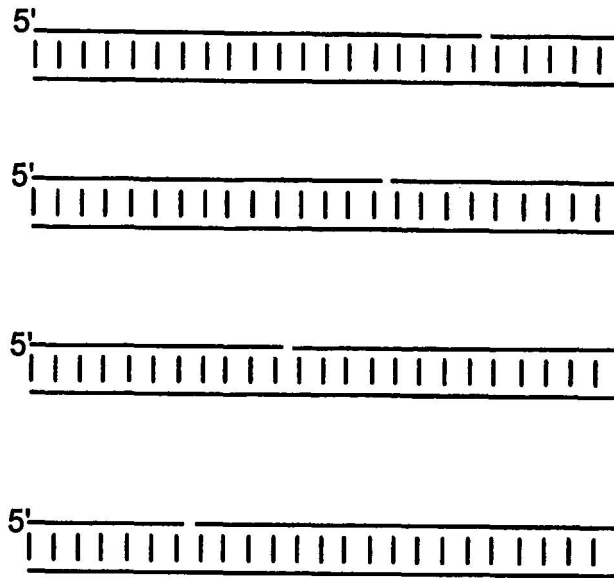


Fig. 6

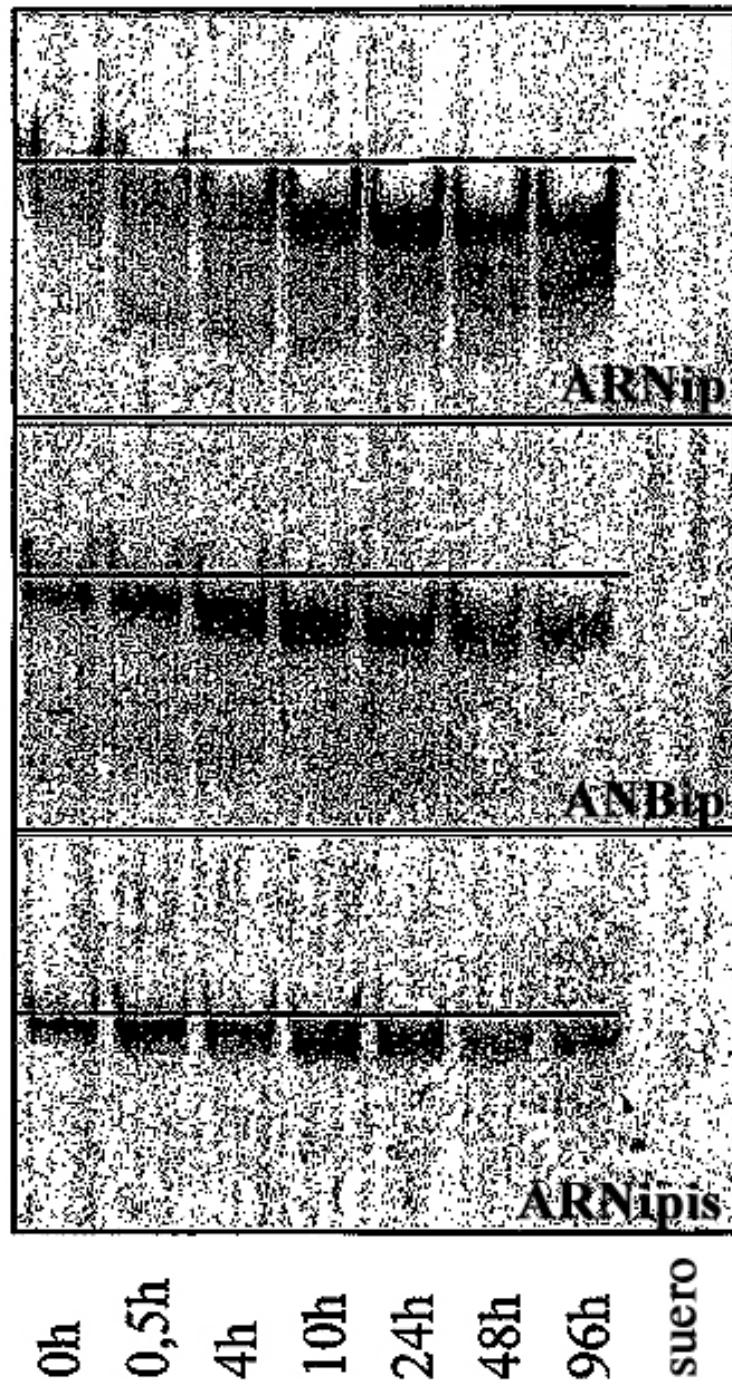
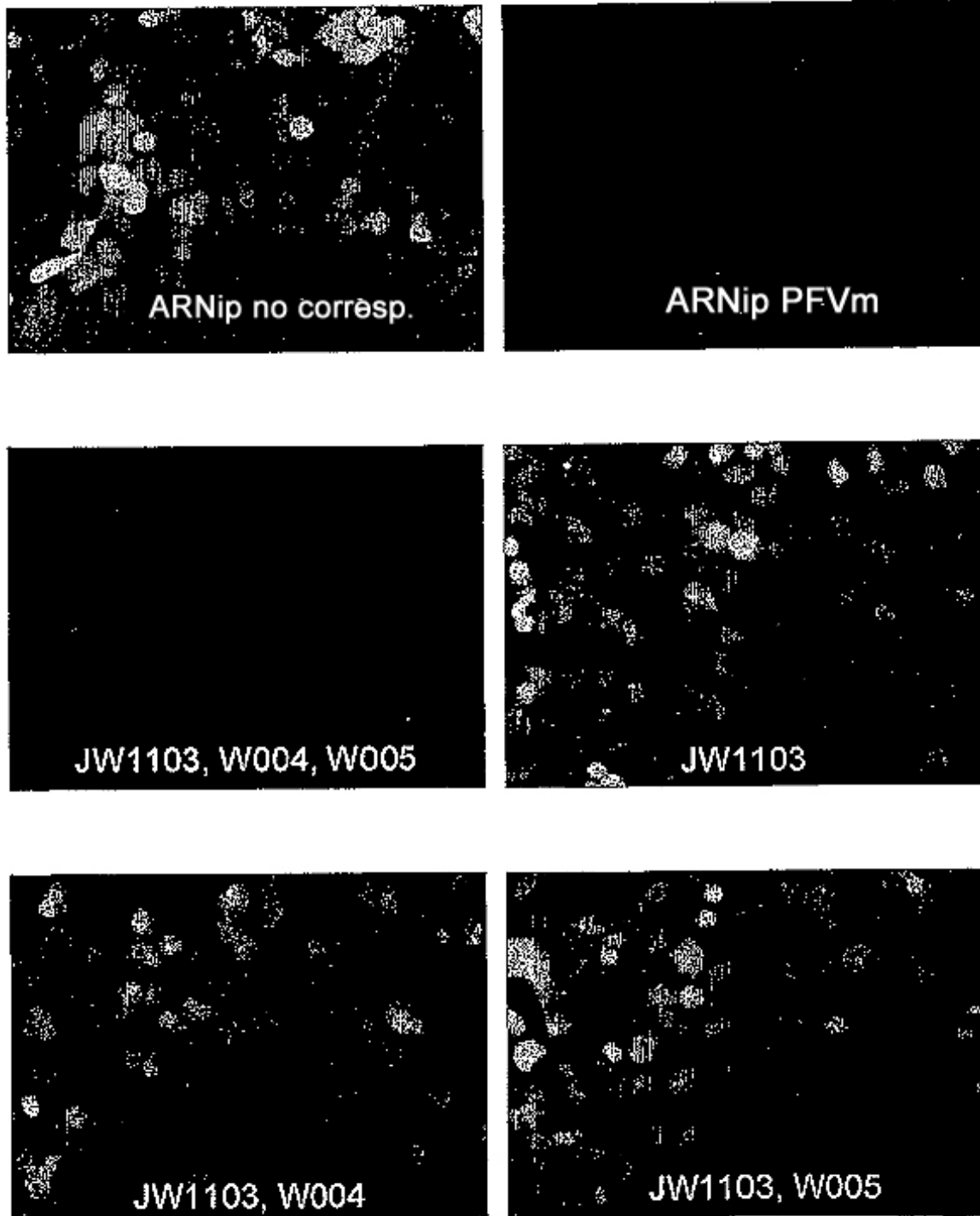


Fig. 7



48 horas 50 nM

Fig. 8

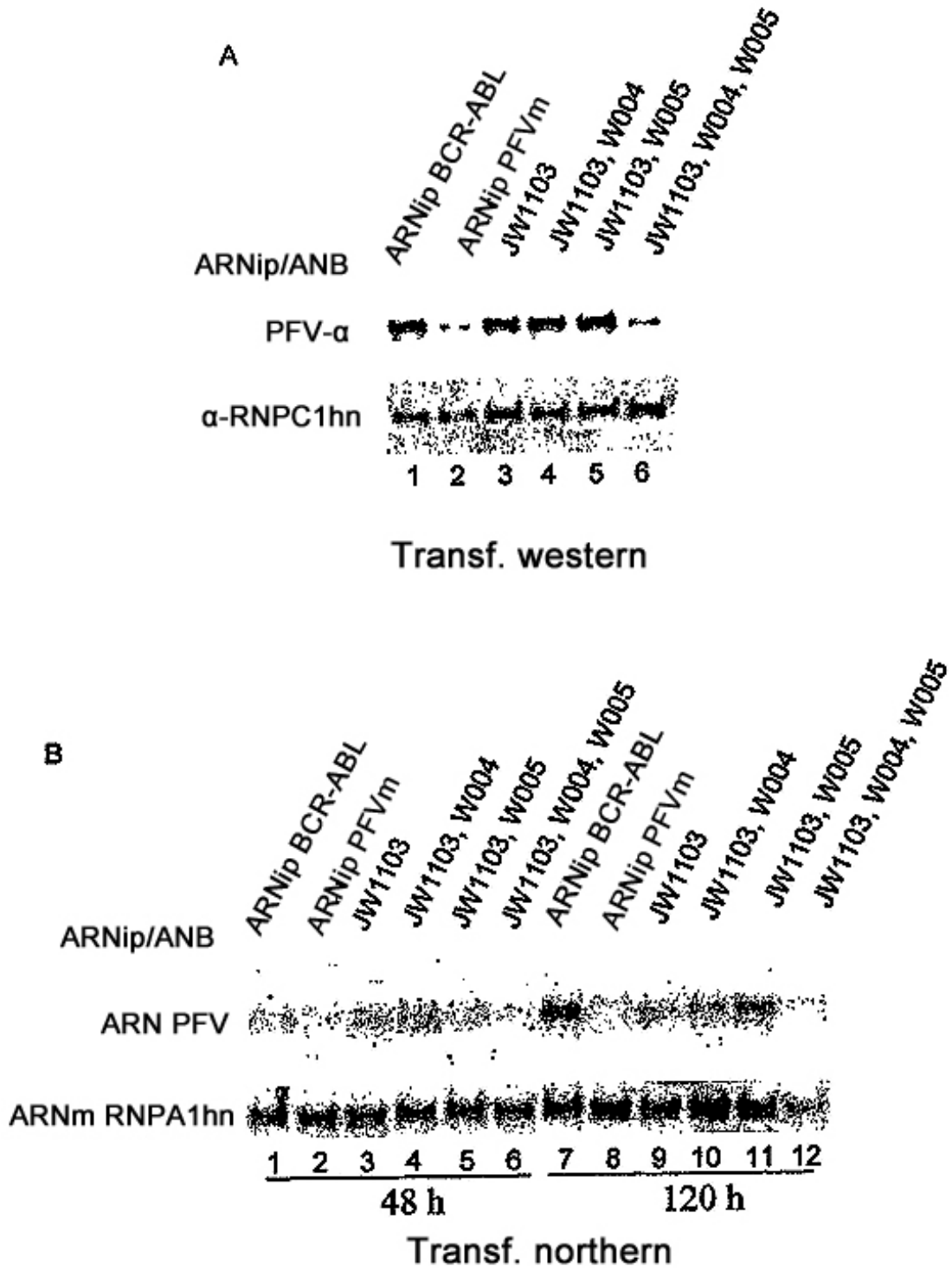


Fig. 9

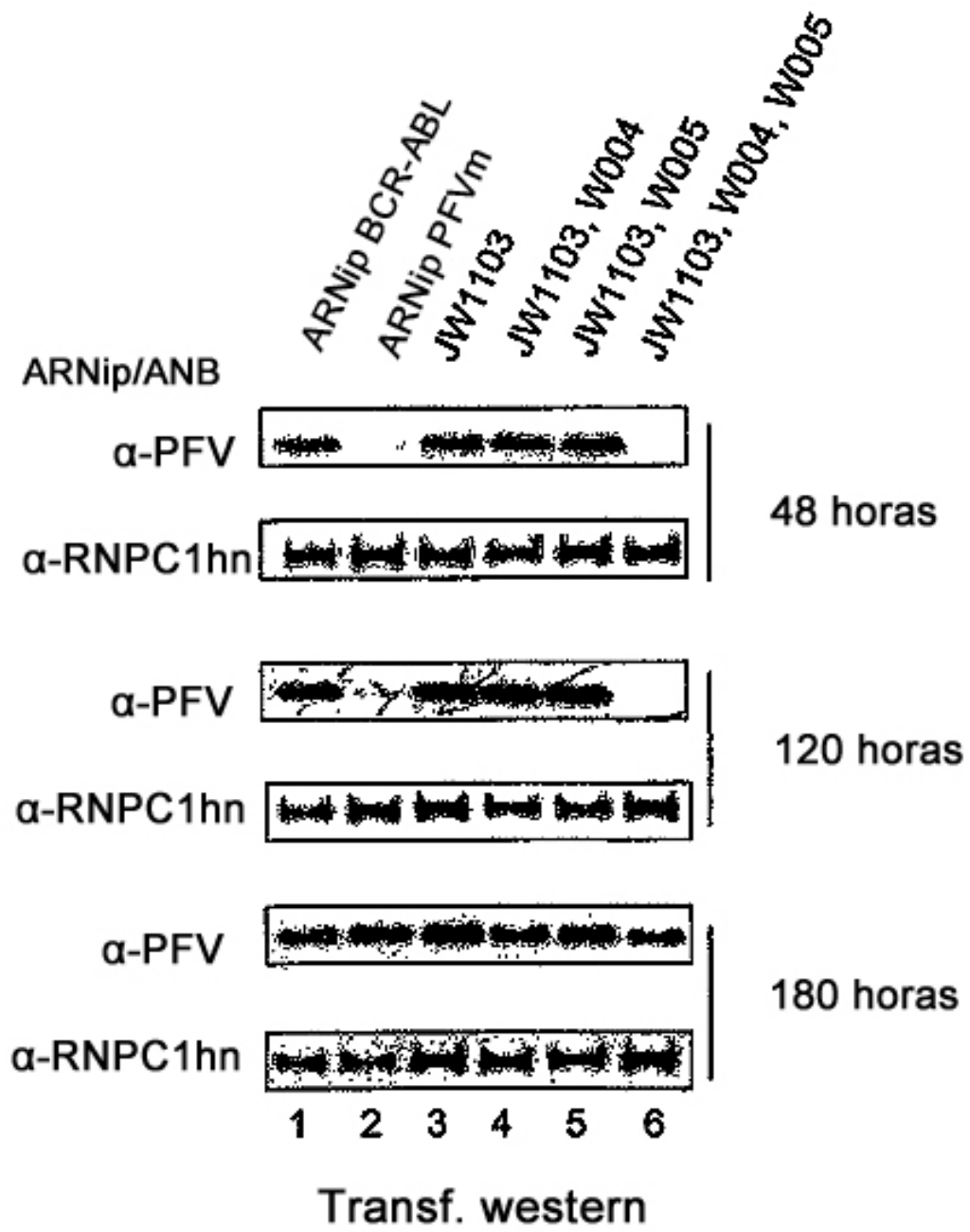


Fig. 10A

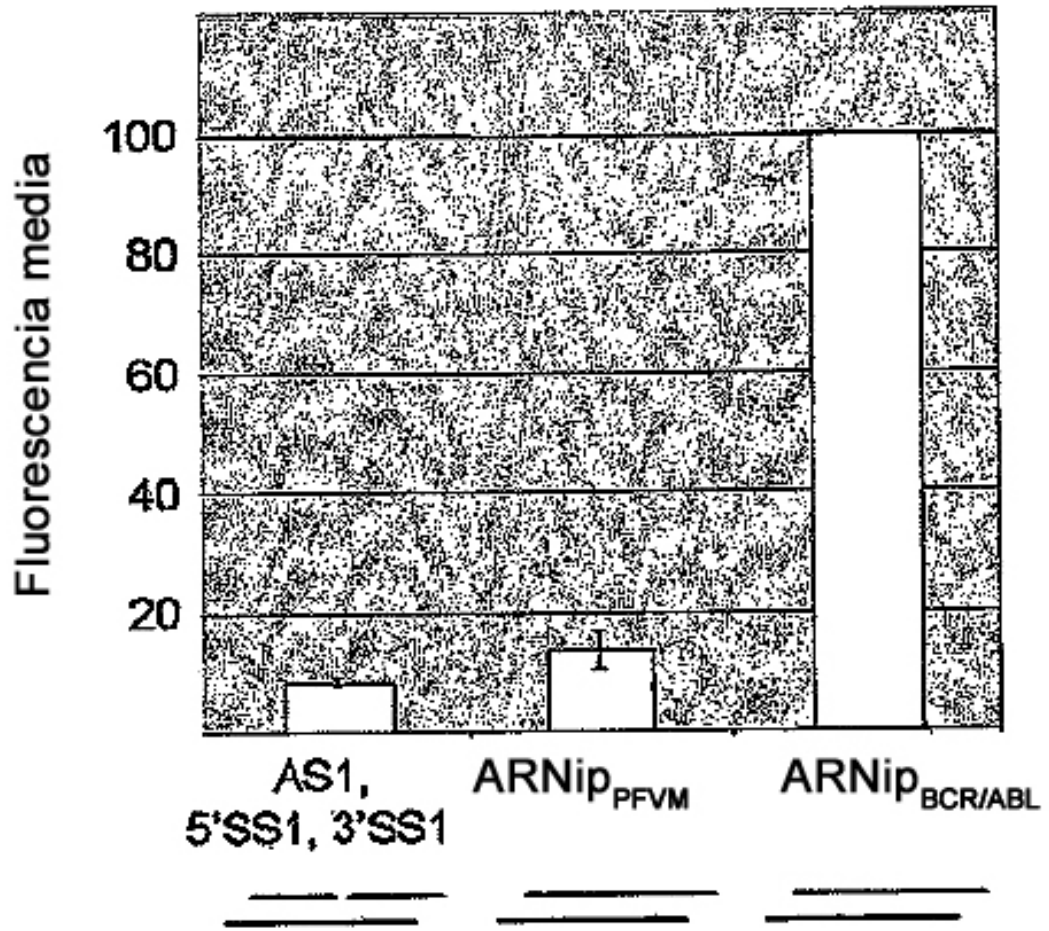
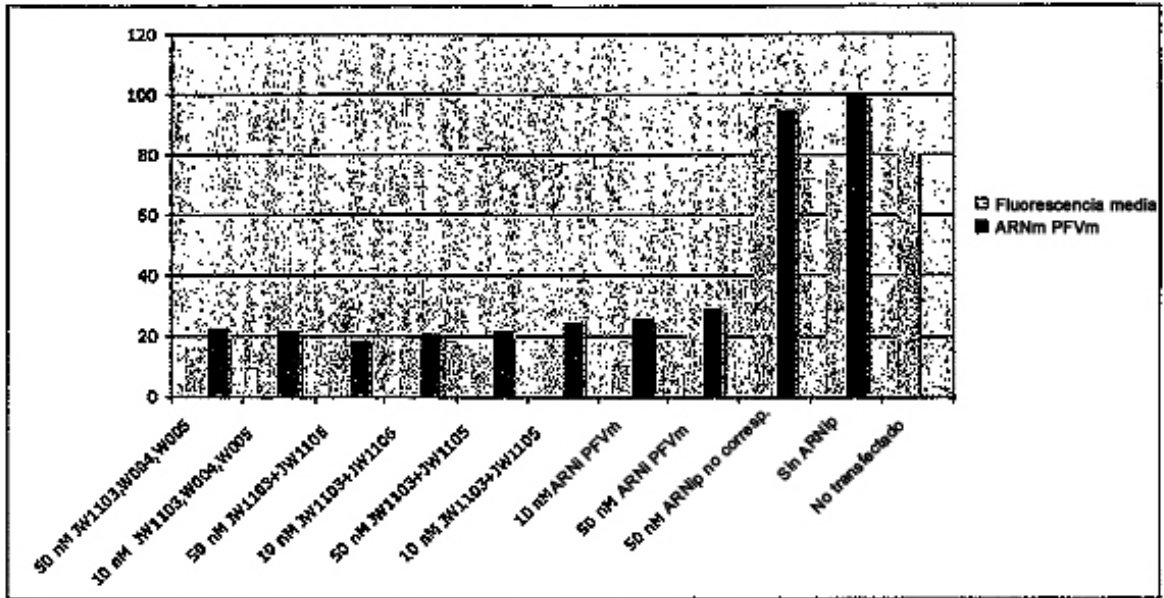


Fig. 10B

A.



B.

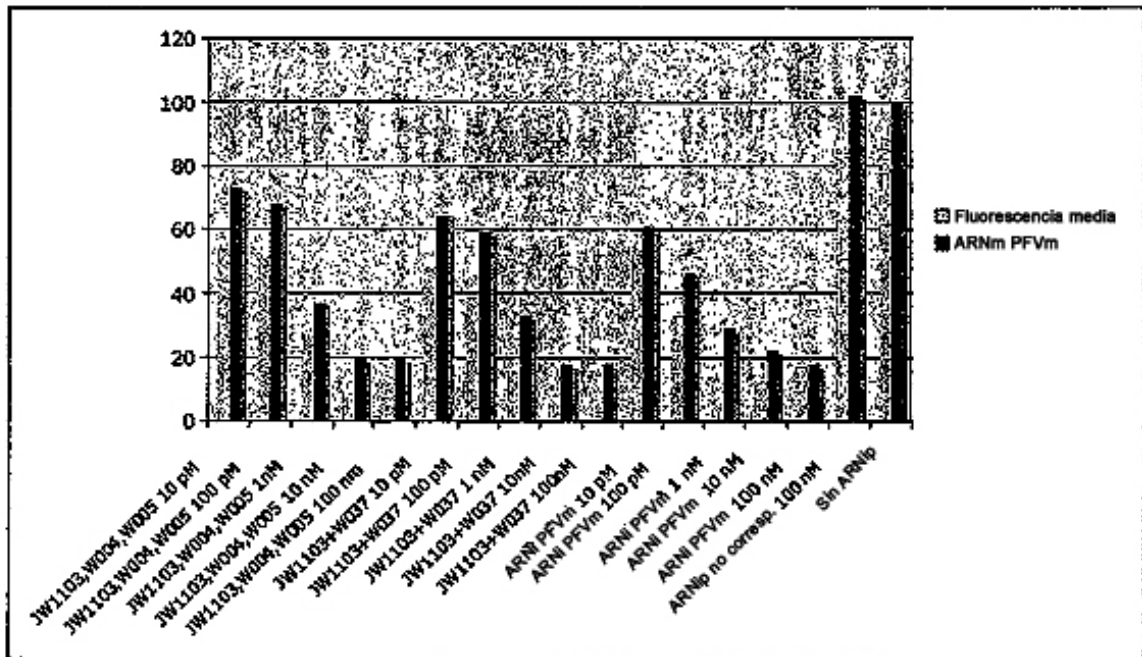


Fig. 11

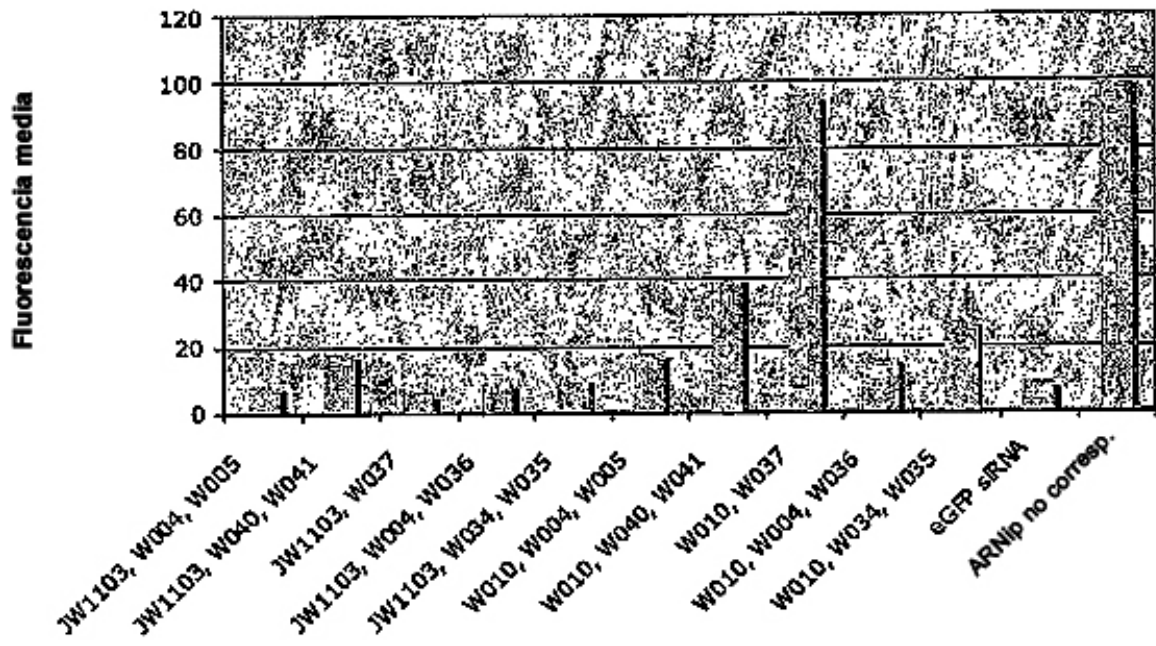


Fig. 12

Inducción de ISG56 tras la transfección de ARN en células T98G

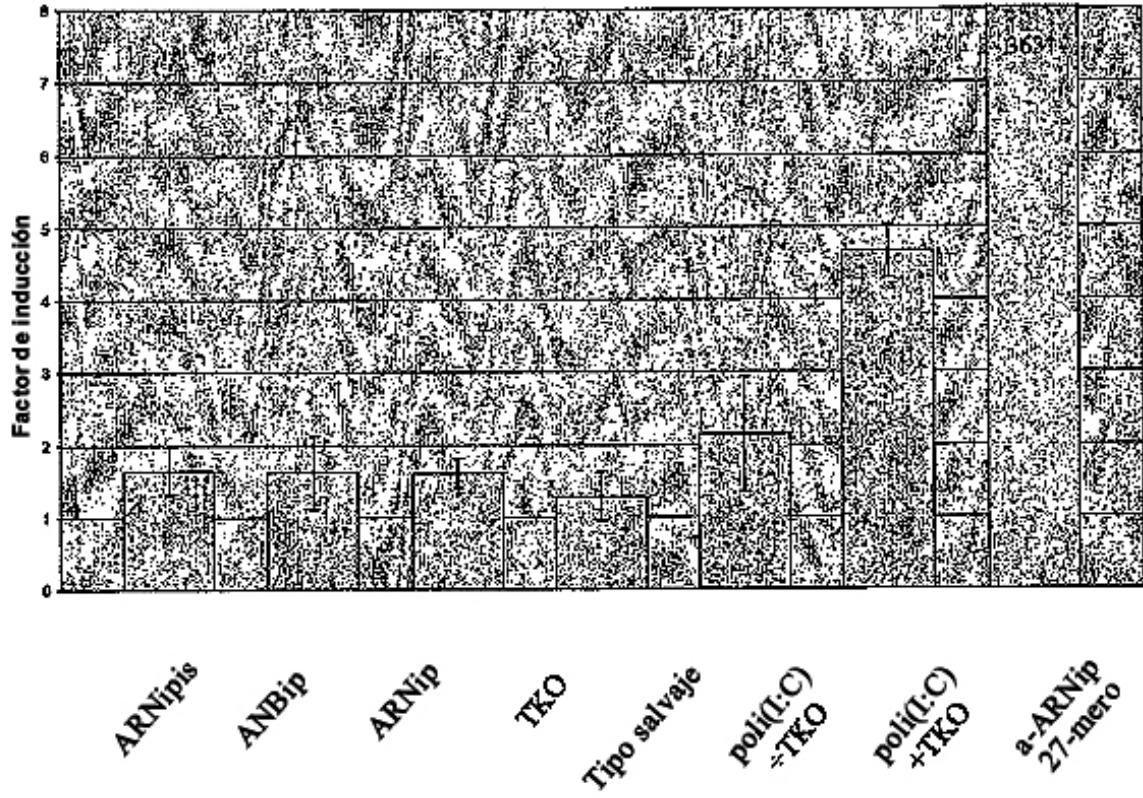
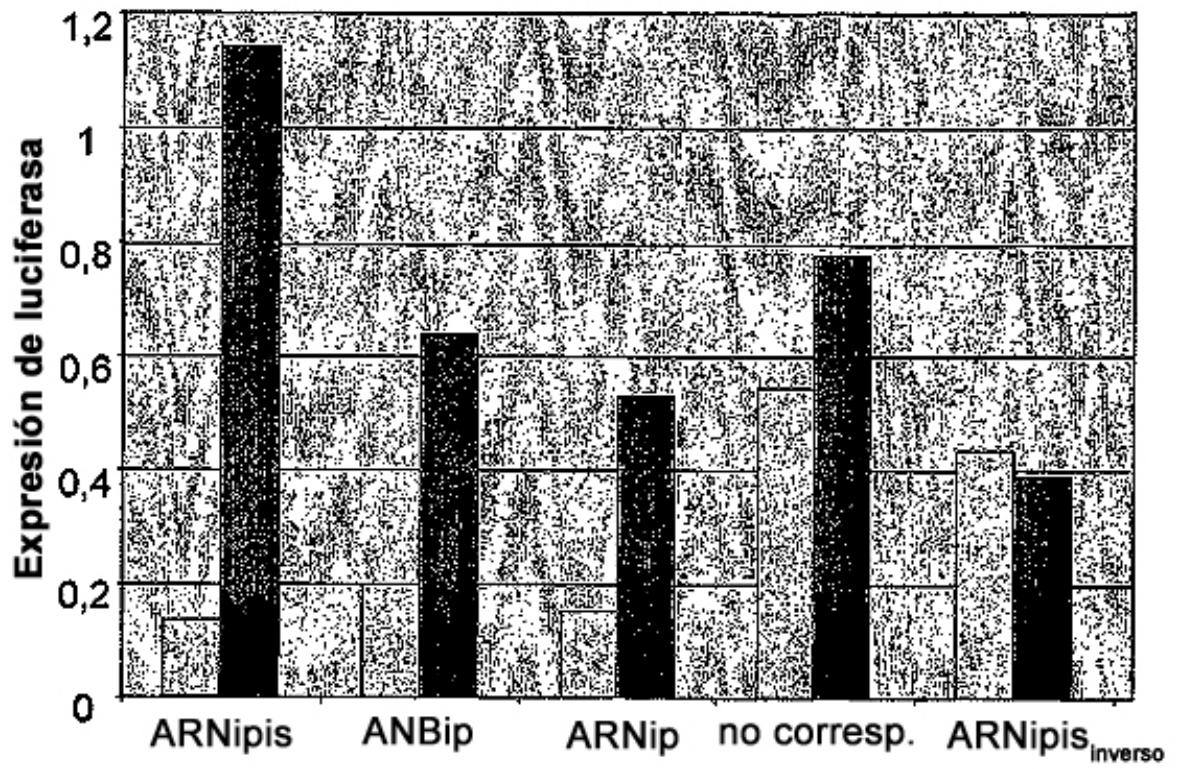


Fig. 13



- sentido diana
- inespecífico

Fig. 14

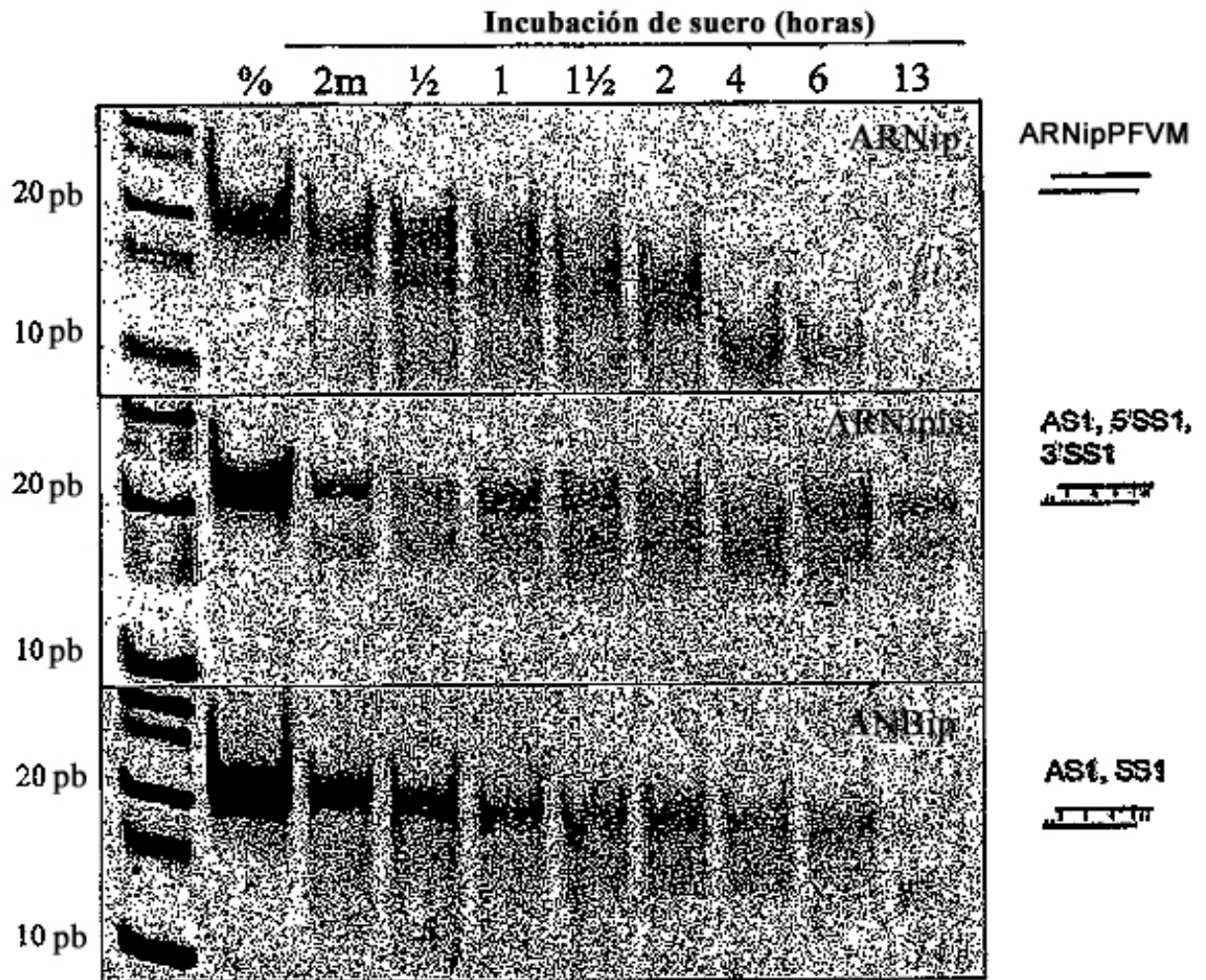


Fig.15A

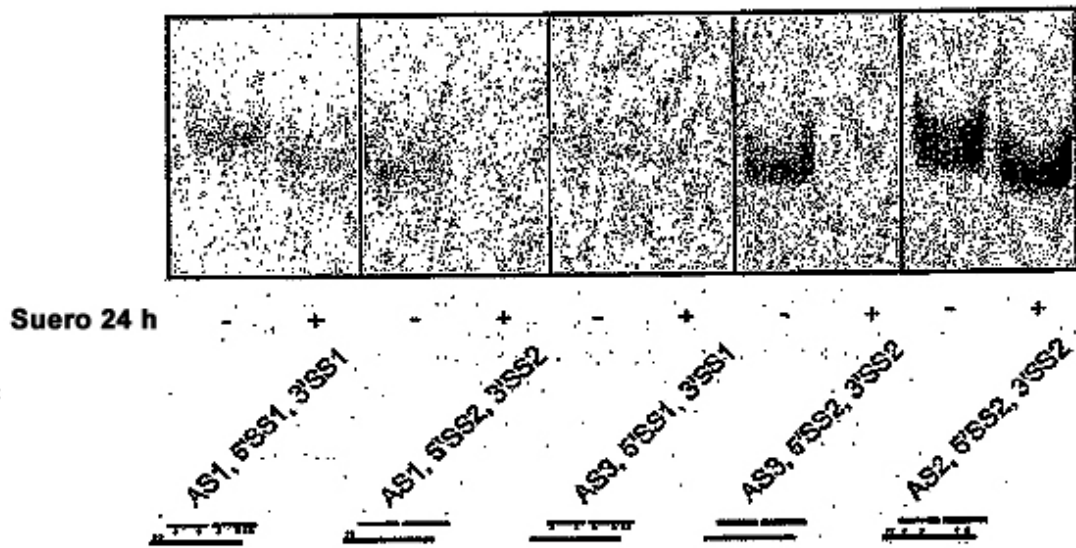


Fig.15B

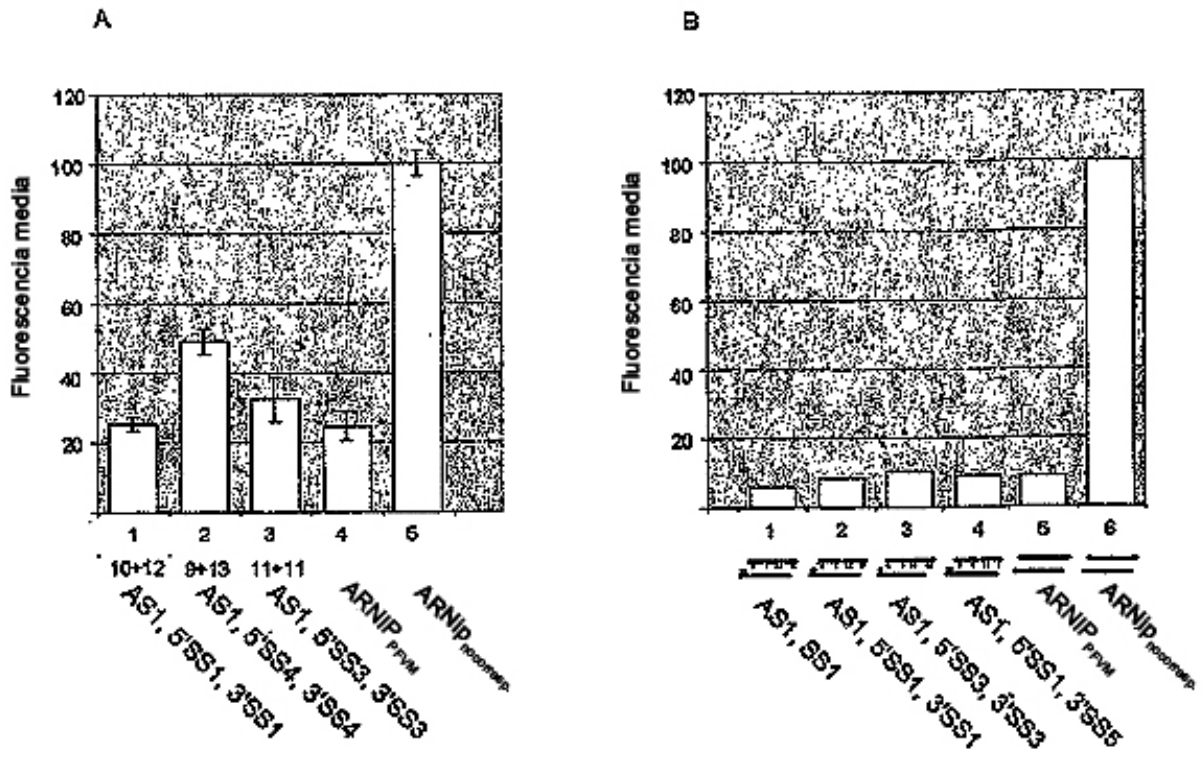


Fig.16

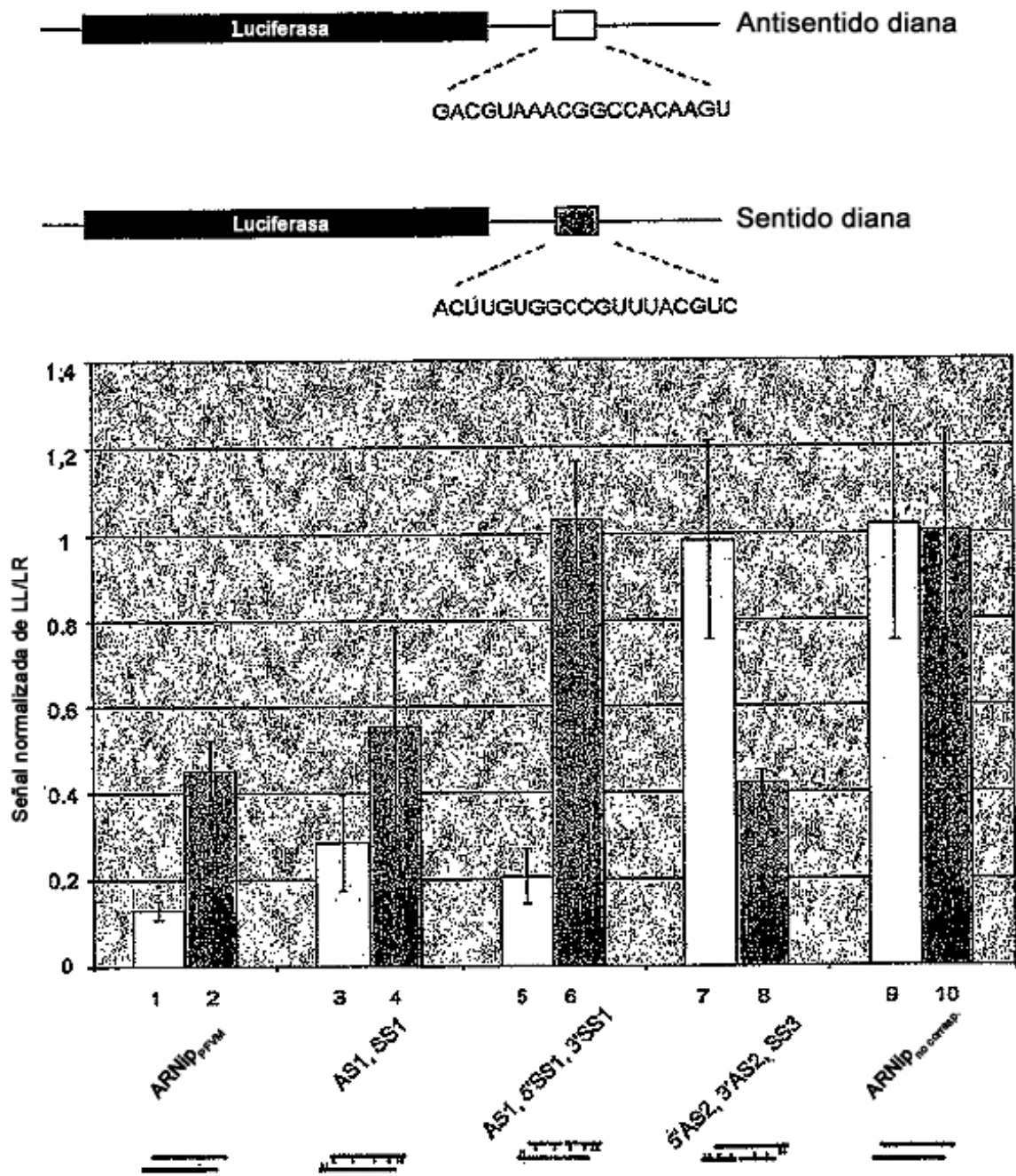
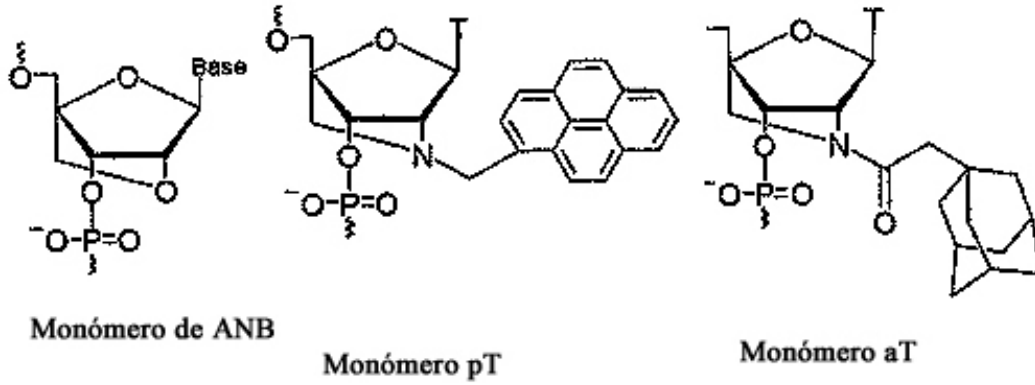


Fig.17

A



B

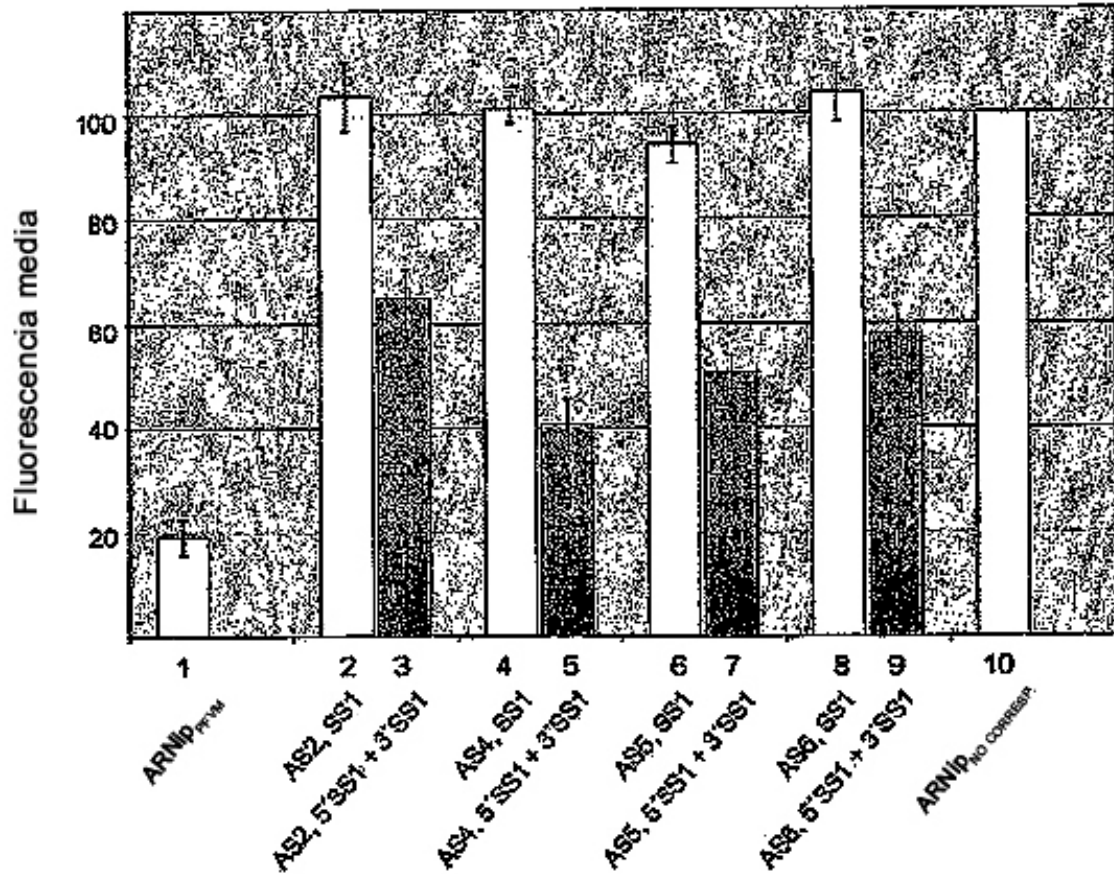


Fig.18 A y B

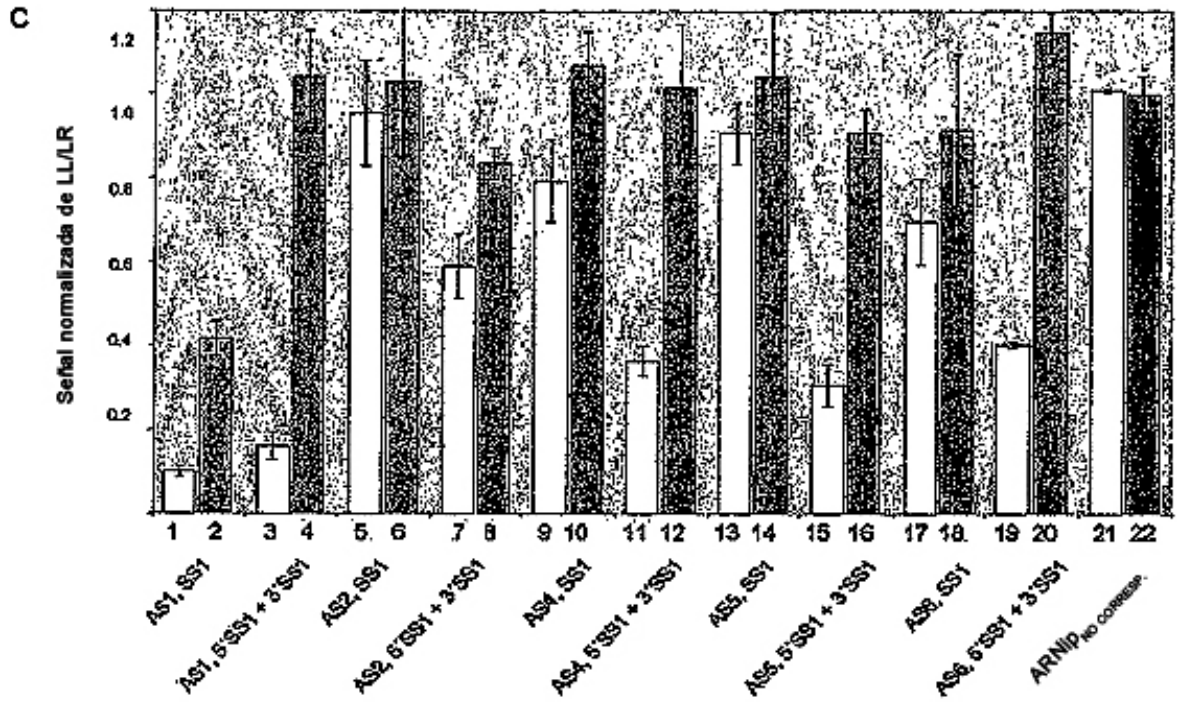


Fig.18C

ARNipis con cadena antisentido funcionalizada			
<u>Sentido / Antisentido (5 nM)</u>	<u>Monómeros</u>	<u>PFV media</u>	<u>ARNm PFVM</u>
<u>GACGUAAACGGCCACAAGUUCU-3'</u>	ARN		
3'- <u>UCGCUGCAUUUGCCGGUGUUCA</u>	ARN	13%	16%
<u>rrLrrrrrLrrrLrLrrrrLLr-3'</u>	ARN / ANB		
3'-rLLrXrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	ARN / ANB	95%	100%
<u>rrLrrrrrLr</u>	ARN / ANB		
3'-rLLrXrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr	ARN / ANB	39%	50%

X=2'-adamantil-amino-ANB

Fig.25

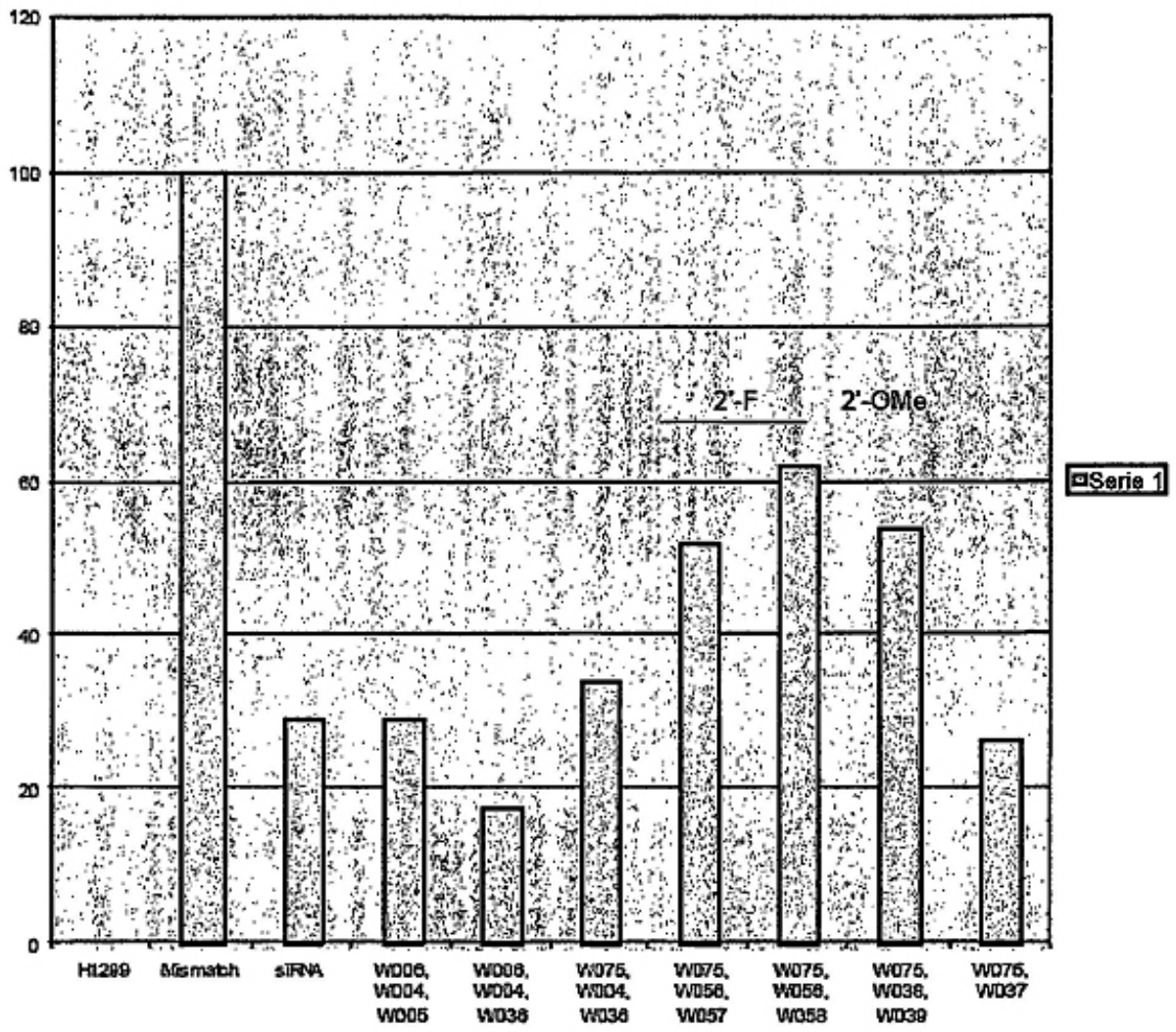


Fig 26

