

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 477**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2008** **E 08862702 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016** **EP 2226384**

54 Título: **Complejo de polisacárido y ARN bicatenario**

30 Prioridad:

18.12.2007 JP 2007326510

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

13.04.2016

73 Titular/es:

**NAPA JENOMICS CO., LTD. (100.0%)
CIIP 1304, 2-24-16, Nakacho
Koganei-shi, Tokyo 1848588, JP**

72 Inventor/es:

**KUBO, TAKANORI;
OHBA, HIDEKI;
SAKURAI, KAZUO;
MINARI, JUSAKU y
UNO, ATSUSHI**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 566 477 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

Complejo de polisacárido y ARN bicatenario

La presente invención se refiere a un complejo de polisacárido/ARN bicatenario, que es un complejo de ARN bicatenario capaz de inhibir la expresión de un gen diana y un polisacárido que tiene un esqueleto β -1,3-glucano, donde el complejo puede proporcionar de forma eficaz el efecto de interferencia de ARN mediado por la acción del ARN bicatenario; y además, mediante unión a una molécula funcional al polisacárido, el complejo también puede mostrar función útil mediada por la acción de la molécula funcional.

En los últimos años, el método de interferencia de ARN (iARN) usando un ARN bicatenario corto de 21 bases de longitud (ARN interferente pequeño: ARNip) ha estado atrayendo atención. De acuerdo con este método de iARN, se transfecta un ARN bicatenario largo de aproximadamente 100 pares de bases en una célula de modo que se digiera en fragmentos de ARN bicatenario de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 pares de bases de longitud por la acción de Dicer en el citoplasma. Los fragmentos de ARN después se combinan con una pluralidad de proteínas para formar un complejo de ARN/proteína (este complejo se menciona como "RISC": Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN), que se une a una región homólogo de ARNm producido a partir del gen diana y de ese modo inhibe de forma potente la expresión génica. El método principal usado hoy en día utiliza un ARN bicatenario de 21 bases de longitud sintetizado de forma química que tiene un extremo colgante de dos bases en el extremo 3'. Un informe reciente de J. Rossi et al. reveló que un ARN bicatenario de 27 pares de bases de longitud tiene un efecto de interferencia de ARN que es aproximadamente 100 veces mayor que el de un ARNip de 21 bases de longitud (véase el documento no de patente 1). Se considera que este gran efecto se consigue por la siguiente razón: después de escindirse un ARN de 27 pares de bases de longitud con una enzima tipo RNasa III, Dicer, en un ARNip de 21 bases de longitud, el ARNip se reconoce tal cual por el complejo proteico RISC, permitiendo que se muestren los efectos del ARNip con alta eficacia.

De acuerdo con el método anterior de interferencia de ARN usando un ARN sintético, la preparación de muestras es relativamente fácil y la manipulación es simple. Por lo tanto, el método ha estado atrayendo una gran cantidad de atención en el campo de la industria biotecnológica, así como en el campo de ciencias de la vida.

Sin embargo, incluso este excelente método de interferencia de ARN es insatisfactorio en términos de estabilidad intracelular, captación celular, localización intracelular, efecto inhibitorio de expresión génica, especificidad de diana, etc.; por consiguiente, se han deseado mejoras adicionales en estos aspectos. Recientemente, se han producido diversos ARNip modificados químicamente para proporcionar ARNip sintéticos con resistencia potenciada a nucleasa y efectos de interferencia de ARN altamente activos. Por ejemplo, para potenciar la resistencia a digestión por exonucleasa, se han sintetizado ARNip, cuyo extremo está modificado con un grupo amino o un grupo tiol etc. o está modificado para formar un sitio abásico etc. Sin embargo, se ha informado de que aunque la modificación terminal de un ARN bicatenario que tiene un efecto de interferencia de ARN puede potenciar la resistencia a nucleasa y aumentar la tasa de transfección, también reduce enormemente el efecto de interferencia de ARN. Por tanto, fue imposible en la técnica anterior proporcionar un ARN bicatenario mejorado que tuviera un efecto de interferencia de ARN, que tuviera una resistencia a nucleasa y tasa de transfección celular potenciadas así como además un efecto de interferencia de ARN aumentado.

El β -1,3-glucano es un polisacárido que realmente se usa en forma de una formulación inyectable intramuscular clínica. Se ha sabido desde hace tiempo que existe β -1,3-glucano natural como triple hélice (véase el documento no de patente 2). La seguridad *in vivo* de este polisacárido también se ha confirmado, y se ha usado β -1,3-glucano como formulación inyectable intramuscular durante aproximadamente 20 años (véase el documento no de patente 3). También se ha informado de que el β -1,3-glucano tiene capacidad de suministro de fármacos, y un enlace covalente formado entre el β -1,3-glucano y el fármaco posibilita que se suministre un fármaco a un sitio diana (véase el documento de patente 1).

Se sabe que existe β -1,3-glucano natural como tripe hélice. Además, se ha revelado que cuando este polisacárido se disuelve en un disolvente polar para que se disgregue en cadenas individuales independientes, después se añade ácido nucleico monocatenario, y el disolvente se reemplaza con agua (un proceso de renaturalización), se forma un complejo de triple hélice que consiste en una cadena de ácido nucleico y dos cadenas del polisacárido (véase el documento no de patente 4). Se cree que el ácido nucleico y el polisacárido en dicho complejo de triple hélice forman complejo principalmente por enlaces de hidrógeno.

En los últimos años, los presentes inventores revelaron adicionalmente que el suministro de un gen puede conseguirse formando un complejo que comprende β -1,3-glucano y el gen (véase el documento de patente 2). Además, se informó de un método para transfectar ácido nucleico usando β -1,3-glucano que tiene un grupo funcional permeable de membrana celular y un grupo funcional que altera la membrana lipídica (véase el documento de patente 3). Sin embargo, estas publicaciones solamente describen métodos para transfectar un ácido nucleico monocatenario en células, y no mencionan ARNip bicatenario etc. El documento de patente 4 describe un método para transfectar un ADN bicatenario que tiene información genética en una célula diana usando β -1,3-glucano. Sin embargo, parece ser difícil llevar este método a uso práctico debido a su baja eficacia de transfección.

Por tanto, cuando simplemente se forma en complejo el β -1,3-glucano con un ARN bicatenario que tiene un efecto de interferencia de ARN, no se forma una estructura de triple hélice, o se forma una triple hélice, pero el ARN bicatenario ya no puede ser bicatenario; por consiguiente, no puede esperarse que se produzca el efecto deseado. Además, un ARN bicatenario que tiene un efecto de interferencia de ARN es diferente de un ADN que tiene información genética en el mecanismo de acción requerido en las células. La formación de complejos intracelulares del ARN bicatenario con RISC, y la unión a una región homóloga de ARNm producido a partir del gen diana son importantes para proporcionar el efecto de interferencia de ARN. Por lo tanto, incluso si el método descrito en el documento de patente 4 se aplica a un ARN bicatenario que tiene un efecto de interferencia de ARN, se espera una baja eficacia de transfección de ARN, como en el caso de ADN, o una gran reducción del efecto de interferencia de ARN en las células

Documento de patente 1: folleto WO 96/014873

Documento de patente 2: folleto WO 01/34207

Documento de patente 3: Publicación de patente no examinada japonesa n.º 2006-69913

Documento de patente 4: Publicación de patente no examinada japonesa n.º 2005-204612

Documento no de patente 1: J. Rossi et al., *Nature Biotech.*, 23, 222-226 (2005)

Documento no de patente 2: Theresa M. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 6909 (1998)

Documento no de patente 3: Hasegawa, *Oncology and Chemotherapy*, 8, 225 (1992)

Documento no de patente 4: Kazuo Sakurai, *Polym. Preprints. Jpn.*, volumen 49, página 4054, 2000

En este contexto, Matsumoto et al. (Matsumoto, T. et al.; *Biochimica et Biophysica Acta*, 1670; 2004; pág. 91-104) describe esquizofilano modificado químicamente para el suministro de oligonucleótidos antisentido para potenciar la eficacia de captación celular. Además, Karinaga et al. (2006) (Karinaga, R. et al.; *Biomaterials*, 27; 2006; pág. 1626-1635) describe conjugados de esquizofilano-galactosa-PEG para el suministro de oligonucleótidos antisentido para potenciar la captación celular. Además, Further, Karinaga et al. (2005) (Karinaga, R. et al.; *Biomaterials*, 26; 2005; pág. 4866-4873) describe conjugados de esquizofilano-PEG para suministro de oligonucleótidos antisentido evitando al mismo tiempo la degradación lisosómica. Además, Mizu et al. (Mizu, M. et al.; *Biomaterials*, 25; 2004; pág. 3117-3123) describe oligonucleótidos antisentido unidos a un complejo de polisacárido que tiene un efecto antisentido potenciado debido a baja hidrólisis. Además, Anada et al. (Anada, T. et al.; *Journal of Controlled Release*, 108; 2005; pág. 529-539) describe un ADN bicatenario lineal que imita la cola infecciosa de un genoma vírico para potenciar la transfección. Además, Soutschek et al. (Soutschek, J. et al.; *Nature*, 432; 2004; pág. 173-178) describe ARN interferentes cortos (ARNip) modificados químicamente que pueden silenciar un gen endógeno que codifica apolipoproteína B en ratones. Además, Kim et al. (Kim, S. H. et al.; *Journal of Controlled Release*, 116; 2006; pág. 123-129) describe un sistema de suministro de ARNip basado en micelas de complejo de polielectrolito para el silenciamiento del factor de crecimiento del endotelio vascular. Además, Grzelinski et al. (Grzelinski, M. et al.; *Human Gene Therapy*, 17; 2006; pág. 751-766) describe el direccionamiento basado en iARN del factor de crecimiento secretado pleiotrofina que emplea un complejo de polietilenimina/ARNip. Además, Katas y Alpar (Katas, H. and Alpar, H. O.; *Journal of Controlled Release*, 115; 2006; pág. 216-225) describe el desarrollo y caracterización de nanopartículas de quitosán para el suministro de ARNip. Además, el documento WO 2007/056153 A2 describe composiciones que comprenden una molécula de ARN bicatenaria (ARNbc) y un péptido de 5 a 40 aminoácidos, donde dicho ARNbc está conjugado a dicho péptido. Finalmente, el documento WO 2007/069068 describe conjugados de péptido-ácido nucleico donde el péptido es un péptido de penetración celular y el ácido nucleico es preferiblemente un ARNip.

Por consiguiente, un objetivo principal de la presente invención es mejorar la captación celular y la resistencia a degradación enzimática de ARN bicatenario que tiene un efecto de interferencia de ARN, sin reducir el efecto de interferencia de ARN.

Los presentes inventores realizaron estudios exhaustivos para conseguir el objetivo anterior, y descubrieron que es posible mejorar significativamente la captación celular y la resistencia a degradación enzimática de un complejo de un polisacárido que tiene un esqueleto de β -1,3-glucano y ARN bicatenario, manteniendo al mismo tiempo el efecto de interferencia de ARN, cumpliendo las siguientes condiciones (i) a (iii):

- (i) el ARN bicatenario tiene una cadena con sentido que consiste en una secuencia de bases complementaria a una secuencia diana en un gen diana y una cadena antisentido que contiene una secuencia de bases complementaria a la cadena con sentido, y el ARN bicatenario puede inhibir la expresión del gen diana;
- (ii) el ARN bicatenario tiene una polidesoxiadenina bicatenaria unida directamente al extremo de al menos una de la cadena con sentido y la cadena antisentido; y
- (iii) el polisacárido y la polidesoxiadenina monocatenaria forman un complejo.

La presente invención se consigue haciendo mejoras adicionales basadas en los hallazgos anteriores.

En otras palabras, la presente invención proporciona un complejo de polisacárido/ARN bicatenario y su proceso de producción, como se describe a continuación.

Punto 1. Un complejo de polisacárido/ARN bicatenario, que es un complejo de ARN bicatenario y polisacárido que tiene un esqueleto de β -1,3-glucano, donde el ARN bicatenario tiene un ARN de cadena con sentido que consiste en una secuencia de bases complementaria a una secuencia diana en un gen diana y un ARN de cadena antisentido que contiene una secuencia de bases complementaria al ARN de cadena con sentido, y el ARN bicatenario puede inhibir la expresión del gen diana; el ARN bicatenario tiene una polidesoxiadenina monocatenaria unida directamente al extremo de al menos uno del ARN de cadena con sentido y la cadena antisentido; y el polisacárido y la polidesoxiadenina monocatenaria forman un complejo.

Punto 2. El complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en el Punto 1, donde el ARN de cadena con sentido consiste en 15 a 50 ribonucleótidos, y el ARN de cadena antisentido consiste en la misma cantidad de ribonucleótidos que el ARN de cadena con sentido.

Punto 3. El complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en el Punto 1, donde el ARN de cadena con sentido consiste en 21 ribonucleótidos, y el ARN de cadena antisentido consiste en la misma cantidad de ribonucleótidos que el ARN de cadena con sentido.

Punto 4. El complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en el Punto 1, donde el ARN de cadena con sentido consiste en 27 ribonucleótidos, y el ARN de cadena antisentido consiste en la misma cantidad de ribonucleótidos que el ARN de cadena con sentido.

Punto 5. El complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en el Punto 1, donde la polidesoxiadenina monocatenaria consiste en 20 a 100 desoxiadeninas.

Punto 6. El complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en el Punto 1, donde la polidesoxiadenina monocatenaria está unida directamente o mediante un enlazador al extremo 5' y/o 3' de ARN de cadena con sentido o ARN de cadena antisentido.

Punto 7. El complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en el Punto 1, donde el polisacárido es al menos un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en esquizofilano, curdlano, lentinano, paquimano, grifolano, y escleroglucano.

Punto 8. El complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en el Punto 1, donde el polisacárido es β -1,3-glucano al cual se une una molécula funcional.

Punto 9. El complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en el Punto 1, donde un gen diana del ARN bicatenario es endógeno a una célula que tiene un receptor que se une al polisacárido.

Punto 10. El complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en el Punto 9, donde la célula es una célula que expresa Dectina-1 en la superficie de membrana de la célula.

Punto 11. Un proceso para producir el complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en el Punto 1, donde el ARN bicatenario tiene un ARN de cadena con sentido que consiste en una secuencia de bases complementaria a una secuencia diana en un gen diana y un ARN de cadena antisentido que contiene una secuencia de bases complementaria al ARN de cadena con sentido, y puede inhibir la expresión del gen diana; comprendiendo el proceso:

una etapa de mezclar un polisacárido que tiene un esqueleto de β -1,3-glucano en una relación de 1 a 6 moles a 1 mol del ARN bicatenario que se une al polinucleótido que tiene una polidesoxiadenina monocatenaria unida directamente al extremo de al menos una de la cadena con sentido y cadena antisentido, formando de ese modo un complejo de la polidesoxiadenina monocatenaria y el polisacárido.

Punto 12. Un uso del complejo de polisacárido que tiene un esqueleto de β -1,3-glucano/ARN bicatenario para inhibir la expresión de un gen diana *in vitro* o *ex vivo*, donde el complejo de polisacárido/ARN bicatenario contiene ARN bicatenario que tiene un ARN de cadena con sentido que consiste en una secuencia de bases complementaria una secuencia diana en un gen diana y un ARN de cadena antisentido que contiene una secuencia de bases complementaria al ARN de cadena con sentido y capaz de inhibir la expresión del gen diana; el ARN bicatenario tiene una polidesoxiadenina monocatenaria unida directamente al extremo de al menos uno del ARN de cadena con sentido y cadena antisentido; y el polisacárido y la polidesoxiadenina monocatenaria forman un complejo.

Punto 13. El complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en el Punto 1, para su uso en la inhibición de la expresión de un gen diana en una célula, comprendiendo dicho uso una etapa de introducir dicho complejo de polisacárido/ARN bicatenario en dicha célula.

El complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención tiene excelente captación celular y resistencia a degradación enzimática, manteniendo al mismo tiempo el efecto de interferencia de ARN mediado por ARN bicatenario, y por tanto se mejora la utilidad práctica del complejo de polisacárido/ARN bicatenario en comparación con la molécula de ARN bicatenaria convencional que produce el efecto de interferencia de ARN. Por lo tanto, el complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención es aplicable como fármaco génico eficaz en el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer y el SIDA.

Además. Pueden unirse diversas moléculas funcionales tales como moléculas permeables a membrana celular y otras moléculas capaces de proporcionar resistencia a degradación enzimática, al polisacárido del complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención. Por tanto, el complejo también puede estar provisto de efectos útiles mediados por las moléculas funcionales, que permiten una diversidad de diseños moleculares y que aumentan la utilidad clínica.

Además, cuando el ARN bicatenario que forma el complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención comprende un ARN de cadena con sentido que consiste en 27 ribonucleótidos y un ARN de cadena antisentido que consiste en 27 ribonucleótidos completamente complementario al ARN de cadena con sentido, pueden conseguirse adicionalmente de forma eficaz los efectos descritos anteriormente de la presente invención. Aunque esto no debe interpretarse de un modo limitado, la razón para los efectos eficaces adicionales se considera del siguiente modo: Después de introducir el complejo de polisacárido/ARN bicatenario que tiene ARN bicatenario en la estructura descrita anteriormente en una célula, el ARN bicatenario de 27 bases de longitud se convierte de forma eficaz en ARN de 21 bases de longitud que tiene un extremo colgante de 2 bases en el extremo 3' mediante la acción de Dicer, de modo que se separa el polisacárido unido al extremo del ARN bicatenario de 27 bases de longitud mediante polidesoxiadenina. En otras palabras, aunque el polisacárido desempeña un papel importante en la mejora del ARN bicatenario en términos de captación celular, la resistencia nucleasa, y similares, el polisacárido no tiene efectos adversos sobre la reacción de interferencia de ARN. En general, se informa de que las moléculas de interferencia de ARN modificadas tienen un efecto de interferencia de ARN reducido. Sin embargo, en el caso del complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención, el polisacárido se separa por la acción de Dicer como se ha descrito anteriormente, de modo que no se altera el efecto de interferencia de ARN. Por lo tanto, el complejo de polisacárido/ARN bicatenario que tiene ARN bicatenario con la estructura descrita anteriormente puede expresar de forma eficaz su efecto de interferencia de ARN inherente, mejorando al mismo tiempo la captación celular, la resistencia a nucleasa, y similares.

El complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención contiene ARN bicatenario que produce el efecto de interferencia de ARN. El ARN bicatenario se forma mediante la hibridación de ARN de cadena con sentido que consiste en una secuencia de bases complementaria a una secuencia diana en un gen diana y ARN de cadena antisentido que contiene una secuencia de bases complementaria a la cadena con sentido, y es capaz de inhibir la expresión del gen diana. El "ARN de cadena con sentido que contiene una secuencia de bases complementaria a una secuencia diana" en este documento se refiere a una secuencia complementaria que coincide con la secuencia diana al 100 %.

El "gen diana" en este documento se refiere a un gen cuya expresión tiene que inhibirse por el efecto de interferencia de ARN. Con el complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención, el gen diana no está limitado particularmente, y puede seleccionarse adecuadamente en base a la aplicación del complejo de polisacárido/ARN bicatenario.

En la presente invención, es deseable que el gen diana esté presente en una célula que expresa un receptor en la superficie celular, siendo capaz el receptor de unirse a un polisacárido. Un ejemplo preferible de dicha célula es una que expresa Dectina-1, que es un receptor de β glucano. El polisacárido que tiene un esqueleto de β -1,3-glucano se suministra a una célula a través de una señal inducida por la unión a Dectina-1 sobre la superficie celular.

Aunque el gen diana de la presente invención no está particularmente limitado, en vista del uso para aplicaciones médicas, se prefiere un gen que esté implicado en afecciones clínicas y cuya expresión se desee inhibir. Ejemplos del gen diana incluyen (a) genes que codifican un factor implicado en la aparición de una afección clínica o el empeoramiento de un síntoma causando sobreproducción de un producto de transcripción a partir de los genes a través de un estímulo externo, etc., y (b) genes que codifican un factor que tienen una región donde está mutado el gen diana y cuyo transcrito está implicado directamente en la aparición de una enfermedad.

Ejemplos de los genes diana descritos anteriormente incluyen genes que codifican un factor que induce inflamación tal como citoquinas, por ejemplo, TNF α , interleuquina, MIF, y otros similares.

Los genes diana (a) también pueden ser genes que codifican un factor que activa y desactiva la actividad intracelular. Ejemplos de dichos genes incluyen proteína quinasas (por ejemplo, Raf, MEK, Jak2, etc.), factores de transcripción (por ejemplo, Stat5, etc.), y similares.

Ejemplos de los genes diana (a) incluyen adicionalmente los genes diana que codifican un receptor de superficie

celular y también codifican un factor que actúa sobre la aparición o empeoramiento de afecciones médicas a través del receptor de superficie celular. Ejemplos de dichos genes incluyen los que codifican TNFR (receptor del factor de necrosis tumoral), PDGFR (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas), receptor de interleuquinas, y similares.

Los genes diana (b) indican genes que codifican un factor que tiene una región donde está mutado el gen diana y mediante lo cual un transcrito del mismo causa una pérdida de función celular normal o se acumula como sustancia citotóxica, induciendo por tanto la aparición/empeoramiento de afecciones clínicas tales como inflamación y muerte celular. Ejemplos de dichos genes incluyen Jak2 con mutación V617F, ATN1 con mutación en repetición CAG, TTR con mutación V30M, KT14 con mutación R125C, y similares.

La secuencia diana en el gen diana no está particularmente limitada en la medida en que pueda inhibirse la expresión del gen por el efecto de interferencia de ARN. La secuencia diana puede determinarse adecuadamente de acuerdo con un método conocido; específicamente, puede usarse una búsqueda NCBI BLAST o similar. Por ejemplo, la secuencia diana puede ser una región que consiste en 19 a 30 bases después de las bases "AA" en la región del exón 50 a 100 bases cadena abajo del codón de inicio de la región codificante (ORF) del gen diana, y que tiene un contenido en GC de aproximadamente el 50 %. Se sabe por experiencia en este campo que puede obtenerse un excelente efecto de interferencia de ARN usando una cadena complementaria a dicha secuencia diana. Por ejemplo, la secuencia diana puede determinarse de acuerdo con las instrucciones de IDT (Integrated DNA Technologies, Inc.; Dicer Substrate RNAi Design). Un informe reciente reveló que puede producirse ARN bicatenario que tiene alto efecto de interferencia de ARN diseñando ARN bicatenario que tiene: (i) un par A/U en el extremo 5' del ARN de cadena antisentido; (ii) un par G/C en el extremo 5' del ARN de cadena con sentido; y (iii) aproximadamente cinco pares A/U en el lado del extremo 5' del ARN de cadena antisentido; y (iv) no tiene nueve o más pares G/C en la cadena doble (Ui-Tei et al., *Nucleic Acids Res.*, 32, 936-948 (2004)).

La cantidad de ribonucleótidos que constituyen el ARN de cadena con sentido no está particularmente limitada en la medida que pueda expresarse el efecto de interferencia de ARN. Por ejemplo, la cantidad es de 15 a 50, de 19 a 30, preferiblemente de 21 a 27, más preferiblemente de 21 a 27.

Además, el ARN de cadena antisentido es un ARN capaz de formar una doble cadena por hibridación con el ARN de cadena con sentido. En otras palabras, el ARN de cadena antisentido es un ARN que contiene una secuencia de nucleótidos complementaria al ARN de cadena con sentido. Aunque el ARN de cadena antisentido puede no tener necesariamente una secuencia complementaria a la longitud completa del ARN de cadena con sentido, se prefiere que el ARN de cadena antisentido tenga una secuencia complementaria a una región de 15 bases o más, preferiblemente 19 bases o más, en el ARN de cadena con sentido.

La cantidad de ribonucleótidos que constituye la cadena antisentido no está particularmente limitada. Por ejemplo, la cantidad es de 15 a 50, de 19 a 30, preferiblemente de 21 a 27, más preferiblemente de 21 a 27. Obsérvese que, aunque la cadena con sentido y la cadena antisentido pueden tener diferentes cantidades de ribonucleótidos, se prefiere que tengan la misma cantidad de ribonucleótidos.

Además, el ARN de cadena con sentido y la cadena antisentido pueden hibridarse en una doble cadena, que tiene un extremo colgante en uno o ambos del lado del extremo 5' del ARN de cadena con sentido (es decir, el lado del extremo 3' de la cadena antisentido) y el lado del extremo 3' del ARN de cadena con sentido (es decir, el lado del extremo 5' de la cadena antisentido). Además, cuando el ARN de cadena con sentido y la cadena antisentido consisten ambas en la misma cantidad de ribonucleótidos, pueden hibridar en una doble cadena en que tanto el lado del extremo 5' del ARN de cadena con sentido (es decir, el lado del extremo 3' de la cadena antisentido) como el lado del extremo 3' del ARN de cadena con sentido (es decir, el lado del extremo 5' de la cadena antisentido) son extremos romos; en otras palabras, el ARN de cadena con sentido y la cadena antisentido pueden hibridar de forma completamente complementaria. El "extremo colgante" usado en este documento se refiere a una estructura terminal de doble cadena formada por la hibridación del ARN de cadena con sentido y la cadena antisentido, donde una región final del ARN de cadena con sentido o cadena antisentido es monocatenaria porque no hay apareamiento de nucleótidos presente. Además, el "extremo romo" se refiere a una estructura terminal de una doble cadena formada por la hibridación del ARN de cadena con sentido y la cadena antisentido, donde una región final del ARN de cadena con sentido y su región final apareada de la cadena antisentido están apareadas completamente entre sí, sin extremos colgantes.

Una realización preferible del ARN bicatenario que constituye el complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención es una en que el ARN bicatenario consiste en 27 nucleótidos, y el ARN de cadena antisentido también consiste en 27 nucleótidos completamente complementarios al ARN de cadena con sentido. En otras palabras, cuando el ARN bicatenario tiene dicha estructura, ambos extremos 5' y 3' tienen extremos romos.

Otro ejemplo del ARN bicatenario que constituye el complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención incluye uno en que el ARN de cadena con sentido y el ARN de cadena antisentido consisten ambos en 21 ribonucleótidos, y se forma un extremo colgante que consiste en dos ribonucleótidos en el extremo 5' del ARN de cadena con sentido y el extremo 5' del ARN de cadena antisentido. En otras palabras, en el caso del ARN

bicatenario descrito anteriormente, una secuencia de 1 a 19 ribonucleótidos desde el lado del extremo 3' del ARN de cadena antisentido es complementaria a una secuencia de 3 a 21 ribonucleótidos desde el lado del extremo 5' del ARN de cadena con sentido.

El ARN bicatenario que constituye el complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención tiene una polidesoxiadenina monocatenaria unida directamente a al menos uno de los cuatro extremos de la cadena consentido y la cadena antisentido. En otras palabras, se une una polidesoxiadenina monocatenaria a al menos uno de los siguientes extremos: el extremo 5' del ARN de cadena con sentido, el extremo 3' de la cadena con sentido, el extremo 5' de la cadena antisentido, y el extremo 3' de la cadena antisentido. La cantidad de uniones de las polidesoxiadeninas monocatenarias no está particularmente limitada. En términos de producción eficaz del efecto de interferencia de ARN, la cantidad es preferiblemente de 1 a 3, más preferiblemente de 1 o 2, y particularmente preferible de 1.

En la presente invención, se prefiere que la cantidad de uniones de las polidesoxiadeninas monocatenarias al ARN bicatenario sea uno, y que las polidesoxiadeninas monocatenarias se unan al extremo 5' de la cadena con sentido. Cuando la polidesoxiadenina monocatenaria se une a solamente el extremo 5' de la cadena con sentido como se ha descrito anteriormente, el efecto de interferencia de ARN mediado por el ARN bicatenario puede ser significativo. Además, cuando la polidesoxiadenina monocatenaria se une a solamente el extremo 5' de la cadena con sentido, y cuando tanto la cadena con sentido como la cadena antisentido del ARN bicatenario consisten en 27 nucleótidos, puede inducirse una expresión potenciada adicional del efecto de interferencia de ARN.

Además, cuando el ARN de cadena con sentido y el ARN de cadena antisentido consisten ambos en 21 nucleótidos, la polidesoxiadenina monocatenaria puede unirse a cualquiera del extremo 5' o el extremo 3' de la cadena con sentido o la cadena antisentido, y puede demostrarse un alto efecto de interferencia de ARN.

La cantidad de desoxiadeninas que constituyen la polidesoxiadenina monocatenaria no está particularmente limitada en la medida en que pueda formarse un complejo entre las desoxiadeninas y un polisacárido que tenga un esqueleto de β -1,3-glucano descrito a continuación. Por ejemplo, la cantidad de desoxiadeninas es de 10 a 100, preferiblemente de 20 a 100, más preferiblemente de 20 a 80, más preferiblemente de 40 a 60.

La polidesoxiadenina monocatenaria forma un complejo adecuado con un polisacárido que tiene un esqueleto de β -1,3-glucano, y un complejo de polisacárido/ARN bicatenario obtenido de ese modo tiene una alta resistencia a degradación enzimática.

La polidesoxiadenina monocatenaria se une directamente a un ribonucleótido terminal del ARN de cadena con sentido y/o ARN de cadena antisentido del ARN bicatenario.

Específicamente, para unir directamente la polidesoxiadenina monocatenaria al extremo 5' de la cadena de ARN, puede unirse un átomo de carbono 5' del ribonucleótido en el extremo 5' de la cadena de ARN por un enlace éster a un resto de fosfato, que está unido por un enlace éster a un átomo de carbono 3' en el extremo 3' de la polidesoxiadenina monocatenaria. Además, para unir directamente la polidesoxiadenina monocatenaria al extremo 3' de la cadena de ARN, puede unirse un resto de fosfato unido por un enlace éster a un átomo de carbono 3' del ribonucleótido en el extremo 3' de la cadena de ARN por un enlace éster a un átomo de carbono 5' en el extremo 5' de la polidesoxiadenina monocatenaria.

El complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención contiene un polisacárido que tiene un esqueleto de β -1,3-glucano como modelo para realizar funciones deseadas diferentes al efecto de interferencia de ARN.

El β -1,3-glucano es un polisacárido en que se une glucosa por enlaces β -1 $\rightarrow$ 3-glucósido. Se conocen diversos β -1,3-glucanos en que la relación de la cantidad de restos de glucosa en las cadenas laterales a la cantidad de restos de glucosa en la cadena principal (a partir de ahora en este documento abreviado como "relación de cadena lateral") difiere. Aunque el polisacárido usado en la presente invención no está particularmente limitado en la medida que tenga un esqueleto de β -1,3-glucano, preferiblemente se usa un polisacárido que tenga un esqueleto de β -1,3-glucano con una mayor relación de cadena lateral en vista del hecho de que dicho polisacárido puede formar fácilmente un complejo con la polidesoxiadenina monocatenaria y puede mejorar adicionalmente la tasa de introducción celular del complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención.

Ejemplos específicos del polisacárido usado en el complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención incluyen esquizofilano, curdlano, lentinano, paquimano, grifolano, escleroglucano, y similares. De estos, el esquizofilano es un polisacárido preferible en la presente invención porque puede mejorar más significativamente la captación celular y la resistencia a degradación enzimática.

El peso molecular del polisacárido usado en el complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención no está particularmente limitado. Puede determinarse adecuadamente de acuerdo con el tipo de polisacárido usado, la longitud de cadena de la polidesoxiadenina monocatenaria, y similares. Específicamente, el peso molecular del

polisacárido es habitualmente de 25.000 a 2.500.000, preferiblemente de 25.000 a 150.000.

El complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención se forma según la polidesoxiadenina monocatenaria unida al ARN bicatenario forma un complejo con el polisacárido. La estructura del complejo entre la polidesoxiadenina monocatenaria y polisacárido no está particularmente limitada. Habitualmente, se prefiere una estructura de triple hélice donde la polidesoxiadenina monocatenaria forma un complejo con dos de estos polisacáridos. La estructura de triple hélice descrita anteriormente puede formarse específicamente de acuerdo con los siguientes procesos: en condiciones naturales o en agua, un polisacárido que tiene un esqueleto de β -1,3-glucano tiene una estructura de triple hélice. Este polisacárido se disuelve en un disolvente polar tal como DMSO (dimetilsulfóxido) o similar en cadenas individuales, a las cuales después se añade ARN bicatenario que tiene una polidesoxiadenina monocatenaria unida al mismo, y se reemplaza el disolvente por agua (un proceso de re-naturalización), formando de ese modo una estructura de complejo en la forma de triple hélice (estructura de asociación) que comprende una única cadena del polinucleótido unido a ARN bicatenario y dos polisacáridos. Dicho complejo de polinucleótido y polisacáridos se considera que se forma principalmente por enlaces de hidrógeno e interacciones hidrófobas.

Además, el polisacárido contenido en el complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención puede tener una molécula funcional unida al mismo. Mediante el uso de un polisacárido al cual se une una molécula funcional como se ha descrito anteriormente, puede proporcionarse una función útil mediada por la molécula funcional al complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención. Ejemplos específicos de dichas moléculas funcionales incluyen péptidos, proteínas, azúcares, aminoácidos, ADN, ARN, materiales orgánicos/inorgánicos de bajo peso molecular, colesterol, dendrímeros, lípidos, materiales de alto peso molecular, y similares.

Ejemplos de péptidos incluyen péptidos que comprenden de 30 a 40, preferiblemente de 6 a 30, más preferiblemente de 8 a 25 aminoácidos. Ejemplos específicos de los mismos incluyen péptidos permeables a membrana celular (octaarginina (R8), penetratina, etc.), secuencias de péptidos señal de localización nuclear (Tat de VIH-1, antígeno T de SV40, etc.), péptidos señal de exportación nuclear (Rev de VIH-1, MAPKK, etc.), péptidos de fusión de membrana celular (gp41, péptidos de fusión vírica, etc.). De estos, R8 se usa preferiblemente en la presente invención. R8 tiene una acción promotora de la introducción celular. El uso de un polisacárido al cual se une R8 puede proporcionar una ventaja en que el complejo de polisacárido/ARN bicatenario puede introducirse de forma más eficaz en una célula.

Pueden usarse proteínas presentes *in vivo*, proteínas que tienen propiedades medicinales, proteínas que tienen propiedades de reconocimiento molecular, etc. como las proteínas descritas anteriormente. Ejemplos de dichas proteínas incluyen proteínas de exportación/importación, fibronectinas, avidinas, anticuerpos, y similares.

Ejemplos de azúcares incluyen monosacáridos tales como glucosa, galactosa, glucosamina, galactosamina, etc.; oligosacáridos o polisacáridos en que están combinados estos monosacáridos de cualquier modo; y similares.

Ejemplos de materiales orgánicos/inorgánicos de bajo peso molecular incluyen moléculas catiónicas tales como espermina, espermidina, etc.; materiales fluorescentes tales como FITC, Alexa, Cy3, Cy5, etc.; biotinas; puntos cuánticos; partículas finas de oro; y similares.

Ejemplos de dendrímeros incluyen dendrímeros de poliamidoamina y similares.

Ejemplos de lípidos incluyen ácidos linoleicos, DOPE (1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), y similares.

Ejemplos de materiales de alto peso molecular incluyen polietilenglicoles, polietileniminas, y similares.

De las moléculas funcionales, se prefieren péptidos, moléculas catiónicas, y polietilenglicoles, y los péptidos son particularmente preferidos. Además, de las moléculas funcionales, se prefieren moléculas que tienen permeabilidad de membrana celular (molécula permeable de membrana celular) y moléculas capaces de proporcionar la resistencia a degradación enzimática al ARN bicatenario. De las moléculas funcionales, ejemplos de moléculas permeables de membrana celular incluyen péptidos y similares, y ejemplos de moléculas capaces de proporcionar la resistencia a degradación enzimática al ARN bicatenario incluyen polietilenglicoles.

Una molécula funcional puede unirse al polisacárido uniéndolo a la molécula funcional a una cadena lateral del polisacárido directamente o mediante un enlazador. Aunque son posibles diversas reacciones como métodos para unir una molécula funcional a la cadena lateral del polisacárido, se selecciona preferiblemente un método para introducir selectivamente una molécula funcional en una cadena lateral sin afectar al enlace glucosídico en la cadena principal. El siguiente método es un ejemplo de dicho método. Específicamente, en primer lugar, se oxidan restos de glucosa que tienen enlaces 1,6-glucopiranosido, que están ramificados desde la cadena principal de esquizofilano o similares, usando un oxidante tal como peryodato sódico, que provoca la abertura del anillo y la formación de un aldehído. A continuación, el grupo aldehído se amina de forma reductora en presencia de un agente reductor tal como borohidruro sódico o similares, usando el grupo amino de una molécula funcional que contiene grupo amino o

el grupo amino de una molécula funcional unida a un enlazador que contiene grupo amino. De ese modo, puede sintetizarse un polisacárido al cual se une una molécula funcional.

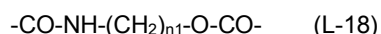
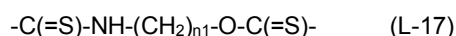
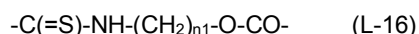
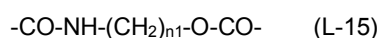
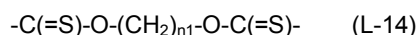
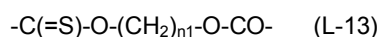
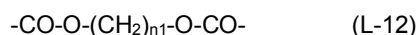
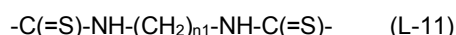
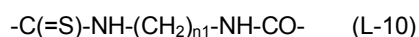
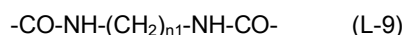
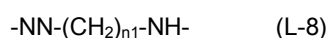
Otros métodos incluyen los siguientes, por ejemplo: en primer lugar, se oxidan restos de glucosa que tienen enlaces 1,6-glucopiranosídeo, que están ramificados desde la cadena principal de esquizofilano o similar, usando un oxidante tal como peryodato sódico, que provoca la abertura del anillo y la formación de un aldehído. A continuación, después de oxidarse el grupo aldehído en un ácido carboxílico con clorito sódico, el ácido carboxílico se somete a una reacción de condensación con una molécula funcional que contiene grupo amino o una molécula funcional unida a un enlazador que contiene grupo amino, usando difenilfosforilazida. Este método puede producir asimismo un material diana.

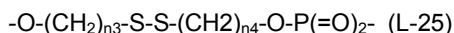
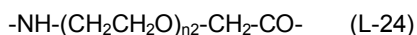
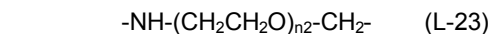
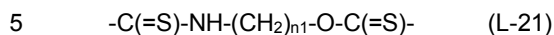
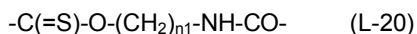
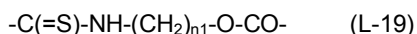
Cuando se une una molécula funcional al polisacárido, la relación de unión de molécula funcional a polisacárido es, por ejemplo, de 1 a 200, preferiblemente de 1 a 100, de forma particularmente preferible de 1 a 50 moléculas funcionales por 100 cadenas laterales del polisacárido. La relación de unión de molécula funcional a polisacárido descrita anteriormente puede ajustarse controlando la cantidad de oxidante tal como peryodato sódico a añadir a los restos ramificados de glucosa.

Cuando se une una molécula funcional al polisacárido, se prefiere que la molécula funcional se una a una cadena lateral del polisacárido mediante un enlazador. El enlazador bifuncional descrito a partir de ahora en este documento se usa preferiblemente como dicho enlazador.

El enlazador bifuncional usado en este documento puede no estar limitado particularmente en la medida en que el enlazador contenga dos grupos funcionales. Ejemplos de enlazadores que pueden usarse incluyen N-succinimidil=3-(2-piridilditio)propionato, ácido N-4-maleimidobutírico, S-(2-piridilditio)cisteamina, iodoacetoxisuccinimida, N-(4-maleimidobutiriloxi)succinimida, ácido N-[5-(3'-maleimide propilamida)-1-carboxipentil]iminodiacético, N-succinimidil-3-maleimidopropionato, y similares.

Además de los enumerados anteriormente, también pueden usarse enlazadores de las siguientes estructuras como enlazador bifuncional. [Chem. 1]





15 En las anteriores Fórmulas Generales (L-4) a (L-21), n_1 es un entero de 1 a 40, preferiblemente de 2 a 20, más preferiblemente de 2 a 12.

Además, en las Fórmulas Generales (L-22) a (L-24), n_2 es un entero de 1 a 20, preferiblemente de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 6.

20 Además, en la Fórmula General L-25, cada uno de n_3 y n_4 , que son iguales o diferentes, es un entero de 1 a 20, preferiblemente de 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 6.

25 Además, aunque el sitio de unión del polisacárido a la molécula funcional o un enlazador que se une a la molécula funcional no está particularmente limitado, se prefiere que la molécula funcional o un enlazador que se une a la molécula funcional se sustituya con un resto de 1,2-diol de glucosa que tiene enlaces 1,6-glucopiranosido, que está ramificado desde la cadena principal de β -1,3-glucano en el polisacárido.

30 El complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención puede prepararse de acuerdo con un método conocido. Específicamente, se describe un método de producción que comprende las siguientes etapas (1) a (3) como ejemplo: (1) preparar ARN bicatenario de unión a polinucleótido al que se une la polidesoxiadenina monocatenaria directamente, de acuerdo con un método conocido; (2) además, proporcionar por separado un polisacárido que tiene un esqueleto de β -1,3-glucano, o preparar un polisacárido (polisacárido modificado) que tiene un esqueleto de β -1,3-glucano al cual se une directamente una molécula funcional o mediante un enlazador; y después (3) formar un complejo usando la polidesoxiadenina monocatenaria unida al ARN bicatenario de unión a ADN y el polisacárido o el polisacárido modificado.

35 En la etapa (3) del método descrito anteriormente se prefiere que el ARN bicatenario de unión a polinucleótido y el polisacárido o el polisacárido modificado se mezclen en una relación molar de 1:1 a 1:5, preferiblemente 1:1,3 a 1:2 para formar un complejo de una región de polidesoxiadenina monocatenaria del ARN bicatenario de unión a polinucleótido y el polisacárido o el polisacárido modificado. El ARN bicatenario de unión a polinucleótido y el polisacárido o el polisacárido modificado se exponen a condiciones de formación de complejo en la relación molar descrita anteriormente. Esto permite una interacción eficaz entre los mismos, que mejora la eficacia de producción del complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención.

40 El complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención puede usarse como fármaco para inhibir la expresión de un gen diana porque el complejo puede inhibir la expresión de un gen diana en una célula a través de su introducción en una célula. La cantidad y método de introducción del complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención en una célula son los mismos que los del ARNip convencional. Obsérvese que, como el complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención muestra excelente capacidad de transferencia intracelular por sí mismo, el complejo puede introducirse en una célula sin usar un reactivo convencional de transfección génica que se ha usado para transfectar ARNip en una célula, o con uso reducido de un reactivo convencional de transfección génica. Obsérvese que la expresión de un gen diana puede inhibirse por el complejo de polisacárido/ARN bicatenario de la presente invención *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*.

55 La presente invención también proporciona un uso del complejo de polisacárido/ARN bicatenario descrito anteriormente para inhibir la expresión de un gen diana en una célula *in vitro* o *ex vivo*. La aplicación y similares del complejo de polisacárido/ARN bicatenario en el uso mencionado anteriormente son como se ha descrito anteriormente.

60 La presente invención se describirá en detalle con referencia a los siguientes ejemplos; sin embargo, la invención no se limita a estos ejemplos. En los siguientes ejemplos, el esquizofilano, y esquizofilano al cual se une una molécula funcional también pueden mencionarse como "SPG" y "SPG modificado", respectivamente. La polidesoxiadenina también puede mencionarse como "poli(dA)". El polietilenglicol también puede mencionarse como "PEG".

65 Ejemplo 1 (Ejemplo de Referencia)

1. Síntesis de un SPG Modificado

Se produjo SPG que tiene una estructura de tripe hélice de acuerdo con un método convencional descrito en A.C.S. 38 (1), 253 (1997); Carbohydrate Research, 89, 121-135 (1981). Específicamente, se cultivó Fries de *Schizophyllum commune* (ATCC 44200) obtenido de la ATCC (American Type Culture Collection) en condiciones estáticas durante 7 días usando un medio mínimo. Posteriormente, el sobrenadante obtenido por centrifugación de los componentes celulares y el residuo insoluble se sometieron a sonicación, produciendo de ese modo SPG que tiene una estructura de triple hélice y un peso molecular de 450.000. El SPG así obtenido también puede mencionarse como "SPG1" a continuación.

A continuación, se disolvieron 100 mg del SPG1 obtenido que tiene un peso molecular de 450.000 en 80 ml de agua destilada. Se disolvieron 26,4 mg de peryodato sódico (0,8 equivalentes respecto a las unidades de glucosa de cadena lateral) en una pequeña cantidad de agua destilada, y se añadieron lentamente a la solución de SPG1 con agitación y enfriamiento hasta 4 °C. La mezcla de reacción resultante se dializó con una membrana de diálisis (límite de exclusión: 14.000) y se secó por congelación, produciendo de ese modo un sólido blanco (SPG en que estaban incorporados grupos aldeído). Cada uno de los péptidos, espermina, y PEG se unió al compuesto así obtenido.

Unión del Péptido

El sólido blanco obtenido anteriormente se disolvió en 35 ml de dimetilsulfóxido; se añadió 2-aminoetanol (un gran exceso), y la mezcla se agitó durante 2 días a temperatura ambiente; posteriormente se añadieron 300 mg de borohidruro sódico (un gran exceso) a la mezcla agitada. La mezcla de reacción resultante se dializó con una membrana de diálisis (límite de exclusión: 14.000) y se secó por congelación, produciendo de ese modo un sólido blanco. Los péptidos se unieron al SPG así obtenido en que se habían incorporado grupos amino, de acuerdo con el siguiente método.

Los péptidos usados fueron los siguientes: R8 (secuencia de aminoácidos: CRRRRRRRRR (SEQ ID NO. 1)); tat (secuencia de aminoácidos: CGGSGRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO. 2)); y RGD (secuencia de aminoácidos: CRGD). Estos péptidos se unieron al SPG en que se habían incorporado grupos amino. Específicamente, el resto tiol de cada uno de los péptidos y el resto amino incorporado en el SPG se unieron mediante 3-maleimidopropionato de N-succinimidilo (SMP) usado como enlazador (véase, Takahisa Anada et al., Journal of Controlled Release, Volumen 108, Temas 2-3, 28 de noviembre de 2005, páginas 529-539; y Matsumoto Takahiro, et al., Biochim Biophys Acta, 1670 (2), (2004), 91-109).

El SPG modificado con péptido R8 así obtenido, el SPG modificado con péptido tat, y el SPG modificado con péptido RGD se mencionan a partir de ahora en este documento como "SPG2" "SPG3" y "SPG4" respectivamente.

Unión de Espermina

Se realizó aminación reductora del sólido blanco obtenido anteriormente y espermina (Sigma Co.; fórmula: $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$) uniendo de ese modo el resto de aldeído incorporado en el SPG al resto amino de espermina. El resto amino de espermina y el resto aldeído incorporados en el SPG se unieron mediante la reacción de aminación reductora (véase, Matsumoto Takahiro et al., Biochim Biophys Acta, 1670(2), (2004), 91-104; y Nagasaki Takeshi et al., Bioconjugate Chemistry 2004, vol. 15, pág. 249-259).

El SPG modificado con espermina así obtenido se menciona a partir de ahora en este documento como "SPG5".

Unión de PEG

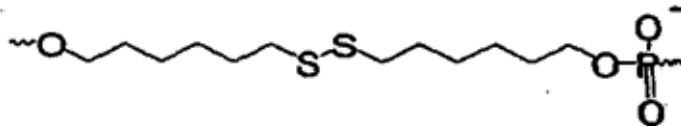
Se realizó aminación reductora del sólido blanco obtenido anteriormente y PEG en que se habían incorporado grupos amino (metoxipolietilenglicolamina, peso molecular promedio: 5.000; Sigma Co., fórmula: $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$), uniendo de ese modo el resto de aldeído incorporado en el SPG al resto amino del PEG (véase Ryouji Karinaga, Biomaterials, agosto de 2005; 26 (23): 4866-73).

El SPG modificado con PEG así obtenido se menciona a partir de ahora como "SPG6".

2. Síntesis de ARN Bicatenario que tiene PolidA en el Extremo 5' de la Cadena con Sentido

Se sintetizó un polinucleótido quimera de ADN-ARN de 67 bases de longitud que tiene una cadena de ADN de 40 bases de longitud (poliadenina; poliA40) en el extremo 5' de una cadena de ARN de 27 bases de longitud como cadena con sentido. Se sintetizó un ARN antisentido de 27 bases de longitud que tiene una secuencia completamente complementaria a la región de ARN en el polinucleótido quimera de ADN-ARN de 67 bases de longitud. Hibridando estas dos cadenas, se formó un oligonucleótido bicatenario (un ARN bicatenario unido a ADN) que tiene la región de una polidesoxiadenina monocatenaria de 40 bases de longitud.

Adicionalmente, se sintetizó un polinucleótido quimera de ADN-ARN (que tiene un enlazador) insertando el enlazador X, representado por la fórmula mostrada a continuación, entre la región de ADN y la región de ARN en el mismo polinucleótido quimera de ADN-ARN que anteriormente.



El polinucleótido quimera de ADN-ARN resultante (que tiene un enlazador) se hibridó con un ARN antisentido de 27 bases de longitud que tiene una secuencia completamente complementaria a la región de ARN en el polinucleótido quimera, sintetizando de ese modo un oligonucleótido bicatenario quimera de ADN-ARN que tiene la región de una polidesoxiadenina monocatenaria de 40 bases de longitud, y donde el ADN y el ARN bicatenario estaban unidos mediante un enlazador.

También se sintetizó como control un ARN bicatenario de 27 bases de longitud sin región de ADN. También se usó como control un ARNip de 21 bases de longitud usado habitualmente. El polinucleótido usado en este documento era un polinucleótido bicatenario que incluye un ARN antisentido que tiene una secuencia homóloga al gen de luciferasa de *Renilla*, y estaba diseñado para inducir interferencia de ARN en células.

En la síntesis descrita anteriormente, se determinó la concentración de ARN bicatenario midiendo la absorbancia a 260 nm usando un detector de espectro UV. La hibridación de los ARN bicatenarios se realizó mezclando cantidades equimolares de un oligonucleótido con sentido y un oligonucleótido antisentido en un tampón universal (Hayashi-Kasei Co., Ltd.), calentando la mezcla durante 2 minutos a 92 °C, y después disminuyendo lentamente la temperatura hasta 4 °C.

Las secuencias de los ARN y oligonucleótidos quimera de ADN-ARN usados son las siguientes:

Cadenas con sentido:

21s: 5'-GGCCUUUCACUACUCCUACGA-3' (SEQ ID NO. 3)

27s: 5'-CUGGCCUUUCACUACUCCUACGAGCAC-3' (SEQ ID NO. 4)

pA40-27R1: 5'-(a)40-CUGGCCUUUCACUACUCCUACGAGCAC-3' (SEQ ID NO. 5)

pA40-27R2: 5'-(a)40-X-CUGGCCUUUCACUACUCCUACGAGCAC-3' (SEQ ID NO. 6)

Cadenas antisentido:

21as: 3'-GACCGGAAAGUGAUGAGGAUG-5' (SEQ ID NO. 7)

27as: 3'-GACCGGAAAGUGAUGAGGAUGCUCGUG-5' (SEQ ID NO. 8)

En las secuencias de las cadenas con sentido, "(a)40" significa una poliadenina de 40 bases de longitud. En la cadena con sentido pA40-27R2, "X" indica el enlazador X mostrado anteriormente.

3. Formación de Diversos Complejos de SPG/ARN Bicatenario

Para formar complejos de SPG no modificados o modificados con un ARN bicatenario que tiene polidA, se mezclaron diversos SPG con una solución de un ARN bicatenario que tiene polidA (la concentración del ARN bicatenario: 10 µM; tampón: tampón universal (Hayashi-Kasei Co., Ltd.) que contiene DMSO al 1 %), y las mezclas se incubaron durante 3 días a 4 °C. Se usaron los diversos SPG disueltos en DMSO (dimetilsulfóxido), y cada SPG se mezcló en una cantidad de 2 moles por mol del ARN bicatenario que tiene polidA. La concentración final del DMSO en la solución de ARN bicatenario se ajustó al 1 % en volumen. Los experimentos preliminares habían demostrado que la solución de DMSO al 1 % en volumen no afecta ni a las células ni a los efectos de interferencia de ARN.

La Fig. 1 muestra las estructuras de los diversos complejos de SPG-ARN bicatenario así preparados. La formación de estos complejos de SPG/ARN bicatenario se validó usando un gel de poliacrilamida al 20 %. Específicamente, se aplicaron 10 µl (2 µM) de cada solución híbrida al gel de poliacrilamida al 20 %, y la muestra se sometió a electroforesis durante 70 minutos a 250 V. el producto se tiñó posteriormente usando un kit de tinción con plata (GE Health Care Bioscience) (véase, el manual del producto para las condiciones de tinción), y se sometió a análisis de gel usando un Chemilmager 4000 (Alpha Innotech Corporation). Los resultados se muestran en la Fig. 2. Los resultados muestran que en el caso de cada ARN bicatenario que tiene polidA, se observaba una banda en una posición cuya distancia de migración era más corta que la del ARN bicatenario de 27 bases de longitud, lo que demuestra la formación del ARN bicatenario diana que tiene polidA. Además, los diversos complejos de SPG/ARN bicatenario permanecían en los pocillos de la poliacrilamida, lo que demuestra la formación de complejos entre el

SPG y los ARN bicatenarios que tienen polidA.

La Fig. 3 muestra los resultados del análisis espectral CD realizado sobre un complejo de SPG/ARN bicatenario. El gráfico de la izquierda de la Fig. 3 muestra los espectros CD de oligonucleótidos bicatenarios quimera de ADN-ARN. En el complejo de SPG/ARN bicatenario obtenido añadiendo SPG a la doble cadena, se observa un cambio significativo en el espectro de la doble cadena. Esto indica que la doble cadena formaba un complejo con el SPG (el análisis se realizó a 5 °C). El gráfico de la derecha de la Fig. 3 muestra los resultados del examen de la temperatura de disociación del complejo formado usando el espectro CD. El comportamiento termodinámico de la doble cadena puede observarse a partir de un examen de los cambios en el valor CD a 281,6 nm debido a variaciones en la temperatura. La doble cadena muestra una disminución en la intensidad CD a aproximadamente 70 °C, lo que indica la disociación de la doble cadena a aproximadamente 70 °C. Por otro lado, el complejo de SPG/ARN bicatenario muestra una abrupta disminución en la intensidad CD a aproximadamente 47 °C, además de la disminución atribuida a la disociación de la doble cadena. Esta abrupta disminución se debe a la disociación de la doble cadena del complejo; por tanto, los resultados sugieren que la temperatura, de disociación del complejo es de aproximadamente 47 °C.

4. Procesamiento con Dicer de Diversos Complejos de SPG/ADN bicatenario

Se evaluó el procesamiento con Dicer de un ARN bicatenario de 27 bases de longitud, un ARN bicatenario que tiene polidA y diversos complejos de SPG/ARN bicatenario. Los experimentos de escisión con Dicer se realizaron del siguiente modo: se prepararon 0,5 U de Dicer recombinante (Gene Therapy Systems) y 10 µl de cada uno del ARN bicatenario de 27 bases de longitud, ARN bicatenario que tiene polidA y diversos complejos de SPG/ARN bicatenario ajustados a una concentración final de 2 µM en soluciones de Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), NaCl 15 mM, y Mg₂Cl 2,5 mM en tubos de muestras. Las muestras se incubaron en una incubadora durante 12 horas a 37 °C. Para detener posteriormente las reacciones de escisión por Dicer, se añadieron 2 µl de Solución de Parada de Dicer (Gene Therapy Systems) en las soluciones de reacción, seguido por la adición de 2 µl de un colorante de carga. Los productos de muestra resultantes se sometieron a electroforesis en un gel de poli(acrilamida) al 20 % a 250 V durante 70 minutos. Los productos después se tiñeron con un kit de tinción con plata kit (GE Health Care Bioscience) (véase, el manual del producto para las condiciones de tinción), y se sometió a análisis del gel usando un Chemi Imager 4000 (Alpha Innotech corporation). Como control, se usó un ARNip (ARNip 21) que consiste en un ARN bicatenario de 21 bases de longitud no procesado por Dicer.

Los resultados se muestran en la Fig. 4. Los resultados muestran que en el caso de 27s/27as, que es el ARN bicatenario de 27 bases de longitud, y en el caso de pA40-27R1/27as, que tiene la región de una polidesoxiadenina monocatenaria de 40 bases de longitud en el extremo 5' de la cadena con sentido, se observaban bandas en posiciones similares a las del ARNip de 21 bases de longitud en presencia de Dicer recombinante. Esto indica fuertemente que se formaban ARNip de 21 bases de longitud que contenían un extremo colgante de 2 bases por escisión con Dicer. En el caso de los complejos formados entre SPG (1 a 6) y pA40-27R1/27as, esto también está indicando fuertemente que los complejos se han procesado por Dicer recombinante y por consiguiente se formaban ARNip de 21 bases de longitud que contenían un extremo colgante de 2 bases.

Se descubrió a partir de estos resultados que ARN bicatenarios de 27 bases de longitud, incluso cuando contenían una polidesoxiadenina monocatenaria larga o SPG (complejos de SPG/ARN bicatenario), se procesaban en ARNip de 21 bases de longitud por Dicer recombinante.

5. Resistencia a Degradación Enzimática de Diversos Complejos de SPG/ARN Bicatenario

(5-1) Resistencia a Degradación Enzimática de Complejos de SPG/ARN Bicatenario (27 Bases de Longitud)

Se evaluó la resistencia a nucleasa de un ARN bicatenario de 27 bases de longitud, un ARN bicatenario que tiene polidA, y diversos complejos de SPG/ARN bicatenario (a partir de ahora en este documento también mencionadas como las "muestras de ensayo"). Los experimentos se realizaron del siguiente modo: Cada una de las muestras ajustada a una concentración final de 2 µM se incubó a 37 °C en un medio de RPMI-1640 (Invitrogen) que contenía FBS al 10 % (Sanko Junyaku, Co., Ltd.) (volumen final: 110 µl). Después de 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h, y 48 h, se muestreó cada alícuota de 10 µl y se insertó en un tubo de muestra que contenía 2 µl de un colorante de carga. Para detener posteriormente la reacción de degradación, la muestra recogida se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservó a -20 °C. El producto de muestra resultante se sometió a electroforesis en un gel de poli(acrilamida) al 20 % a 250 V durante 70 minutos. El producto después se tiñó con un kit de tinción con plata (GE Health Care Bioscience) (véase, el manual del producto para las condiciones de tinción), y se sometió a análisis de gel usando un Chemimager 4000 (Alpha Innotech Corporation). Para comparaciones, también se evaluó la resistencia a degradación enzimática de un ARNip de 21 bases de longitud que tenía un extremo colgante de 2 bases en el extremo 3', que se usa habitualmente en métodos de ARNip, del mismo modo que el descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Fig. 5.

Como resultado, el ARN bicatenario de 21 bases de longitud (ARNip 21) que tiene un extremo colgante de 2 bases se digería rápidamente en el medio que contenía FBS al 10 %; mientras que el ARN bicatenario de 27 bases de

longitud, el ARN bicatenario que tiene polidA, y diversos complejos de SPG/ARN bicatenario se descubrió que tenían resistencia muy elevada a degradación enzimática. Los resultados también indicaron que el ARN bicatenario que tiene polidA mostraba resistencia a degradación enzimática mayor que la del ARN bicatenario de 27 bases de longitud, y que los diversos complejos de SPG/ARN bicatenario mostraban resistencia a degradación enzimática incluso mayor que la del ARN bicatenario que tiene polidA. En particular, queda evidente que el complejo de SPG/ARN bicatenario se digería difícilmente por nucleasa incluso después de 48 horas. Estos resultados demostraron que el ARN bicatenario que tiene polidA y diversos complejos de SPG/ARN bicatenario tenían estabilidad muy alta en un medio que contiene suero.

(5-2) Resistencia a Degradación Enzimática de Complejos de SPG/ARN Bicatenario (21 Bases de Longitud)

Se evaluó la resistencia a nucleasa de un ARN bicatenario de 21 bases de longitud, un ARN bicatenario que tiene polidA, un ARN bicatenario que tiene polidT, y diversos complejos de SPG/ARN bicatenario (dA, dT; a partir de ahora también mencionados como "muestras de ensayo").

Las secuencias de los ARN y oligonucleótidos quimera de ADN-ARN usados son los siguientes:

Cadenas con sentido:

21s: 5'-GGUGGUGACGAUCUGGGCUUU-3' (SEQ ID NO. 9)
 pA40-21: 5'-(a)40-GGUGGUGACGAUCUGGGCUUU-3' (SEQ ID NO. 10)
 pT40-21: 5'-(t)40-GGUGGUGACGAUCUGGGCUUU-3' (SEQ ID NO. 11)

Cadenas antisentido:

21as: 3'-UUUCGGGUCUAGCAGUGGUGG-5' (SEQ ID NO. 12)

En las secuencias de las cadenas con sentido "(a)40" significa un polidA de 40 bases de longitud, y "(t)40" significa un dT de 40 bases de longitud.

Los experimentos se realizaron del siguiente modo: Cada una de las muestras de ensayo ajustada a una concentración final de 40 nM se incubó a 37 °C en un medio RPMI-1640 (Sigma) que contenía FBS al 10 % (MP Biomedicals, Inc.) (volumen final: 100 µl). Después de 0 h, 0,25 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, y 48 h, la muestra se recogió y se congeló a -80 °C para detener la reacción de degradación. La muestra de ensayo resultante se extrajo con fenol, se trató con cloroformo, y se purificó por precipitación con etanol. La muestra de ensayo después se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 20 % a 250 V durante 60 minutos. Posteriormente, la muestra se tiñó con SYBER Gold (Invitrogen), y se sometió a análisis de gel usando un analizador de imágenes luminiscentes LAS-3000 (Fujifilm). Los resultados se muestran en la Fig. 6.

El ARN bicatenario de 21 bases de longitud que contiene un extremo colgante de una única base (siLamin de 21pb desnudo), el ARN bicatenario que no forma un complejo (siLamin dA40 desnudo), y el complejo de SPG/ARN bicatenario que tiene polidT (complejo siLamin dT40 con SPG) se digirieron rápidamente en el medio que contiene FBS al 10 %; mientras que el complejo de SPG/ARN bicatenario que tiene polidA (complejo siLamin dA40 con SPG) se descubrió que tenía alta resistencia a degradación enzimática.

6. Citotoxicidad de complejos de polidA-ARN bicatenario/SPG

(6-1) Citotoxicidad de complejos de polidA-ARN bicatenario (27 bases de longitud)/SPG sobre células HeLa.

Se evaluó la citotoxicidad sobre células HeLa de un ARN bicatenario de 27 bases de longitud, un ARN bicatenario que tiene polidA, y diversos complejos de SPG/ARN bicatenario (a partir de ahora en este documento también mencionados como "muestras de ensayo"). Se sembraron células HeLa (células de cáncer cervical humano; Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University) ajustadas a 1×10^5 células/ml antes de los experimentos en una placa de 96 pocillos a 100 µl por pocillo, y se incubaron a 37 °C durante una noche. En el siguiente día, el medio antiguo en los pocillos se retiró, y se añadió un medio fresco libre de antibióticos a 90 µl por pocillo. Para evaluar la toxicidad intracelular, se evaluó la citotoxicidad de cada muestra de ensayo introduciendo activamente muestras de ensayo en células usando Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen). Cada muestra de ensayo se mezcló y se hizo formar complejos con Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) de modo que las concentraciones finales de la muestra de ensayo fueran 0 nM, 0,2 nM, 0,5 nM, 1 nM, 2 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, y 50 nM. Se añadieron diez microlitros del complejo a las células HeLa en 90 ml del medio anterior, de modo que el volumen final por pocillo fuera de 100 ml. La muestra de ensayo se hizo formar complejos con Lipofectamine™ 2000 mezclando 5 ml de una solución acuosa de la muestra de ensayo con 5 ml de la solución OptiMem de Lipofectamine™ 2000 (0,2 ml) por pocillo, e incubando la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células HeLa en las que se había introducido la muestra de ensayo se incubaron durante 48 horas a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 %. Posteriormente se añadieron cincuenta microlitros del reactivo CellTiter-Glo en el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega) a cada pocillo y se agitaron durante aproximadamente 60 minutos. Después se midió el nivel de luminiscencia en cada

pocillo usando un luminómetro (MicroLumat LB96p; Berthold). Como el nivel de luminiscencia medido es dependiente del ATP presente en células viables, se determinó la viabilidad celular por pocillo calculando el nivel de luminiscencia de la célula en la cual se había introducido cada muestra de ensayo respecto al nivel de luminiscencia de células de control (a una concentración de ARN de 0 nM y concentración de Lipofectamine™ 2000 de 0 ml; la viabilidad de las células de control se toma como el 100 %) (véase el manual del ensayo de viabilidad celular luminiscente Promega CellTiter-Glo).

La Fig. 7 muestra las viabilidades celulares medidas a una concentración máxima de 10 nM de las muestras de ensayo usadas en este experimento. Como resultado, todos los complejos de SPG/ARN bicatenario mostraron citotoxicidad dentro de un intervalo suficientemente aceptable.

(6-2) Citotoxicidad de complejo de PolidA-ARN bicatenario (21 bases de longitud)/SPG sobre células RAW 264.7

Se evaluó un ARN bicatenario de 21 bases de longitud y un complejo de un ARN bicatenario que tiene polidA (a partir de ahora en este documento también mencionados como "muestras de ensayo") para sus efectos de interferencia de ARN usando Lamina A/C, que es un componente de la membrana nuclear, como gen diana. Las secuencias de los ARN y oligonucleótidos quimera de ADN-ARN usados son como las dadas en la Sección (5-2) anterior.

Se sembraron células RAW 264.7 (células tipo macrófago derivadas de ratón) ajustadas a 5×10^4 células /ml antes de los experimentos en una placa de 96 pocillos a 100 µl por pocillo, y se incubaron a 37 °C durante una noche. En el siguiente día, el medio antiguo en los pocillos se retiró, y se añadieron 90 µl de un medio fresco; se añadieron 10 µl de una solución del complejo entre SPG y el ARN bicatenario que tiene polidA ajustado a una concentración predeterminada a cada pocillo que contenía células RAW 264.7. La concentración final del complejo entre SPG y el ARN bicatenario que tiene polidA se ajustó a 600 nM (en términos de la concentración de ARNip). Después de la introducción de la muestra de ensayo, las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C y se congelaron a -80 °C. Después se extrajo el ARN total usando un mini kit RNeasy (QIAGEN), y se preparó el ADNc usando un kit de reactivo PrimeScript RT (Takara Bio, Inc.). La reacción de PCR a tiempo real se realizó usando una SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio, Inc.), y se midió el nivel de ARNm de Lamina A/C usando un Smart Cycler II (Cepheid; vendido por Takara Bio, Inc.). Se corrigió el nivel de expresión de ARNm de Lamina A/C con GAPDH, que es un gen constitutivo general, determinando de ese modo el nivel de expresión de ARNm de Lamina A/C. Los resultados se muestran en la Fig. 8.

Como controles, se evaluaron ARNip dA40 desnudo (Lamina A/C), SPG solamente, y una mezcla de SPG y ARNip dA40 desnudo (Lamina A/C) preparados inmediatamente antes de la adición a las células para sus efectos de interferencia de ARN. Los resultados se muestran en la Fig. 8. No se observaron efectos de interferencia de ARN para el ARNip dA40 desnudo (Lamina A/C), SPG solamente, y la mezcla de SPG y ARNip dA40 desnudo (Lamina A/C) preparados inmediatamente antes de la adición a las células; sin embargo, solamente el complejo entre SPG y el ARN bicatenario que tiene polidA se descubrió que tenía efectos de interferencia de ARN. Por consiguiente, el SPG usado en solitario no tuvo efectos inhibidores sobre la expresión de ARNm de Lamina A/C en células RAW 264.7, ni tampoco el ARNip desnudo tuvo dichos efectos inhibidores.

7. Efectos de interferencia de ARN de complejos de polidA-ARN bicatenario/SPG

Se evaluaron un ARN bicatenario de 27 bases de longitud, un ARN bicatenario que tiene polidA, y diversos complejos de SPG/ARN bicatenario (a partir de ahora en este documento también mencionados como "muestras de ensayo") para sus efectos de interferencia de ARN usando luciferasa de *Renilla* como gen diana. Se sembraron células HeLa (células de cáncer cervical humano; Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University) ajustadas a 1×10^5 células/ml antes de los experimentos en una placa de 96 pocillos a 100 µl por pocillo y se incubaron a 37 °C durante una noche. En el siguiente día, el medio antiguo en los pocillos se retiró, y se añadió un medio fresco libre de antibióticos a 80 µl por pocillo. Se añadió una solución de complejo de un vector que expresa la luciferasa de luciérnaga y *Renilla* (vector psiCHECK™-2; Promega) y Lipofectamine™ 2000 (marca registrada; Invitrogen) a 10 µl por pocillo que contenía las células HeLa. La cantidad del vector de expresión se ajustó a 0,02 µg por pocillo, y la cantidad de Lipofectamine™ 2000 se ajustó a 0,2 µl por pocillo; se usó OptiMem (Invitrogen) para ajustar la cantidad hasta un nivel necesario. Para formar un complejo, el vector de expresión y Lipofectamine™ 2000 se mezclaron usando OptiMem, y después la mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la adición de la solución de complejo, las células se incubaron durante 4 horas a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 %. Después de la incubación, cada muestra de ensayo se hizo formar complejos con Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) para preparar soluciones de complejo de modo que las concentraciones finales de la muestra de ensayo fueran 0,2 nM y 0,5 nM. Se añadieron diez microlitros de cada solución de complejo a las células HeLa transfectadas con el vector de expresión. El volumen final por pocillo fue 100 µl. Las soluciones de complejo de la muestra de ensayo y Lipofectamine™ 2000 se prepararon mezclando 5 µl de una solución acuosa de la muestra de ensayo con 5 ml de una solución OptiMem de Lipofectamine™ 2000 (0,2 ml) por pocillo, e incubando la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la introducción de la muestra de ensayo, las células se incubaron durante 48 horas. Usando el sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo™ (Promega), se midieron los niveles de expresión de luciferasa de luciérnaga y *Renilla* con un luminómetro (MicroLumat LB96p; Berthold), y se determinó el

nivel de expresión (%) de luciferasa de *Renilla* en base al nivel de expresión de luciferasa de luciérnaga como control.

Los efectos de interferencia de ARN medidos se dan en la Fig. 9. La Fig. 9 muestra los efectos de interferencia de ARN de las diversas muestras de complejo de SPG/ARN bicatenario cuando se añadían en una concentración de 0,5 nM. Por motivos de comparación, la Fig. 9 también muestra los efectos de interferencia de ARN medidos para un ARNip de 21 bases de longitud que tiene un extremo colgante de dos bases en el extremo 3', que se usa en métodos de ARNip, un ARN bicatenario de 27 bases de longitud, y ARN bicatenario que tiene polidA. Los resultados muestran que el complejo de SPG/ARN bicatenario mostraba efectos de interferencia de ARN reducidos en comparación con el ARN bicatenario de 27 bases de longitud. La razón para esto se cree que es que la adición de SPG1 debilitaba la interacción entre el oligonucleótido y Lipofectamine, haciendo por tanto que la captación celular sea inferior que la del ARNbc de 27nt, que provoca una capacidad disminuida de inhibir la expresión génica en comparación con la del ARNbc de 27nt. Por otro lado, los diversos complejos de SPG/ARN bicatenario preparados usando SPG modificados (SPG2 a SPG6) obtenidos modificando SPG con una molécula funcional mostraron efectos de interferencia de ARN sustancialmente equivalente a la capacidad del ARN bicatenario de 27 bases de longitud de inhibir la expresión génica. Esto reveló que estos complejos de SPG/ARN bicatenario poseían una capacidad potenciada de inhibir la expresión génica en comparación con la del complejo de SPG/ARN bicatenario preparado usando SPG1. Se cree que estos resultados se atribuyen al hecho de que la molécula funcional introducida en el SPG potenciaba la captación celular.

Un resumen de los resultados anteriores reveló que los diversos complejos de SPG/ARN bicatenario mostraban excelente resistencia a degradación enzimática y poca toxicidad, y por lo tanto, poseen durabilidad y seguridad potenciadas en comparación con ARNip generales. Los resultados anteriores también demostraron que, modificando SPG con diversos grupos funcionales, es posible construir complejos de SPG/ARN bicatenario que pueden alcanzar las células por sí mismos, sin usar un reactivo de transfección génica que tenga alta citotoxicidad.

Ejemplo de ensayo de referencia 1

El siguiente ensayo se realizó para demostrar que la técnica descrita en el documento no de patente 4 (Kazuo Sakurai, Polym. Preprints, Japón., volumen 49, página 4054, 2000) no puede producir alta eficacia de transfección cuando se aplica a ARN bicatenarios que tienen efectos de interferencia de ARN.

EGFP (proteína fluorescente verde potenciada) es una proteína fluorescente que consiste en 238 aminoácidos. Cuando se transfecta el gen de EGFP modificado por ingeniería genética en células vivas usando el vector pEGFP, se distribuye uniformemente en todas las células. El gen de EGFP forma un cromóforo por exposición a luz de excitación para producir fluorescencia (Fig. 11).

El vector pEGFP se fragmentó usando la enzima de restricción Sph I, y se unió un adaptador ODN (desoxinucleótido), al cual podría hibridarse el extremo 3' del vector, a polidA80mero. El producto resultante se hizo formar complejos con SPG (Fig. 10).

A células RAW forzadas a expresar Dectina-1 se añadieron ADN de diversas longitudes (por ejemplo, 800 a 2.500 pb) que tenían extremos en complejo, y se modificaron químicamente las cadenas laterales de ADN con una sustancia fluorescente, Alexa (Fig. 12). La relación entre la tasa de transfección celular y la longitud del ADN se examinó contando la cantidad de células donde se detectaba Alexa. Los resultados se muestran en la Fig. 13. En la Fig. 13, la tasa de transfección celular del CMV-EGFP preparado de acuerdo con el método de la Fig. 10 se muestra como 1.

La Fig. 13 muestra que la eficacia de transfección disminuye según va siendo mayor la longitud del ADN bicatenario. Es decir, se indicó que el método de ensayo era de poco uso práctico como técnica de suministro para transfectar pADN largos en células.

La Fig. 1 muestra las estructuras de diversos complejos de SPG/ARN formados.

La Fig. 2 muestra los resultados que validan si los diversos complejos de SPG/ARN se formaban o no.

La Fig. 3 muestra los resultados que validan si un complejo de SPG/ARN se formaba o no usando análisis espectral CD (gráfico de la izquierda); y los resultados que validan la temperatura de disociación del complejo de SRP/ARN usando análisis espectral CD (gráfico de la derecha).

La Fig. 4 muestra los resultados de evaluar el procesamiento por Dicer de diversos complejos de SPG/ARN.

La Fig. 5 muestra los resultados de evaluar la resistencia a nucleasa de diversos complejos de SPG/ARN (27 bases de longitud).

La Fig. 6 muestra los resultados de evaluar la resistencia a nucleasa de diversos complejos de SPG/ARN (21 bases de longitud).

La Fig. 7 muestra los resultados de evaluar la citotoxicidad de diversos complejos de SPG/ARN (27 bases de longitud).

La Fig. 8 muestra los resultados de evaluar la citotoxicidad de diversos complejos de SPG/ARN (21 bases de longitud).

La Fig. 9 muestra los resultados de evaluar los efectos de interferencia de ARN de diversos complejos de SPG/ARN.

La Fig. 10 es un diagrama esquemático que muestra el método para preparar CMV-EGFP.

La Fig. 11 muestra una micrografía de células tomada cuando se transfectaba el gen de EGFP en células vivas usando el vector pEGFP.

La Fig. 12 es un diagrama esquemático que muestra el método para preparar los ADN que tienen extremos en complejo y modificados químicamente con la sustancia fluorescente, Alexa, que se usaron en el Ejemplo de Ensayo de Referencia 1.

La Fig. 13 muestra los resultados obtenidos en el Ejemplo de Ensayo de Referencia 1.

La SEQ ID NO. 1 muestra la secuencia de R8.

La SEQ ID NO. 2 muestra la secuencia de tat.

La SEQ ID NO. 3 muestra la secuencia de 21S.

La SEQ ID NO. 4 muestra la secuencia de 27s.

La SEQ ID NO. 5 muestra la secuencia de la región de ARN pA40-27R1.

La SEQ ID NO. 6 muestra la secuencia de la región de ARN pA40-27R2.

La SEQ ID NO. 7 muestra la secuencia de 21as.

La SEQ ID NO. 8 muestra la secuencia de 27as.

La SEQ ID NO. 9 muestra la secuencia de 21s.

La SEQ ID NO. 10 muestra la secuencia de pA40-21.

La SEQ ID NO. 11 muestra la secuencia de pT40-21.

La SEQ ID NO. 12 muestra la secuencia de 21as.

Listado de secuencias

<110> NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

<120> Complejo de polisacárido y ARN bicatenario

<130> 2008003166

<150> JP2007-326510

<151> 18-12-2007

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de R8

<400> 1

Cys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1

5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de tat

<400> 2

ES 2 566 477 T3

	Cys	Gly	Gly	Ser	Gly	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg	Pro	Pro	Gln
	1				5					10					15		
5	<210> 3																
	<211> 21																
	<212> ARN																
	<213> secuencia artificial																
10	<220>																
	<223> secuencia de 21s																
	<400> 3																
	ggccuuucac uacuccuacg a 21																
15	<210> 4																
	<211> 27																
	<212> ARN																
	<213> secuencia artificial																
20	<220>																
	<223> secuencia de 27s																
	<400> 4																
	cuggccuuuc acuacuccua cgagcac 27																
25	<210> 5																
	<211> 27																
	<212> ARN																
	<213> secuencia artificial																
30	<220>																
	<223> Secuencia de la región de ARN de la cadena pA40-27R1																
	<400> 5																
35	cuggccuuuc acuacuccua cgagcac 27																
	<210> 6																
	<211> 27																
	<212> ARN																
40	<213> secuencia artificial																
	<220>																
	<223> Secuencia de la región de ARN de la cadena pA40-27R2																
	<400> 6																
45	cuggccuuuc acuacuccua cgagcac 27																
	<210> 7																
	<211> 21																
50	<212> ARN																
	<213> secuencia artificial																
	<220>																
	<223> Secuencia de 21as																
55	<400> 7																
	gaccggaaag ugaugaggau g 21																
	<210> 8																
60	<211> 27																
	<212> ARN																
	<213> secuencia artificial																
	<220>																

<223> Secuencia de 27as
 <400> 8
 gaccggaaag ugaugaggau gcucgug 27
 5
 <210> 9
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> secuencia de 21s
 <400> 9
 gguggugacg aucugggcuu u 21
 15
 <210> 10
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> secuencia de pA40-21
 <400> 10
 gguggugacg aucugggcuu u 21
 25
 <210> 11
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> secuencia de pT40-21
 <400> 11
 gguggugacg aucugggcuu u 21
 35
 <210> 12
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> secuencia de 21 as
 <400> 12
 uuucgggucu agcaguggug g 21
 45

REIVINDICACIONES

1. Un complejo de polisacárido/ARN bicatenario, que es un complejo de ARN bicatenario y polisacárido que tiene un esqueleto de β -1,3-glucano,
 5 en el que el ARN bicatenario tiene un ARN de cadena con sentido que consiste en una secuencia de bases complementaria a una secuencia diana en un gen diana y un ARN de cadena antisentido que contiene una secuencia de bases complementaria al ARN de cadena con sentido, y el ARN bicatenario puede inhibir la expresión del gen diana;
 el ARN bicatenario tiene una polidesoxiadenina monocatenaria unida directamente al extremo de al menos uno de
 10 los ARN de cadena con sentido y de cadena antisentido; y
 el polisacárido y la polidesoxiadenina monocatenaria forman un complejo.
2. El complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en la reivindicación 1, en el que el ARN de cadena con sentido consiste en 15 a 50 ribonucleótidos, y el ARN de cadena antisentido consiste en la misma cantidad de
 15 ribonucleótidos que el ARN de cadena con sentido.
3. El complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en la reivindicación 1, en el que el ARN de cadena con sentido consiste en 21 ribonucleótidos, y el ARN de cadena antisentido consiste en la misma cantidad de
 20 ribonucleótidos que el ARN de cadena con sentido.
4. El complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en la reivindicación 1, en el que el ARN de cadena con sentido consiste en 27 ribonucleótidos, y el ARN de cadena antisentido consiste en la misma cantidad de
 ribonucleótidos que el ARN de cadena con sentido.
- 25 5. El complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en la reivindicación 1, en el que la polidesoxiadenina monocatenaria consiste en 20 a 100 desoxiadeninas.
6. El complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en la reivindicación 1, en el que la polidesoxiadenina monocatenaria se une directamente al extremo 5' y/o 3' del ARN de cadena con sentido o ARN de cadena
 30 antisentido.
7. El complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en la reivindicación 1, en el que el polisacárido es al menos un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en esquizofilano, curdlano, lentinano, paquimano, grifolano, y esquero-glucano.
 35
8. El complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en la reivindicación 1, en el que el polisacárido es un β -1,3-glucano al cual se une una molécula funcional.
9. El complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en la reivindicación 1, en el que un gen diana del ARN
 40 bicatenario es endógeno a una célula que tiene un receptor que se une al polisacárido.
10. El complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en la reivindicación 9, en el que la célula es una célula que expresa Dectina-1 en la superficie de membrana de la célula.
- 45 11. Un proceso para producir el complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en la reivindicación 1, en el que el ARN bicatenario tiene un ARN de cadena con sentido que consiste en una secuencia de bases complementaria a una secuencia diana en un gen diana y un ARN de cadena antisentido que contiene una secuencia de bases complementaria al ARN de cadena con sentido, y puede inhibir la expresión del gen diana; comprendiendo el proceso:
 50 una etapa de mezclar un polisacárido que tiene un esqueleto de β -1,3-glucano en una relación de 1 a 6 moles a 1 mol del ARN bicatenario que se une a un polinucleótido que tiene una polidesoxiadenina monocatenaria unida directamente al extremo de al menos una de la cadena con sentido y cadena antisentido, formando de ese modo un complejo de la polidesoxiadenina monocatenaria y el polisacárido.
 55
12. Un uso de complejo de polisacárido que tiene un esqueleto de β -1,3-glucano/ARN bicatenario para inhibir la expresión de un gen diana *in vitro* o *ex vivo*,
 en el que el complejo de polisacárido/ARN bicatenario contiene ARN bicatenario que tiene un ARN de cadena con sentido que consiste en una secuencia de bases complementaria a una secuencia diana en un gen diana y un ARN
 60 de cadena antisentido que contiene una secuencia de bases complementaria al ARN de cadena con sentido, y capaz de inhibir la expresión del gen diana;
 el ARN bicatenario tiene una polidesoxiadenina monocatenaria unida directamente al extremo de al menos uno de los ARN de cadena con sentido y de cadena antisentido; y
 el polisacárido y la polidesoxiadenina monocatenaria forman un complejo.
 65
13. El complejo de polisacárido/ARN bicatenario definido en la reivindicación 1, para su uso en la inhibición de la

expresión de un gen diana en una célula, comprendiendo dicho uso una etapa de introducir dicho complejo de polisacárido/ARN bicatenario en dicha célula.

Fig. 1

A. SPG modificados

SPG 

SPG1 : SPG (no modificado)

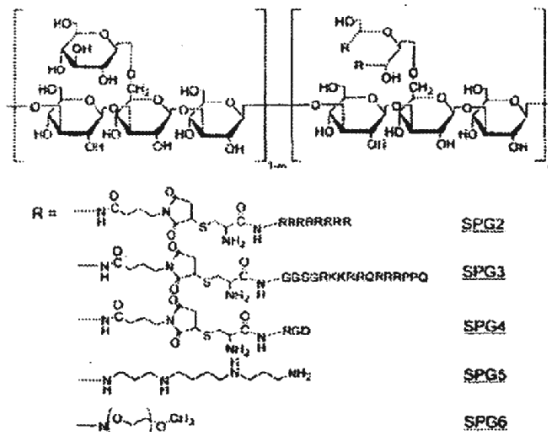
SPG2 : Péptido R8-SPG modificado

SPG3 : Péptido tat-SPG modificado

SPG4 : Péptido RGD-SPG modificado

SPG5 : Espermina-SPG modificado

SPG6 : PEG-SPG modificado



B. Oligonucleótidos bicatenarios

21s/21as (ARNip21)

3' Con sentido (21) 5'

Antisentido (21)

27s/27as (ARNbc27)

5' Con sentido (27) 3'

3' Antisentido (27) 5'

pA40-27R1/27as

5' dA(40) 3' Con sentido (27) 3'

Antisentido 5'

pA40-27R2/27as

5' dA(40) 3' Con sentido (27) 3'

6-S Antisentido 5'

pA40-27R1/27as/SPG (SPG = SPG1~SPG6)

5' dA(40) 3' Con sentido (27) 3'

Antisentido 5'

pA40-27R2/27as/SPG (SPG = SPG1~SPG6)

5' dA(40) 3' Con sentido (27) 3'

6-S Antisentido 5'

Fig. 2

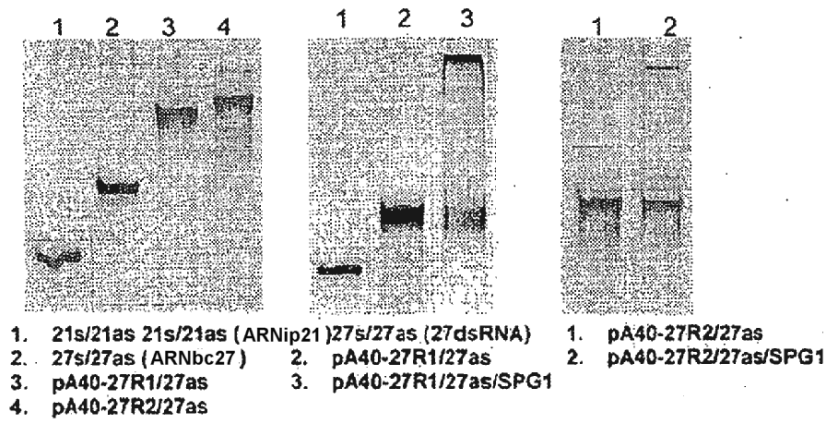


Fig. 3

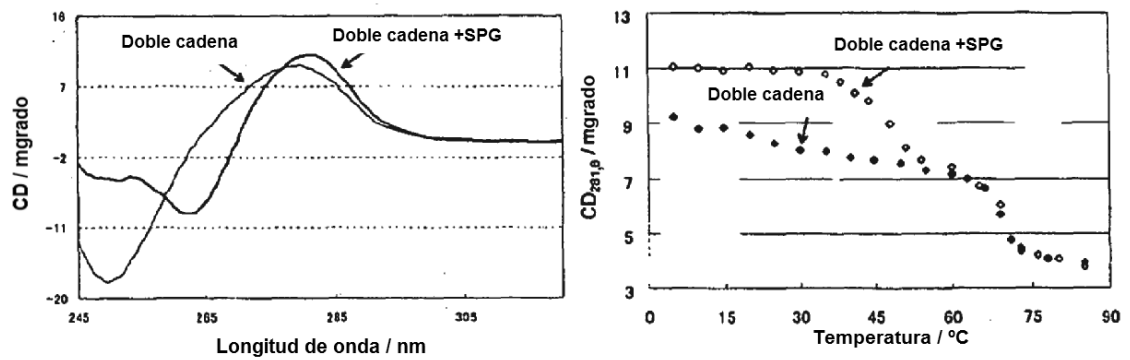


Fig. 4

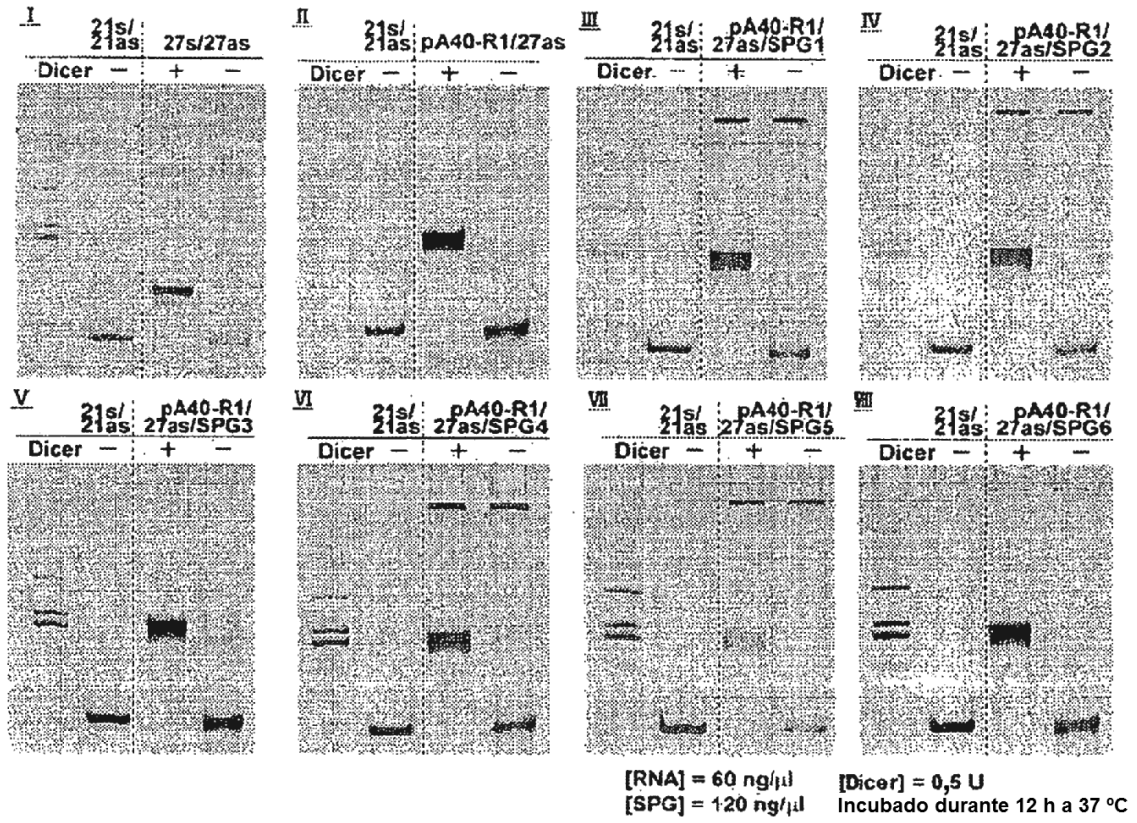


Fig. 5

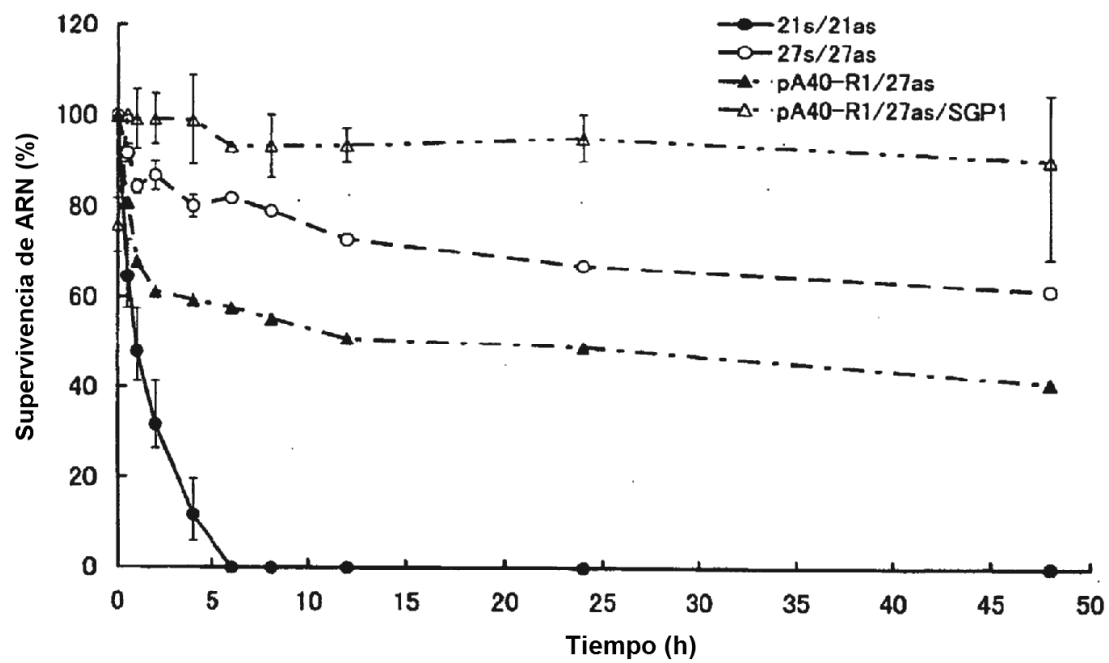


Fig. 6

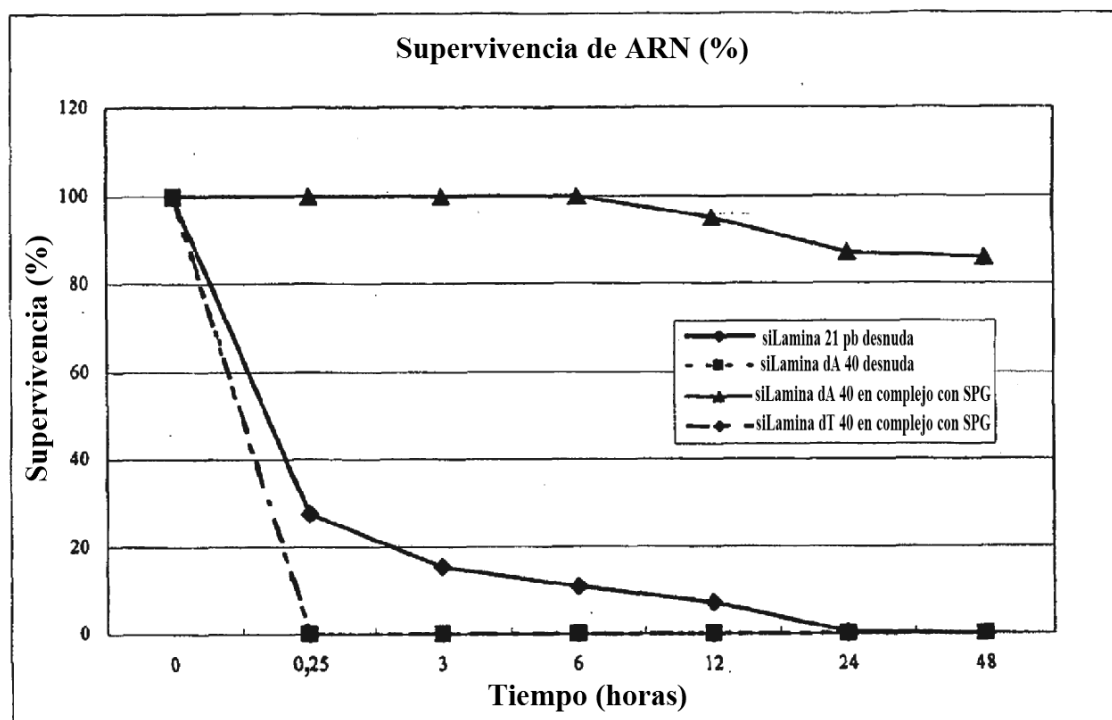


Fig. 7

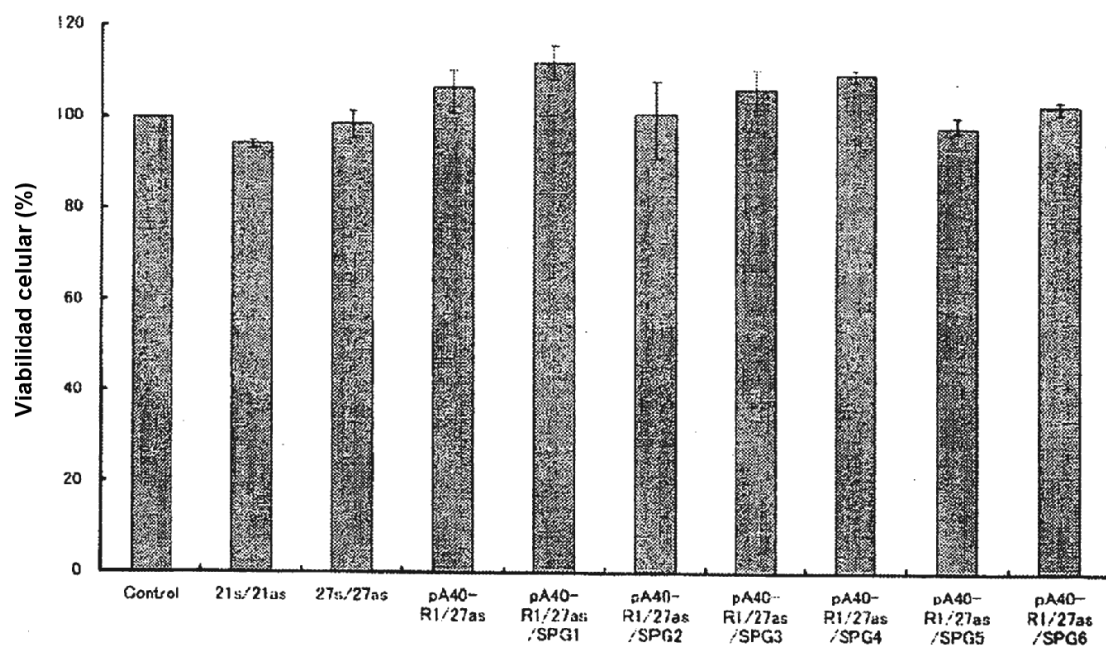


Fig. 8

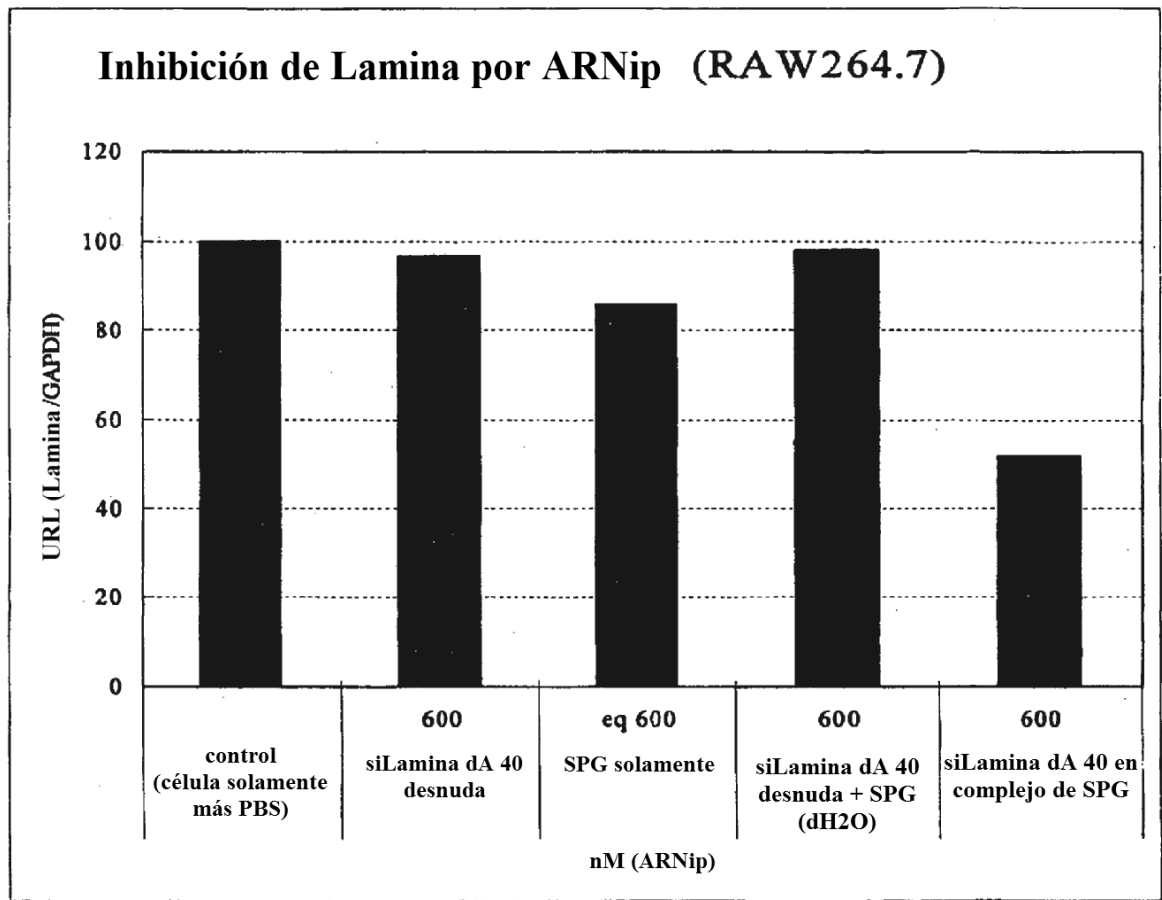


Fig. 9

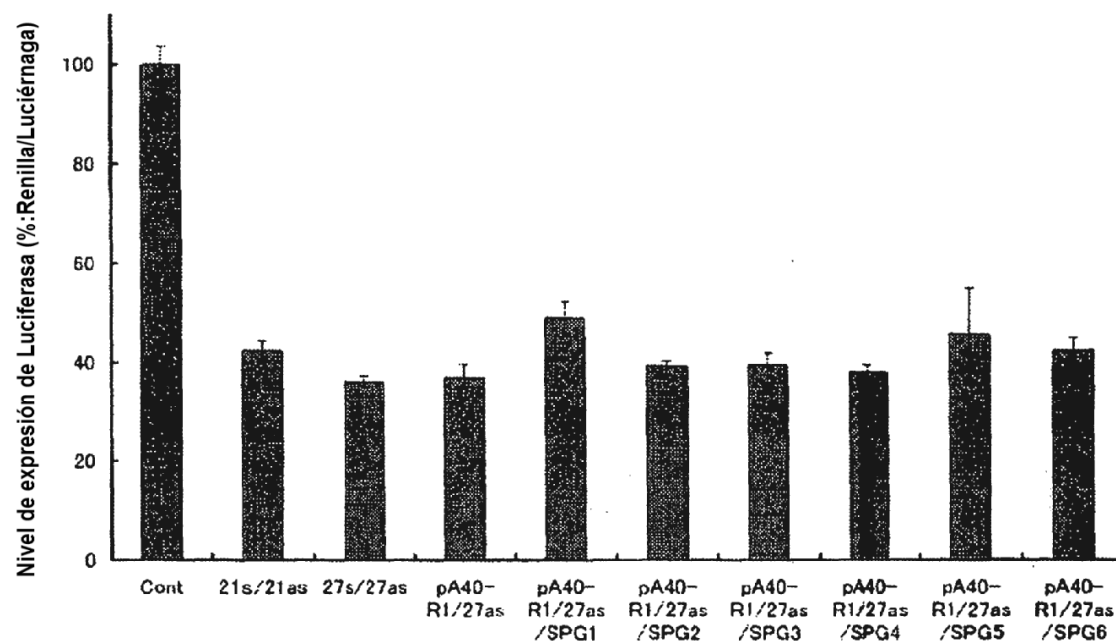


Fig. 10

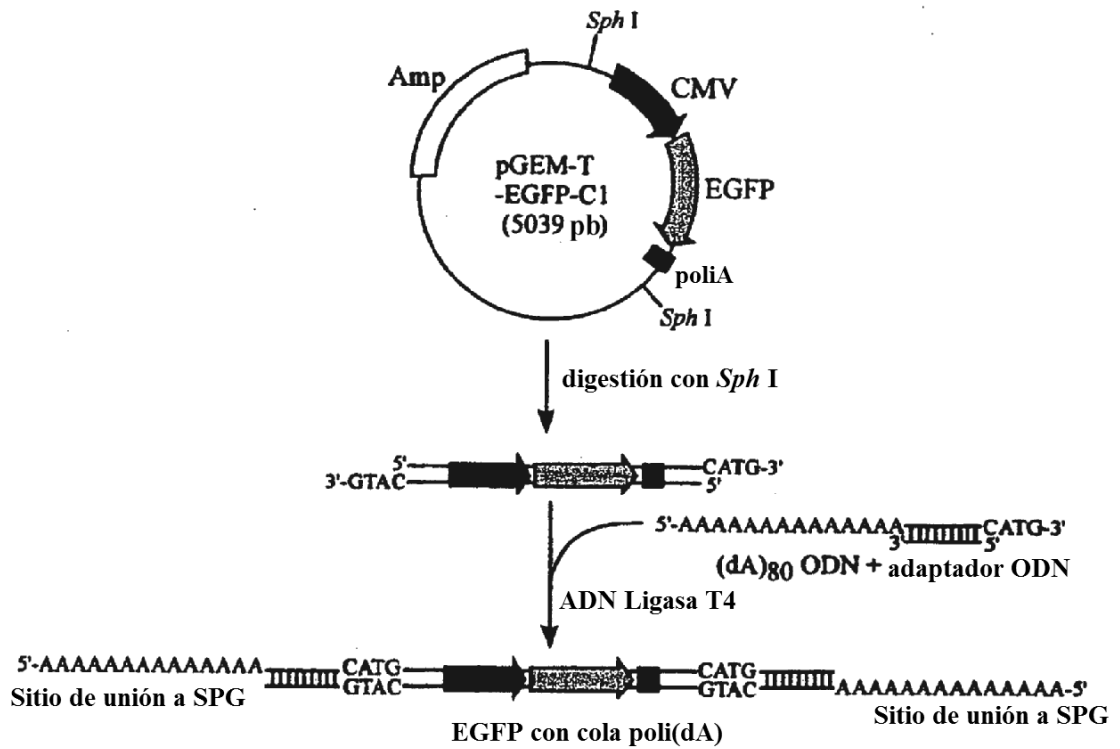


Fig. 11

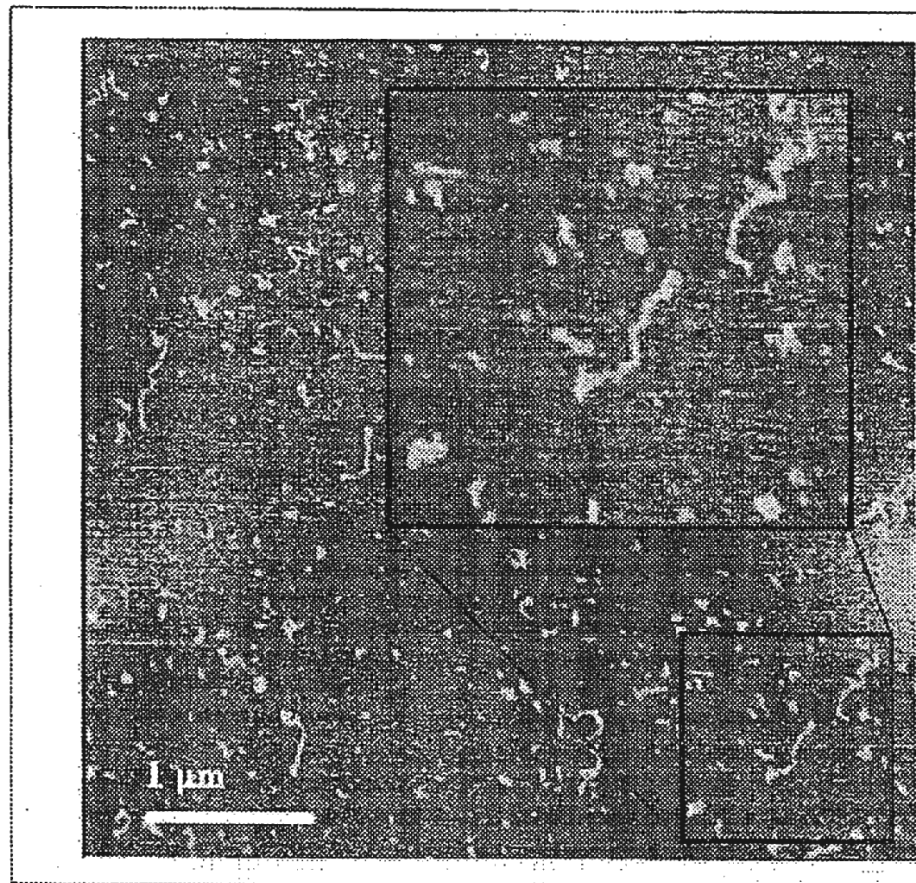


Fig. 12

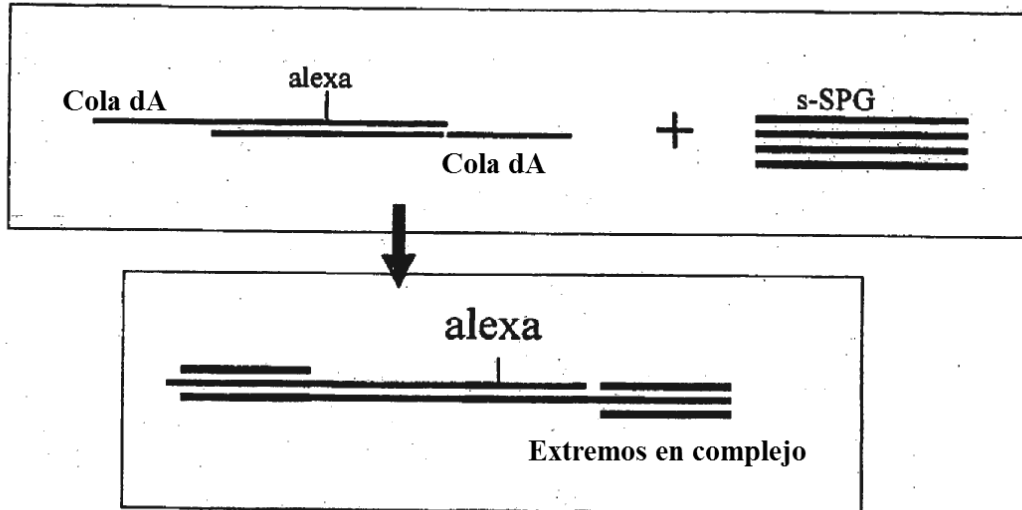


Fig. 13

