

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 677**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2004 E 09169380 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2141234**

54 Título: **Análogos de ARN interfirientes cortos**

30 Prioridad:

21.03.2003 US 456888 P
30.01.2004 DK 200400145
31.10.2003 DK 200301625
21.03.2003 DK 200300442

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.07.2016

73 Titular/es:

ROCHE INNOVATION CENTER COPENHAGEN
A/S (100.0%)
Fremtidsvej 3
2970 Horsholm, DK

72 Inventor/es:

ELMÉN, JOACIM;
WAHLESTEDT, CLAES;
LIANG, ZICAI;
SORENSEN, ANDERS;
ØRUM, HENRIK y
KOCH, TROELS

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 576 677 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

Análogos de ARN interfirientes cortos

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nuevos análogos de ARN interfiriente pequeño (ARNip) de doble cadena que comprenden monómeros de ácido nucleico bloqueado (ANB). Dichos compuestos inducen un silenciamiento génico transcripcional específico de secuencia en muchos organismos mediante un procedimiento conocido como interferencia de ARN (iARN). Los compuestos dados a conocer en la presente memoria presentan propiedades mejoradas en comparación con los ARNip no modificados y, de acuerdo con ello, demuestran ser útiles como agentes terapéuticos, por ejemplo en el tratamiento de diversas formas de cáncer.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El descubrimiento del ARN de interferencia (ARNi) en *C. elegans* fue realizado por Fire et al. (Nature 391:806-811, 1998). Se encontró que tramos largos de ARN de doble cadena (ARNdc) presentaban un potente efecto de inactivación de la expresión génica que podía prolongarse durante generaciones en dicho gusano. El ARN de interferencia (ARNi) se ha convertido rápidamente en una herramienta genómica funcional en *C. elegans* (se proporciona una revisión de la interferencia de ARN temprano en Fire (TIG 15:358-363, 1999) y en Boshier y Labouesse (Nature Cell Biology 2:E31-E36, 2000)). Los primeros estudios en los que se ha demostrado que funciona la interferencia de ARN se llevaron a cabo en embriones de pez cebra y en oocitos de ratón (Wargelius et al., Biochem. Biophys. Res. Com. 263:156-161, 1999; Wianny y Zernicka-Goetz, Nature Cell Biology 2:70-75, 2000). Debido a que el ARNdc induce efectos no específicos en las células de mamífero, se ha argüido que estos mecanismos no se encuentran totalmente desarrollados en el sistema embrionario del ratón (Alexopoulou et al., Nature 413:732-738, 2001; revisiones: Stark et al., Annu. Rev. Biochem. 67:227-264, 1998, y Samuel, Clin. Micro. Rev. 14:778-809, 2001).

Respecto a *C. elegans* y *Drosophila*, se ha demostrado que las cadenas de ARNi largas resultan degradadas en dobles cadenas cortas (21 a 23 nucleótidos) y que estas formas degradadas median en la interferencia (Zamore et al., Cell 101:25-33, 2000, y Elbashir et al., Gen. Dev. 15:188-200, 2001). Elbashir et al. (Gen. Dev. 15:188-200, 2001) han demostrado que resulta cortada de manera equivalente una diana de sentido o antisentido y que ambas cadenas en el ARNip pueden guiar el corte con diana en ARN antisentido o sentido, respectivamente. Elbashir et al. han demostrado inequívocamente (Nature 411:494-498, 2001) que los ARNip median en una potente inactivación en una diversidad de líneas celulares de mamífero y que probablemente han escapado a los efectos no específicos adversos del ARNdc largo en las células de mamífero. Este resultado es un hito en la biología moderna y la aplicación de los ARNip como terapéuticos se ha convertido rápidamente en un campo atractivo de investigación (revisión en McManus y Sharp, Nature Reviews Genetics 3:737-747, 2002, y Thompson, DDT 7:912-917, 2002).

Los ARNdc son bastante estables en medios biológicos. Sin embargo, en el momento en que se disocia el dúplex en las cadenas individuales, éstas son, en virtud de que son de ARN, degradadas inmediatamente. Una de las estrategias para generar una mayor estabilidad en el ARNip ha sido introducir residuos de ARN modificados químicamente dentro de las cadenas individuales del ARNip. Es bien conocido que los análogos sintéticos de ARN son mucho más estables en medios biológicos y que la estabilidad incrementada también resulta inducida a los residuos de ARN nativo próximos. La expresión mayor estabilidad se refiere principalmente a una resistencia incrementada a nucleasas, aunque dichas modificaciones también pueden proporcionar mejores incorporación celular y distribución en los tejidos. Se han descrito varios análogos de ARNip.

El pre-ARNip (Parrish et al., Mol. Cell. 6:1077-1087, 2000) muestra tolerancia a determinadas modificaciones del esqueleto de ARNi en *C. elegans*. Mediante la transcripción in vitro de dos cadenas diferentes en presencia de nucleótidos modificados ha resultado posible demostrar que los fosforotioatos son tolerados tanto en la cadena de sentido como en la antisentido, al igual que el 2'-fluorouracilo en lugar del uracilo. El 2'-aminouracilo y la 2'-aminocitidina reducen la actividad del ARNi al incorporarse en la cadena sentido y la actividad resulta completamente anulada al incorporarse en la cadena antisentido. Con un intercambio del uracilo por 2'-desoxitimidina en la cadena sentido, también se reduce el efecto, y todavía más al producirse el intercambio en la cadena antisentido. En el caso de que una o ambas cadenas consistan totalmente de monómeros de ADN, se anula la actividad de ARNi. En el estudio anteriormente indicado, también se investigaron modificaciones de bases. Se encontró que el 4-tiouracilo y el 5-bromouracilo resultan tolerados en ambas cadenas, mientras que el 5-yodouracilo y el 5-(3-aminoalil)uracilo reducen el efecto en la cadena sentido y todavía más en la cadena antisentido. La sustitución de la guanosina por inosina reduce marcadamente la actividad, con independencia de si la modificación se lleva a cabo en la cadena sentido o antisentido.

Sin embargo, los extremos 3' protuberantes de UU pueden intercambiarse por extremos 3' protuberantes de 2'-

desoxitimidina y resultan bien tolerados (Elbashir et al., Nature 411:494-498, 2001, y Boutla et al., Curr. Biol. 11:1776-1780, 2001).

5 También se ha demostrado pueden incorporarse monómeros de ADN en la cadena sentido sin comprometer la actividad.

10 Elbashir et al. (EMBO 20:6877-6888, 2001) han demostrado que el ARNip modificado que contiene cuatro desoxinucleótidos en cada extremo 3' del ARNip mantiene su actividad completa. Además, se encontró que la actividad resultaba anulada en el caso de que el ARNip contuviese únicamente un desapareamiento de un par de bases en la "parte intermedia" de la molécula.

15 Sin embargo, también se ha informado de que pueden tolerarse 1-2 desapareamientos con la condición de que estos se introduzcan en la cadena sentido (Holen et al., NAR 30:1757-1766, 2002; Hohjoh, FEBS Lett. 1-5:26179, 2002; Hamada et al., Antisense and Nucl. Acid Drug Dev. 12:301-309, 2002, y Boutla et al., Curr. Biol. 11:1776-1780, 2001).

20 Nykänen et al. (Cell 107:309-321, 2001) han demostrado la necesidad de ATP para producir ARNip a partir de ARNi, aunque también en las últimas etapas para que se ejerza la actividad del ARNip. El ATP resulta necesario para desenrollar y mantener un 5'-fosfato para el reconocimiento de RISC. El fosfato 5' resulta necesario para la actividad del ARNip. Martínez et al. (Cell 110:563-574, 2002) han demostrado que una cadena individual puede reconstituir el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés, Hammond et al., Nature 404:293-296, 2000) y que una única cadena antisentido presenta actividad especialmente en el caso de que el extremo 5' se encuentre fosforilado. La modificación 5' de la cadena antisentido inhibe la actividad, mientras que tanto el extremo 3' como el extremo 5' pueden ser modificados en la cadena sentido.

25 Amarzguioui et al. (NAR 31:589-595, 2003) han confirmado los resultados anteriormente indicados y concluyeron que se toleraba un desapareamiento con la condición de que no estuviese excesivamente próximo al extremo 5' de la cadena antisentido. Un desapareamiento 3 a 5 nucleótidos del extremo 5' de la cadena antisentido reduce marcadamente la actividad. Sin embargo, se demostró que se toleran dos desapareamientos en el caso de que se encuentren en la "parte intermedia" o hacia el extremo 3' de la cadena antisentido, aunque con una actividad ligeramente más baja.

30 Se han introducido modificaciones, tales como los fosforotioatos y el 2'-O-metil ARN en los extremos del ARNip (Amarzguioui et al., NAR 31:589-595, 2003) y resultan bien toleradas. La 2'-O-alilación reduce su efecto en caso de encontrarse en el extremo 5' de la cadena antisentido.

40 El análogo nucleósido bicíclico ENA (2'-O,4'-C-etilén-timidina (ENA timidina, eT) también ha sido incorporado en el ARNip (Hamada et al., Antisense and Nucl. Acid Drug Dev. 12:301-309, 2002). Se ha demostrado que dos ENA timidina en el extremo 5' de la cadena sentido deterioran el efecto. Hamada et al. (2002) han concluido que: "la utilización de 2'-O,4'-C-etilén-timidina, que es un componente de los ácidos nucleicos puenteados con etileno (ENA, por sus siglas en inglés), anula por completo el ARN de interferencia".

45 Más recientemente, varios ARNip que contienen monómeros de ANB incorporados han sido descritos por Braasch et al. (Biochemistry 42:7967-7975, 2003). El documento nº WO 2004/041889 da a conocer ARNip modificados con ANB. En conclusión, se ha demostrado que la cadena antisentido es más sensible a las modificaciones que la cadena sentido. Sin limitarse a ninguna teoría específica, dicho fenómeno se cree que se basa por lo menos parcialmente en el hecho de que la estructura del dúplex de antisentido/diana debe ser ARN nativo de forma A. La cadena sentido del ARNip puede considerarse un "vehículo" para la administración de la cadena antisentido en la diana y la cadena sentido no participa en la degradación del ARN catalizada enzimáticamente. De esta manera, en contraste con la cadena antisentido, las modificaciones en la cadena sentido resultan toleradas dentro de una determinada ventana aunque las modificaciones induzcan cambios en la estructura de forma A del ARNip. En el caso de que se introduzcan cambios en la cadena antisentido, deben equilibrarse estructuralmente dentro del marco de reconocimiento del complejo de silenciamiento inducido por ARN nativo (RISC).

55 Existe una necesidad evidente en el campo de nuevos y mejorados análogos de ARNip que presenten propiedades in vivo potentes, una bioestabilidad incrementada (correspondiente a una T_f incrementada), una resistencia a nucleasas incrementada, una incorporación celular mejorada y/o una distribución en los tejidos mejorada en comparación con los compuestos de ARNip de los que se dispone actualmente.

60 De esta manera, el objetivo de la presente invención es proporcionar análogos de ARNip mejorados que presenten una o más de las propiedades mejoradas que se han indicado anteriormente. La presente invención proporciona de esta manera análogos de ARNip mejorados que, entre otros, muestran un grado elevado de bioestabilidad y/o estabilidad frente a nucleasas y que reconozca eficientemente el ARN, tal como ARNm o pre-ARNm, para una

diversidad de ARN estructurales, tales como ARNt, ARNnp, ARNcp, ARNr o incluso ARN reguladores tales como los microARN.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en un primer aspecto la presente invención se refiere a un compuesto de doble cadena capaz de interferencia con el ARN, que comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, en el que cada cadena comprende 12 a 35 nucleótidos y en el que dicho compuesto comprende por lo menos un monómero de ácido nucleico bloqueado (ANB).

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la invención y a un diluyente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un compuesto según la presente invención para la utilización como medicamento.

En un aspecto todavía adicional, la presente invención se refiere a la utilización de un compuesto según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer o del síndrome respiratorio agudo severo (SRAS).

En un aspecto todavía adicional, los compuestos de la presente invención pueden utilizarse en un método para el tratamiento del cáncer o del síndrome respiratorio agudo severo (SRAS), comprendiendo dicho método la administración de un compuesto según la invención o una composición farmacéutica según la invención en un paciente que lo necesita.

Otros aspectos de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción, posteriormente, y las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 muestra las dos conformaciones de furanosa (tipo S y tipo N).

La FIG. 2 muestra la estabilidad mejorada de ANBip en comparación con ARNip en líquidos biológicos. GL3+/- resulta rápidamente degradado, mientras que el ANBip ligeramente modificado (n° 2185/2186) y ANBip más fuertemente modificado (n° 2703-01/2186) muestran una estabilidad marcadamente mejorada. El estudio de estabilidad se llevó a cabo en suero de feto bovino al 10% en solución salina fisiológica a 37°C.

La FIG. 3 muestra la regulación negativa del gen NPY endógeno en células PC12 por parte de los ANBip. Los compuestos sometidos a ensayo fueron (de izquierda a derecha): 2° columna: ARNip no relacionado; 3° columna: NPY+/1, 4° columna: 2796/NPY-; 5° columna: 2795/NPY+; 6° columna: NPY+/2797; 7° columna: 2796/2797.

La FIG. 4 muestra el efecto del ANBip con diana en la luciferasa de luciérnaga y la modulación de la expresión. Las líneas de la izquierda representan cadenas sentido y las líneas de la derecha representan la cadena antisentido del ANBip. Las marcas en las líneas individuales representan la posición de los monómeros de ANB. Las dos últimas líneas de la derecha representan ARNip de control. La primera columna (a la izquierda) representa la expresión de informador luciferasa no modulado respecto al que se normalizan todas las muestras. Los compuestos sometidos a ensayo fueron (de izquierda a derecha): 2° columna: GL3+/-; 3° columna: GL3+/2186; 4° columna: GL3+/2187; 5° columna: 2184/GL3-; 6° columna: 2184/2186; 7° columna: 2184/21187; 8° columna: 2185/GL3-; 9° columna: 2185/2186; 10° columna: 2185/2187; 11° columna: 2703-1/GL3-; 12° columna: 2703-1/2186; 13° columna: GL3+/2189; 14° columna: ARNip no relacionado.

La FIG. 5 muestra el efecto del ANBip con diana en la luciferasa de *Renilla* y la modulación de la expresión. Las líneas de la izquierda representan cadenas sentido y las líneas de la derecha representan la cadena antisentido del ANBip. Las marcas en las líneas individuales representan la posición de los monómeros de ANB. La primera columna representa la expresión de informador luciferasa no modulado respecto al que se normalizan todas las muestras. Los compuestos sometidos a ensayo fueron (de izquierda a derecha): 2° columna: RL+/-; 3° columna: RL+/2699-1; 4° columna: 2700-1/2699-1; 5° columna: 2702-1/2699-1; 6° columna: RL+/2701-1; 7° columna: 2700-1/2701-1; 8° columna: 2702-1/2701-1.

La FIG. 6 muestra la estabilidad en suero de rata de oligos de cadena sencilla que contienen monómeros de ANB y ARN, ARN de doble cadena (dc) y ARN de cadena sencilla (cs). Los ARNdc y ARNcs se degradaron inmediatamente, mientras que pudieron detectarse oligos de cadena sencilla intactos que contenían monómeros de ANB y ARN tras 20 a 40 minutos. Los oligos sometidos a ensayo eran 2189 y los ARNcs (GL3-) y ARNdc (GL3+/1)

correspondientes.

La FIG. 7 muestran compuestos de ANBip y ARNip con diana en SRAS. Letras mayúsculas: monómero beta-D-oxi-ANB. Letras minúsculas: monómero de ARN.

5 La FIG. 8 muestra el efecto citopático (ECP) en células Vero infectadas por SRAS y el ECP reducido tras el tratamiento con ARNip. Se muestra el ARNip SRAS 1. El control se trató con sólo el agente de transfección lipofectamina-2000. También se muestran las células no infectadas.

10 La FIG. 9 muestra la inhibición de la citotoxicidad inducida por SRAS por parte de ARNip y ANBip. Los compuestos sometidos a ensayo fueron: SRAS 1: 2842-1/2843-1; SRAS 2: 2872-1/2845-1; SRAS 3: 2846-1/2847-1; SRAS 4: 2848-1/2849-1, así como los ARNip no modificados correspondientes. No pudo detectarse ninguna diferencia en el tratamiento con ANBip y ARNip para el sitio más eficiente, SRAS 1. El sitio de eficiencia intermedia, SRAS 3, se mejoró con ANBip para ser tan eficiente como el sitio SRAS 1. Los dos sitios que no mostraron eficiencia de ARNip en absoluto, SRAS 2 y SRAS 4, tampoco mostraron ningún efecto por el tratamiento de ANBip. El efecto inhibitor se redujo a dosis víricas elevadas (60.000 DICT50). Los controles eran ARNip y ANBip de luciferasa (Luc) y de neuropéptido Y (NPY). No se observaron efectos adversos con los controles de ANBip. Se midió la citotoxicidad como liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) 50 horas después de la infección. Los diferentes gráficos representan dosis víricas diferentes (dosis infecciosa de cultivo de tejidos 50, DICT50).

20 La FIG. 10 muestra el mecanismo propuesto de carga de RISC en el que la helicasa se desenrolla el dúplex de ARNip en el extremo de unión más débil.

25 La FIG. 11 muestra el efecto de desapareamiento de un solo par de bases incorporado frente al extremo 5' de la cadena antisentido. Las líneas son ARN; los círculos indican monómeros de ANB y las cruces ilustran incorporaciones de desapareamiento. Los compuestos sometidos a ensayo eran (de izquierda a derecha): Luciferasa de Renilla: 2º columna: RL+/-; 3º columna: RL+/2701-1; 4º columna: RL+(pos. 19A→C)/2701-1; 5º columna: RL+(pos. 19A→C)/-; Luciferasa de luciérnaga: 2º columna: GL3+/-; 3º columna: GL3+/2187; 4º columna: GL3+(pos. 19A→C)/2187-1; 5º columna: GL3+(pos. 19A→C)/-.

30 La FIG. 12 muestra el efecto de la posición del monómero de ANB en la cadena antisentido. Las líneas son ARN; los círculos indican monómeros de ANB. Los compuestos sometidos a ensayo eran (de izquierda a derecha): 2º columna: GL3+/-; 3º columna: GL3+/2187; 4º columna: GL3+/2789; 5º columna: GL3+/2790; 6º columna: GL3+/2792; 7º columna: GL3+/2793; 8º columna: GL3+/2794; 9º columna: GL3+/2864; 10º columna: GL3+/2865; 11º columna: GL3+/2866; 12º columna: GL3+/2867.

40 La FIG. 13 muestra la mejora por ANBip de sitios diana de eficiencia intermedia. MOCK representa la ausencia de oligo. Ren1 es el sitio diana óptimo para ANRip y Ren2 y Ren3 son sitios potentes Jess. Las líneas son ARN; los círculos indican monómeros de ANB. Los compuestos sometidos a ensayo fueron: Ren1: RL+/-; Ren2: 2863/cadena antisentido no modificada correspondiente; Ren3: 2826/cadena antisentido no modificada correspondiente, así como los ARNip no modificados correspondientes.

La FIG. 14 muestra el efecto de silenciamiento génico dependiente de la concentración de ANBip y ARNip.

45 La FIG. 15 muestra diseños mejorados de ARNip modificados mediante la incorporación de monómeros de ADN y ANB.

50 La FIG. 16 muestra la eficacia reducida de ANBip mediante la utilización de un monómero de ANB con una nucleobase voluminosa (T en lugar de U) en la posición de corte 10 en la cadena antisentido. Los compuestos sometidos a ensayo fueron: ARNip GL3+/-; ANBip10T: GL3+/2865; ANBip10U: GL3+/2865-U.

La FIG. 17 muestra la inhibición de diana sentido/antisentido de SRAS en 3'-UTR de luciferasa de luciérnaga.

55 La FIG. 18 muestra el efecto antitumoral in vivo de dos ANBip anti-PFVm (3029/3031 y 3030/3031) en ratones NMRI xenoinjertados con 15Pc3-PFVm.

60 La FIG. 19 muestra el volumen tumoral de ratones NMRI xenoinjertados con 15PC3-EGFP tratados con ANBip y solución salina utilizando minibombas Alzet 1007D. Los tumores se implantaron el día 0. El tratamiento se inició el día 7 y se terminó el día 12. Tal como puede observarse, los ratones tratados con ANBip presentaban un tamaño tumoral correspondiente a los ratones de control.

La FIG. 20 muestra que los dúplex de ANBip se encontraban intactos tras 7 días con minibombas Alzet 1007D.

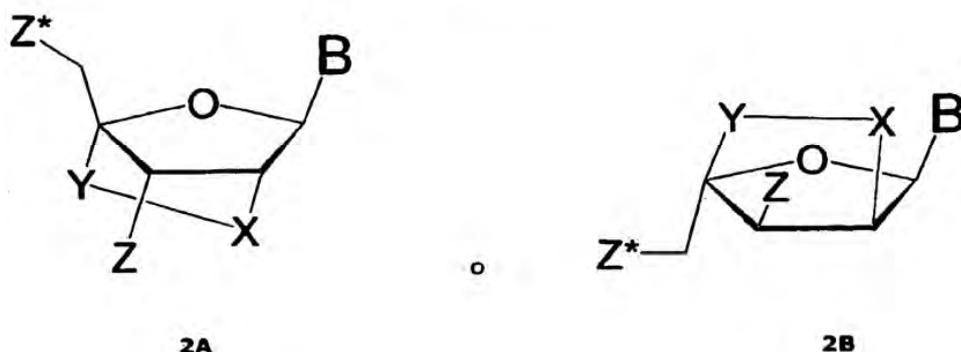
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIONDefiniciones

5 En el presente contexto, el término "nucleótido" se refiere a una unidad 2-desoxirribosa (ADN) o una unidad de ribosa (ARN) que se une mediante su carbono número uno a una base nitrogenada, tal como adenina (A), citosina (C), timina (T), guanina (G) o uracilo (U), y que se une mediante su átomo de carbono cinco a un grupo de enlace entre nucleósido (tal como se define posteriormente) o a un grupo terminal (tal como se define posteriormente). De acuerdo con lo anterior, el término "nucleótido" tal como se utiliza en la presente memoria comprende unidades (o monómeros) de ARN que comprenden una unidad de ribosa que se une mediante su carbono número uno a una base nitrogenada, tal como A, C, T, G o U, y que se une mediante su átomo de carbono número cinco a un grupo fosfato o a un grupo terminal. De acuerdo con lo anterior, el término "nucleótido" comprende además unidades (o monómeros) de ADN que comprenden una unidad 2-desoxirribosa que se une mediante su carbono número uno a una base nitrogenada, tal como A, C, T, G o U, y que se une mediante su átomo de carbono número cinco a un grupo fosfato o a un grupo terminal. El término "nucleótido" cubre además variantes o análogos de dichos monómeros de ARN y ADN. Se proporciona posteriormente una exposición detallada de dichas variantes o análogos de monómero de ARN y ADN.

20 En el presente contexto, el término "nucleósido" se refiere a una unidad 2-desoxirribosa (ADN) o a una unidad de ribosa (ARN) que se une mediante su carbono número uno a una base nitrogenada, tal como adenina (A), citosina (C), timina (T), guanina (G) o uracilo (U). De acuerdo con lo anterior, el término "nucleósido" comprende unidades (o monómeros) de ARN que comprenden una unidad de ribosa que se une mediante su carbono número uno a una base nitrogenada, tal como A, C, T, G o U. Análogamente, el término "nucleósido" comprende además unidades (o monómeros) de ADN que comprenden una unidad de 2-desoxirribosa que se une mediante su carbono número uno a una base nitrogenada, tal como A, C, T, G o U. El término "nucleósido" cubre además variantes o análogos de dichos monómeros de ARN y ADN. Se entenderá que los nucleósidos individuales se unen entre sí mediante un grupo de enlace entre nucleósidos.

30 Al utilizarlos en el presente contexto, las expresiones "monómero de ácido nucleico bloqueado", "residuo ácido nucleico bloqueado", "monómero de ANB" o "residuo de ANB" se refieren a un análogo de nucleótido bicíclico. Los monómeros de ANB se describen en, entre otros, los documentos nº WO 99/14226, nº WO 00/56746, nº WO 00/56748, nº WO 01/25248, nº WO 02/28875, nº WO 03/006475 y nº WO 03/095467. El monómero de ANB también puede definirse con respecto a su fórmula química. De esta manera, una "unidad de ANB", tal como se utiliza en la presente memoria, presenta la estructura química mostrada en el Esquema 2, a continuación:

35

Esquema 2

en la que:

40 X se selecciona de entre el grupo que consiste de O, S y NR^{H} , en el que R^{H} es H o alquilo, tal como alquilo C_{1-4} , Y es $(-\text{CH}_2)_r$, en el que r es un número entero entre 1 y 4, con la condición de que, en el caso de que $\text{X}=\text{O}$, r no es 2.

45 Z y Z^* independientemente se encuentran ausentes o se seleccionan de entre el grupo que consiste de un grupo de enlace entre nucleósidos, un grupo terminal y un grupo de protección, y B es una nucleobase. Una exposición detallada de los monómeros de ANB preferentes se proporcionan posteriormente.

La expresión "grupo de enlace entre nucleósidos" pretende referirse a un grupo capaz de acoplar covalentemente entre sí dos nucleósidos, dos monómeros de ANB, un nucleósido y un monómero de ANB, etc. Entre los ejemplos específicos y preferentes se incluyen grupos fosfato y grupos fosfortioato.

La expresión "ácido nucleico" se define como una molécula formada mediante enlace covalente de dos o más nucleótidos. Las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido" se utilizan intercambiamente en la presente memoria. Las expresiones "ácido nucleico" o "polinucleótido" tal como se utilizan en la presente memoria típicamente contienen más de 35 nucleótidos.

5 El término "oligonucleótido" se refiere, en el contexto de la presente invención, a un oligómero (también denominado oligo) de monómeros de ARN, ADN y/o ANB, así como variantes y análogos de los mismos. El término "oligonucleótido" tal como se utiliza en la presente memoria típicamente contiene 2 a 35 nucleótidos, en particular 12 a 35 nucleótidos.

10 La expresión "propiedades mejoradas" se refiere a una o más propiedades por las que el compuesto de ANBip de la invención muestra un rendimiento global mejor que sus contrapartidas nativas. Son ejemplos de dichos parámetros, la facilidad de producción, el coste de producción, la vida de almacenamiento más larga, la afinidad de unión más elevada a la diana (complemento intermedio en la diana de ANBip o ARNm), la capacidad más elevada de penetrar en la membrana celular, la mayor resistencia a las nucleasas extracelulares e intracelulares, la mayor facilidad para formular farmacéuticamente, la potencia más elevada en modo de acción, la mejor distribución en los tejidos, la mejor respuesta fenotípica, los efectos de mayor duración, etc.

15 Los términos "unidad" y "residuo" se refieren a un monómero.

20 La expresión "por lo menos uno" comprende un número interior superior o igual a 1, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, etc.

25 Los términos "un" y "una", tal como se utilizan en referencia a un nucleótido, un nucleósido, un agente activo, un monómero de ANB, etc., pretenden referirse a uno o más. En particular, la expresión "un componente (tal como un nucleótido, un nucleósido, un agente activo, una unidad de ANB o similar) seleccionado de entre el grupo que consiste de..." pretende referirse a que puede seleccionarse uno o más de los componentes citados. De esta manera, expresiones como "un componente seleccionado de entre el grupo que consiste de A, B y C" pretende incluir todas las combinaciones de A, B y C, es decir, A, B, C, A+B, A+C, B+C y A+B+C.

30 La expresión "tio-ANB" se refiere a un nucleótido bloqueado en el que X en el Esquema 2 es S. Una unidad de tio-ANB puede encontrarse tanto en forma beta-D como en forma alfa-L. Generalmente, la forma beta-D de la unidad de tio-ANB resulta preferente. La forma beta-D de tio-ANB se muestra en el Esquema 3 como compuesto 3C.

35 La expresión "amino-ANB" se refiere a un nucleótido bloqueado en el que X en el Esquema 2 es NH o NR^H, en el que R^H es hidrógeno o alquilo C₁₋₄. El amino-ANB puede encontrarse tanto en forma beta-D como alfa-L. Generalmente, la forma beta-D del amino-ANB resulta preferente. La forma beta-D de amino-ANB se muestra en el Esquema 3 como compuesto 3D.

40 La expresión "oxi-ANB" se refiere a un nucleótido bloqueado en el que X en el Esquema 2 es O. Una unidad de oxi-ANB puede encontrarse tanto en forma beta-D como en forma alfa-L. La forma beta-D de oxi-ANB resulta preferente. La forma beta-D y la forma alfa-L se muestran en el Esquema 3 como compuestos 3A y 3B, respectivamente.

45 El término "ANBip" se utiliza ampliamente sobre los compuestos de doble cadena de la invención. De esta manera, un "ANBip", tal como se utiliza en la presente memoria, comprende en todos los casos por lo menos un monómero de ANB.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "ARNip" se refiere a un tramo de doble cadena de ARN o a monómeros de ARN modificados. En un compuesto de ARNip típico, las dos cadenas habitualmente presentan 19 nucleótidos complementarios entre sí, creando de esta manera una doble cadena que presenta 19 nucleótidos de longitud y presentando cada cadena un extremo 3' de dos nucleótidos protuberantes. Lo anterior no es una definición estricta de ARNip, que puede ser ligeramente más largo o más corto, y con o sin extremos protuberantes. En el ARNip, una cadena es de guía y complementaria al ARN diana (cadena antisentido) y la otra cadena (cadena sentido) presenta la misma secuencia que el ARN diana y por lo tanto es complementaria a la cadena guía/antisentido. En la presente memoria, se utilizan intercambiamente con el término "ARNip", ARN reguladores tales como "microARN" ("miARN") y "ARN corto" ("ARNc") y una diversidad de ARN estructurales tales como ARNt, ARNnp, ARNcp y ARNr.

60 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "ARNm" se refiere al transcrito o transcritos de ARNm actualmente conocidos de un gen diana y cualesquiera transcritos adicionales que puedan identificarse.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "ácido nucleico diana" comprende cualquier ARN que estaría sometido a modulación, corte dirigido, bloqueo estérico (reducción de la abundancia del ARN diana y/o inhibición de la traducción) guiada por la cadena antisentido. El ARN diana podría ser, por ejemplo, ADN genómico,

ARN vírico genómico, ARNm o un pre-ARNm.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "modificación de ácidos nucleicos específica de diana" se refiere a cualquier modificación de un ácido nucleico diana.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "gen" se refiere al gen que incluye exones, intrones, regiones 5' y 3' no codificantes y elementos reguladores y todas las variantes actualmente conocidas de las mismas y cualesquiera variantes adicionales, que puedan identificarse.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "modulación" se refiere a un incremento (estimulación) o una reducción (inhibición) en la expresión de un gen. En la presente invención, la inhibición es la forma preferente de modulación de la expresión génica y el ARNm es una diana preferente.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "administración dirigida" de un compuesto ANBip o ARNip a un ácido nucleico diana particular se refiere a proporcionar el oligonucleótido ARNip o ANBip a la célula, animal o ser humano de manera que los compuestos de ANBip o ARNip sean capaz de unirse y modular el funcionamiento de la diana.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, "hibridación" se refiere a enlaces de hidrógeno, que pueden ser de Watson-Crick, Hoogsteen, enlaces de hidrógeno de Hoogsteen invertidos, etc. entre nucleósidos o bases nucleótidas complementarias. Las cuatro nucleobases que se encuentran comúnmente en el ADN son G, A, T y C, de las que G se empareja con C, y A se empareja con T. En el ARN, la T ha sido sustituida por uracilo (U), que se empareja con A. Los grupos químicos en las nucleobases que participan en la formación de dúplex estándar constituyen la cara de Watson-Crick. Hoogsteen demostró un par de años después que las nucleobases purina (G y A) además de su cara de Watson-Crick presentan una cara de Hoogsteen que puede ser reconocida desde el exterior de un dúplex y utilizarse para unir oligonucleótidos pirimidina mediante enlace de hidrógeno, formando de esta manera una estructura de triple hélice.

30 En el contexto de la presente invención, el término "complementario" se refiere a la capacidad de apareamiento preciso mutuo entre dos secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, en el caso de que un nucleótido en una posición determinada de un oligonucleótido sea capaz de enlace de hidrógeno con un nucleótido en la posición correspondiente de una molécula de ADN o ARN, el oligonucleótido y el ADN o ARN se considera que son complementarios entre sí en esa posición. Las cadenas de ADN o ARN se consideran complementarios entre sí en el caso de que un número suficiente de nucleótidos en el oligonucleótido pueda formar enlaces de hidrógeno con nucleótidos correspondientes en el ADN o ARN diana para permitir la formación de un complejo estable. Para ser estable in vitro o in vivo, la secuencia de un compuesto ANBip o ARNip no necesita ser complementaria al 100% respecto a su ácido nucleico diana. Los términos "complementario" y "específicamente hibridable" implican, de esta manera, que el compuesto de ANBip o ARNip se une de manera suficientemente fuerte y específica a la molécula diana, proporcionando la interferencia deseada con la función normal de la diana, sin afectar simultáneamente a la función de los ARNm no diana no afectados.

45 En el presente contexto, el término "conjugado" pretende indicar una molécula heterogénea formada mediante unión covalente de un compuesto tal como se indica en la presente memoria a una o más fracciones no nucleótidas o no polinucleótidas. Entre los ejemplos de fracciones no nucleótidas o no polinucleótidas se incluyen agentes macromoleculares tales como proteínas, cadenas de ácido graso, residuos sacáridos, glucoproteínas, polímeros o combinaciones de los mismos. Típicamente las proteínas pueden ser anticuerpos para una proteína diana. Los polímeros típicos pueden ser polietilenglicol.

50 En el presente contexto, el término "alquilo C₁₋₆" pretende referirse a una cadena de hidrocarburo saturado lineal o ramificado en el que las cadenas más largas presentan entre uno y seis átomos de carbono, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, neopentilo y hexilo. Una cadena de hidrocarburo ramificado pretende referirse a un alquilo C₁₋₆ sustituido en cualquier carbono con una cadena hidrocarburo.

55 En el presente contexto, el término "alquilo C₁₋₄" pretende referirse a una cadena de hidrocarburo saturado lineal o ramificado en el que las cadenas más largas presentan entre uno y cuatro átomos de carbono, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo y terc-butilo. Una cadena de hidrocarburo ramificado pretende referirse a un alquilo C₁₋₄ sustituido en cualquier carbono con una cadena hidrocarburo.

60 Al utilizarse en la presente memoria el término "alcoxi C₁₋₆" pretende referirse a alquilo C₁₋₆, tal como metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, isobutoxi, sec-butoxi, terc-butoxi, pentoxi, isopentoxi, neopentoxi y hexoxi.

En el presente contexto, el término "alqueno C₂₋₆" pretende referirse a un grupo de hidrocarburo lineal o ramificado

que presenta entre dos y seis átomos de carbono y que contiene uno o más dobles enlaces. Entre los ejemplos ilustrativos de grupos de alqueno C_{2-6} se incluyen alilo, homoalilo, vinilo, crotilo, butenilo, butadienilo, pentenilo, pentadienilo, hexenilo y hexadienilo. La posición de la insaturación (el doble enlace) puede encontrarse en cualquier posición a lo largo de la cadena de carbonos.

5 En el presente contexto, el término "alqueno C_{2-6} " pretende referirse a grupos de hidrocarburo lineales o ramificados que contienen entre dos y seis átomos de carbono y que contienen uno o más triples enlaces. Entre los ejemplos de alqueno C_{2-6} se incluyen acetileno, propinilo, butinilo, pentinilo y hexinilo. La posición de la insaturación (el triple enlace) puede encontrarse en cualquier posición a lo largo de la cadena de carbonos. Más de un enlace puede ser insaturado, de manera que el "alqueno C_{2-6} " es un dieno o enedieno, tal como es conocido por el experto en la materia.

15 El término "carcinoma" pretende indicar un tumor maligno de origen epitelial. El tejido epitelial cubre o reviste las superficies corporales en el interior y el exterior del cuerpo. Son ejemplos de tejido epitelial la piel y las mucosas y serosas que revisten las cavidades corporales y órganos internos, tales como los intestinos, la vejiga urinaria, el útero, etc. El tejido epitelial también puede extenderse a capas de tejido más internas hasta glándulas, tales como glándulas secretoras de moco.

20 El término "sarcoma" pretende indicar un tumor maligno que crece a partir de tejido conectivo, tal como cartílago, grasa, músculos, tendones y huesos.

El término "glioma", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende cubrir un tumor maligno originado a partir de células gliales.

25 Compuestos de la invención

La presente invención se basa en parte en el inesperado resultado de que pueden utilizarse ANB para mejorar la interferencia de ARN mediante la incorporación de monómeros de ANB en la cadena sentido y/o antisentido de los polinucleótidos de doble cadena, tal como ARNip. Lo anterior resulta particularmente inesperado ya que los monómeros ENA estructuralmente muy relacionados deterioran fuertemente la interferencia de ARN, incluso para ARNip modificados mínimamente (Hamada et al., *Antisense and Nucl. Acid Drug Dev.* 12:301-309, 2002).

35 Los ANB muestran propiedades de unión sin precedentes con las secuencias diana de ADN y ARN. Además de dichas notables propiedades de hibridación, los monómeros de ANB pueden mezclarse y actuar cooperativamente con los monómeros de ADN y ARN, así como con análogos de nucleótido, tales como monómeros de ARN modificados con 2'-O-alquilo. La afinidad de unión sin precedentes de los ANB con las secuencias diana de ADN o ARN y la capacidad de mezclar los monómeros de ANB libremente con monómeros de ADN y ARN y un abanico de análogos de nucleótido presenta algunas consecuencias importantes para el desarrollo de compuestos de tipo ARNip eficaces y seguros.

40 Los ADNdc naturales existen a pH fisiológico en forma de hélice de forma B, mientras que el ARNdc existe en forma de hélice de forma A. Dicha diferencia morfológica se debe a la diferencia en las conformaciones preferentes del azúcar desoxirribosa y ribosa. A temperatura ambiente el anillo furanosa de la desoxirribosa existe en un equilibrio entre las conformaciones C2'-endo (tipo S) y C3'-endo (tipo N) con una barrera energética de ~2 kcal/mol (fig. 1). La conformación C2'-endo (tipo S) da lugar a la hélice de forma B, mientras que la conformación C3'-endo (tipo N) da lugar a la hélice de forma A. Para la desoxirribosa la conformación de tipo S presenta una energía ligeramente disminuida en comparación con el tipo N, lo que explica por qué el ADN se encuentra en la conformación de tipo S. Para la ribosa, resulta preferente la conformación de tipo N y, por lo tanto, el ARN adopta la hélice de forma A. Es conocido que la hélice de forma A se asocia a una estabilidad de hibridación más elevada.

50 Los monómeros de ANB bloquean la conformación del anillo furanosa en una conformación que corresponde a una conformación de C3'-endo extrema. Por lo tanto, dichos monómeros imitan la conformación del ARN y se ha demostrado que la estructura del oligonucleótido y los dúplex de los monómeros son de tipo ARN (Petersen et al., *J. Am. Chem. Soc.* 124:5974-82, 2002). Lo anterior implica que la estructura de los oligonucleótidos de ARN y de los dúplex ARN/ARN en los que se incorporan monómeros de ANB no resultan modificados significativamente en comparación con los oligonucleótidos de ARN y dúplex ARN/ARN nativos. Además, se ha demostrado que los monómeros de ANB inducen una conformación de tipo ARN al introducirlos en ADN. De esta manera, los monómeros de ANB imponen, en particular en el extremo 3', un grado fuerte de conformación C3'-endo (tipo ARN). En el caso de que, por ejemplo, cada segundo o tercer residuo en un oligómero de ADN se sustituya por monómeros de ANB, la estructura global del oligonucleótido se volverá mucho más similar al ARN. De esta manera, el dúplex formado por dichos oligonucleótidos formará una estructura similar a los dúplex (ARN/ARN) de forma A nativos. Es parte de la presente invención la utilización de dicha propiedad de los monómeros de ANB para dirigir la conformación del ADN hacia la estructura del ARN.

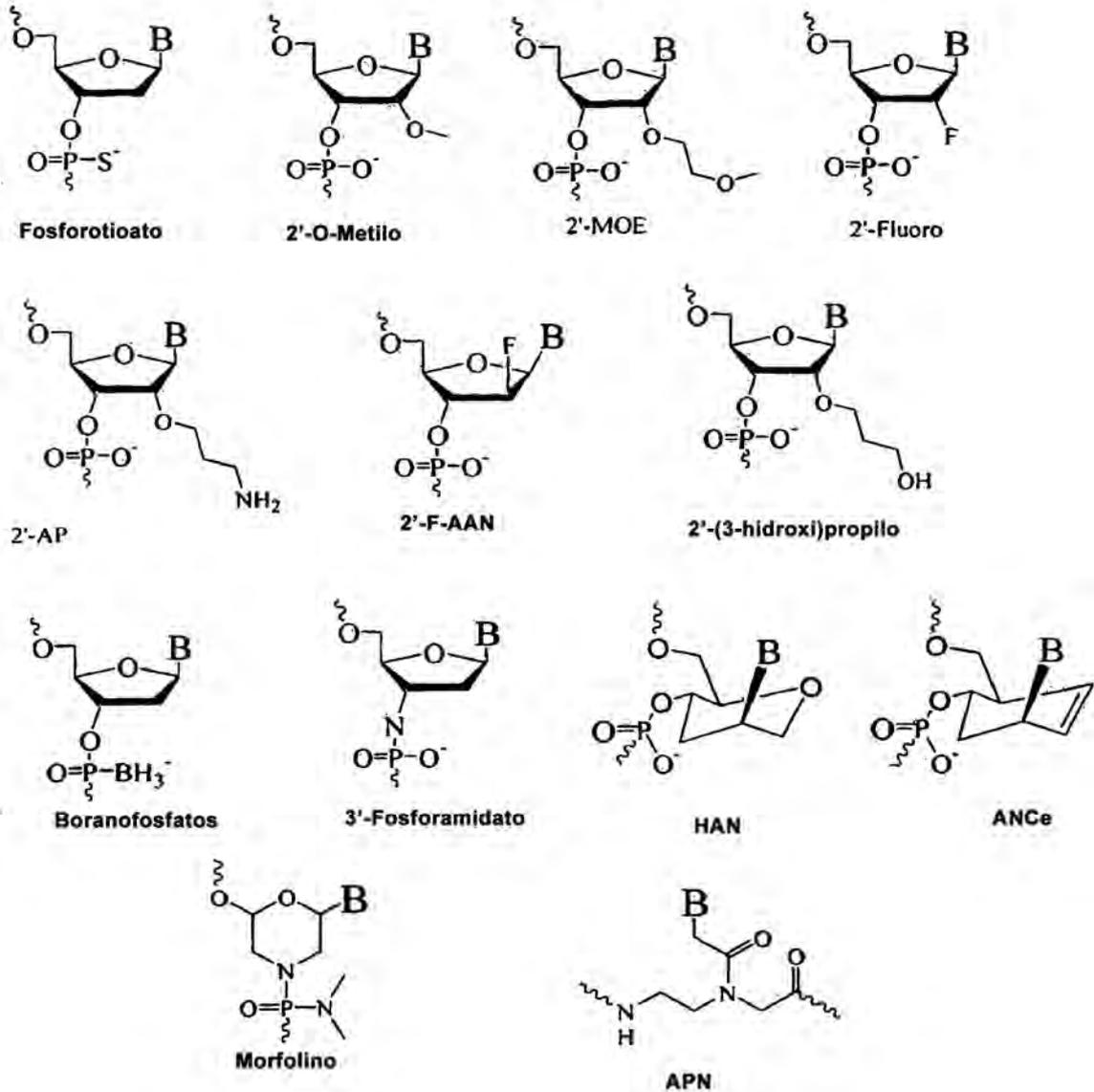
Se apreciará que la afinidad sin precedentes del ANB puede utilizarse para acortar la longitud habitual de un oligonucleótido de ARNip (entre 21-35meros y, por ejemplo, 12-20meros) sin comprometer la afinidad necesaria para la actividad farmacológica. Debido a que la especificidad intrínseca de un oligonucleótido se correlaciona inversamente con su longitud, dicho acortamiento incrementaría significativamente la especificidad del compuesto de ANBip para su ARN diana. Por lo tanto, un objetivo de la invención es, debido a que la secuencia del genoma humano se encuentra disponible y la plasmación de su génesis está avanzando rápidamente, identificar las secuencias únicas más cortas posibles en el ARNm diana. Además, reduciendo el tamaño de los oligonucleótidos y facilitando de esta manera el procedimiento de fabricación y la reducción de los costes de fabricación, se cree que los compuestos de ANBip, tales como los dados a conocer en la presente memoria, presentan el potencial de convertirse en la base para la terapia de ARNi y de convertirse en un tratamiento comercialmente competitivo que podría ofrecerse para una diversidad de enfermedades.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en su aspecto más amplio la presente invención se refiere a un compuesto de doble cadena que comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, en el que cada cadena comprende 12 a 35 nucleótidos y en el que dicho compuesto comprende por lo menos un monómero de ácido nucleico bloqueado (ANB). Los compuestos de doble cadena de la invención pueden estar compuestos enteramente de monómeros de ANB o pueden estar compuestos de monómeros de ANB en cualquier combinación con monómeros de ADN, monómeros de ARN o análogos de nucleótido.

Tal como se ha indicado anteriormente, el término "nucleótido" se refiere a una unidad 2-desoxirribosa (ADN) o una unidad de ribosa (ARN) que se une mediante su carbono número uno a una base nitrogenada, tal como adenina (A), citosina (C), timina (T), guanina (G) o uracilo (U), y que se une mediante su átomo de carbono número cinco a un grupo de enlace entre nucleósidos (tal como se define posteriormente) o a un grupo terminal (tal como se define posteriormente). De esta manera, el término "nucleótido" comprende unidades (o monómeros) de ARN que comprenden una unidad de ribosa que se une mediante su carbono número uno a una base nitrogenada, tal como A, C, T, G o U, y que se une mediante su átomo de carbono número cinco a un grupo fosfato o a un grupo terminal. Tal como se ha explicado anteriormente, el término "nucleótido" comprende además unidades (o monómeros) de ADN que comprenden una unidad 2-desoxirribosa que se une mediante su carbono número uno a una base nitrogenada, tal como A, C, T, G o U, y que se une mediante su átomo de carbono número cinco a un grupo fosfato o a un grupo terminal. El término "nucleótido" cubre además variantes o análogos de dichos monómeros de ARN y ADN. Por ejemplo, el grupo 2'-OH (ARN) o 2'-H (ADN) puede sustituirse por -O-CH₃, -O-CH₂-CH₂-OCH₃, -O-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂, -O-CH₂-CH₂-CH₂-OH o F. Otros ejemplos de análogos de nucleótido son los monómeros de ANB. Además, el grupo de enlace entre nucleósidos no se encuentra limitado a fosfato (-O-P(O)₂-O-), sino que puede incluir -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -S-P(O)₂-O-, -S-P(O,S)-O-, -S-P(S)₂-O-, -O-P(O)₂-S-, -O-P(O,S)-S-, -S-P(O)₂-S-, -O-PO(R^H)-O-, O-PO(OCH₃)-O-, -O-PO(NR^H)-O-, -O-PO(OCH₂CH₂S-R)-O-, -O-PO(BH₃)-O-, -O-PO(NHR^H)-O-, -O-P(O)₂-NR^H-, -NR^H-P(O)₂-O-, -NR^H-CO-O-, -NR^H-CO-NR^H-, -O-CO-O-, -O-CO-NR^H-, -NR^H-CO-CH₂-, -O-CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-, -CO-NR^H-CH₂-, -CH₂-NR^H-CO-, -O-CH₂-CH₂-S-, -S-CH₂-CH₂-O-, -S-CH₂-CH₂-S-, -CH₂-SO₂-CH₂-, -CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-CO-, -CH₂-NCH₃-O-CH₂-, en los que R^H es hidrógeno o alquilo.

Además, la base nitrogenada se encuentra limitada a A, C, T, G o U, sino que puede incluir otras purinas y pirimidinas, tales como 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 5-propinil-6-fluorouracilo, 5-metiliazol-uracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, 2,6-diaminopurina, 7-propín-7-deaza-adenina, 7-propín-7-deaza-guanina y 2-cloro-6-aminopurina. Otros ejemplos de variantes y análogos de nucleótidos que se encuentran comprendidos dentro de la presente definición de "nucleótido" se describen en Freier y Altmann (Nucl. Acid Res. 25:4429-4443, 1997), y en Uhlmann (Curr. Opinion in Drug & Development 3(2): 293-213, 2000). El Esquema 1, posteriormente, ilustra ejemplos seleccionados de dichas variantes y análogos de nucleótidos. En conclusión, los compuestos de la invención pueden contener cualquiera de los nucleótidos anteriormente indicados con la condición de que el compuesto contenga por lo menos un monómero de ANB en por lo menos una de las cadenas.

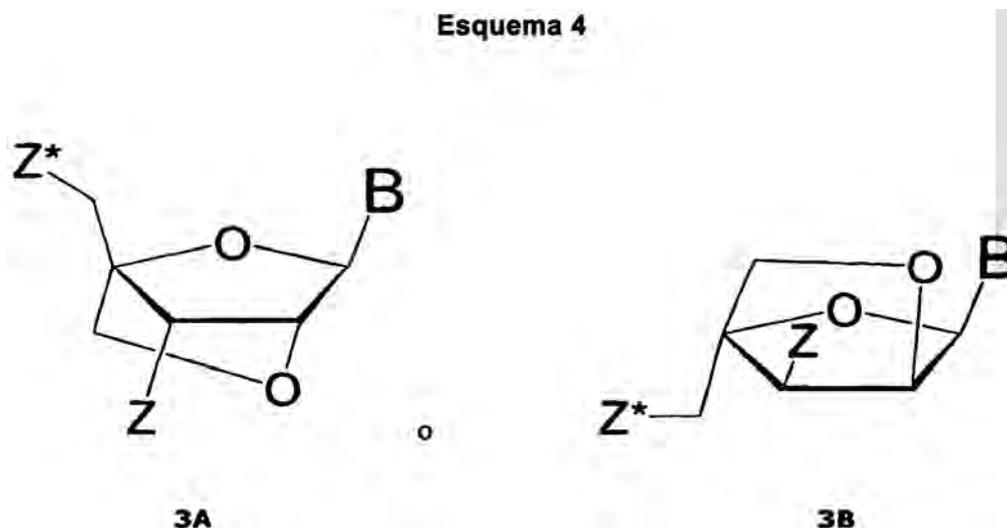
Esquema 1



Tal como se ha indicado anteriormente, la expresión "monómero de ácido nucleico bloqueado" o "monómero de ANB" se refiere a un análogo de nucleótido bicíclico y presenta la estructura química mostrada en el Esquema 2, a continuación:

5

más preferente presenta la estructura química mostrada en el Esquema 4, a continuación:



5 en la que Z, Z* y B han sido definidos anteriormente.

10 Las estructuras mostradas en 3A y 3B, anteriormente, también pueden denominarse "forma beta-D" y "forma alfa-L", respectivamente. En una realización altamente preferente de la invención, el monómero de ANB es la forma beta-D, es decir, el monómero de ANB presenta la estructura química indicada en 3A, anteriormente.

15 Tal como se ha indicado anteriormente, Z y Z*, que sirven para un enlace entre nucleósidos, independientemente se encuentran ausentes o se seleccionan de entre el grupo que consiste de un grupo de enlace entre nucleósidos, un grupo terminal y un grupo de protección dependiendo de la posición real del monómero de ANB dentro del compuesto. Se entiende que en realizaciones en las que el monómero de ANB se encuentra situado en el extremo 3', Z es un grupo terminal y Z* es un enlace entre nucleósidos. En realizaciones en las que el monómero de ANB se encuentra situado en el extremo 5', Z se encuentra ausente y Z* es un grupo terminal. En realizaciones en las que el monómero de ANB se encuentra situado dentro de la secuencia de nucleótidos, Z se encuentra ausente y Z* es un grupo de enlace entre nucleósidos.

20 Entre los ejemplos específicos de grupos de enlace entre nucleósidos se incluyen -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -S-P(O)₂-O-, -S-P(O,S)-O-, -S-P(S)₂-O-, -O-P(O)₂-S-, -O-P(O,S)-S-, -S-P(O)₂-S-, -O-PO(R^H)-O-, O-PO(OCH₃)-O-, -O-PO(NR^H)-O-, -O-PO(OCH₂CH₂S-R)-O-, -O-PO(BH₃)-O-, -O-PO(NHR^H)-O-, -O-P(O)₂-NR^H-, -NR^H-P(O)₂-O-, -NR^H-CO-O-, -NR^H-CO-NR^H-, -O-CO-O-, -O-CO-NR^H-, -NRH-CO-CH₂-, -O-CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-, -CO-NR^H-CH₂-, -CH₂-NR^H-CO-, -O-CH₂-CH₂-S-, -S-CH₂-CH₂-O-, -S-CH₂-CH₂-S-, -CH₂-SO₂-CH₂-, -CH₂-CO-NR^H-, -O-CH₂-CH₂-NR^H-CO-, -CH₂-NCH₃-O-CH₂-, en los que R^H es hidrógeno o alquilo C₁₋₄.

30 En una realización preferente de la invención, el grupo de enlace entre nucleósidos es un grupo fosfato (-O-P(O)₂-O-), un grupo fosforotioato (-O-P(O,S)-O-) o el compuesto puede contener tanto grupos fosfato como grupos fosforotioato.

35 Entre los ejemplos específicos de grupos terminales se incluyen grupos terminales seleccionados de entre el grupo que consiste de hidrógeno, azido, halógeno, ciano, nitro, hidroxilo, prot-O-, act-O-, mercapto, prot-S-, act-S-, alquilio C₁₋₆, amino, prot-N(R^H)-, act-N(R^H)-, mono- o di-(alquil C₁₋₆)amino, alqueno C₂₋₆ sustituido opcionalmente, alquenoilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, alquilo C₂₋₆ opcionalmente sustituido, difosfato, incluyendo difosfato protegido, ditiofosfato, incluyendo ditiofosfato protegido, trifosfato, incluyendo trifosfato protegido, tritiofosfato, incluyendo tritiofosfato protegido, en el que Prot es un grupo de protección para -OH, -SH y -NH(R^H) y Act es un grupo de activación para -OH, -SH y -NH(R^H), y R^H es hidrógeno o alquilo C₁₋₆.

40 Entre los ejemplos de grupos de protección fosfato se incluyen S-acetiltioetilo (SATE) o S-pivaloitioetilo (t-butil-SATE).

45 Entre los ejemplos todavía adicionales de grupos terminales se incluyen intercalantes de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos informadores, ligandos,

carboxi, sulfono, hidroximetilo, Prot-O-CH₂-, Act-O-CH₂-, aminometilo, Prot-N(R^H)-CH₂-, Act-N(R^H)-CH₂-, carboximetilo, sulfonometilo, en donde Prot es un grupo de protección para -OH, -SH y -NH(R^H), y Act es un grupo de activación para -OH, -SH y -NH(R^H), y R^H es hidrógeno o alquilo C₁₋₆.

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

15 Entre los ejemplos de grupos de protección de amina se incluyen fluorenilmetoxicarbonilamino (Fmoc), terc-
butiloxicarbonilamino (BOC), trifluoroacetilamino, aliloxicarbonilamino (alloc, AOC), Z-benciloxicarbonilamino (Cbz),
benciloxicarbonilamino sustituido, tal como 2-cloro-benciloxicarbonilamino (2-ClZ), monometoxitritilamino (MMT),
dimetoxitritilamino (DMT), ftaloilamino y 9-(9-fenil)xantenilamino (pixilo).

20 El grupo de activación preferentemente media en los acoplamientos con otros residuos y/o monómeros nucleótido y
tras completarse el acoplamiento, el grupo de activación típicamente se convierte en un enlace entre nucleósidos.
Entre los ejemplos de dichos grupos de activación se incluyen O-fosforamidita opcionalmente sustituida, O-
fosforotriéster opcionalmente sustituido, O-fosforodiéster opcionalmente sustituido, H-fosfonato opcionalmente
25 sustituido y O-fosfonato opcionalmente sustituido. En el presente contexto, el término "fosforamidita" se refiere a un
grupo de fórmula -P(OR^x)-N(R^y)₂, en la que R^x se refiere a un grupo alquilo opcionalmente sustituido, por ejemplo
metilo, 2-cianoetilo o bencilo, y cada R^y se refiere a grupos alquilo opcionalmente sustituidos, por ejemplo etilo o
isopropilo, o el grupo -N(R^y)₂ forma un grupo morfolino (-N(CH₂CH₂)₂O). R^x preferentemente se refiere a 2-cianoetilo
y los dos R^y preferentemente son idénticos y se refieren a isopropilo. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, una
fosforamidita particularmente preferente es N,N-diisopropil-O-(2-cianoetil)-fosforamidita.

30 Tal como se ha indicado anteriormente, B es una nucleobase que puede ser de origen natural o no natural. Entre los
ejemplos específicos de nucleobases se incluyen adenina (A), citosina (C), 5-metilcitosina (^{Me}C), isocitosina,
pseudoisocitosina, guanina (G), timina (T), uracilo (U), 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 5-propinil-6-fluorouracilo, 5-
metiltiazoluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, 2,6-diaminopurina, 7-propin-7-deaza-adenina, 7-propin-7-
35 deaza-guanina y 2-cloro-6-aminopurina. Entre las nucleobases preferentes se incluyen A, C, ^{Me}C, G, T y U, en
particular A, C, ^{Me}C, G y U.

40 En una realización de la invención, la cadena sentido comprende por lo menos un monómero de ANB, tal como 1 a
10 monómeros de ANB, por ejemplo 1 a 5 monómeros de ANB. En otra realización de la invención, la cadena
antisentido comprende por lo menos un monómero de ANB, tal como 1 a 10 monómeros de ANB, por ejemplo 1 a 5
monómeros de ANB. En una realización adicional de la invención, la cadena sentido comprende por lo menos un
monómero de ANB y la cadena antisentido comprende por lo menos un monómero de ANB. Por ejemplo, la cadena
sentido típicamente comprende 1 a 10 monómeros de ANB, tal como 1 a 5 monómeros de ANB, y la cadena
antisentido típicamente comprende 1 a 10 monómeros de ANB, tal como 1 a 5 monómeros de ANB.

45 Una ventaja particular de los compuestos de la invención es su estabilidad mejorada en líquidos biológicos, tal como
el suero. De esta manera, una realización de la invención incluye la incorporación de monómeros de ANB en un
oligonucleótido de ADN o ARN estándar con el fin de incrementar la estabilidad del compuesto de ANBip resultante
en líquidos biológicos, por ejemplo, mediante el incremento de la resistencia frente a nucleasas (endonucleasas y
exonucleasas). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, los compuestos de la invención mostrarán, debido a la
50 incorporación de monómeros de ANB, una semivida en circulación incrementada como resultado de su temperatura
de fusión incrementada y/o resistencia a nucleasas incrementada. El grado de estabilidad dependerá del número de
monómeros de ANB utilizado, su posición en los oligonucleótidos y el tipo de monómero de ANB utilizado. En
comparación con el ADN y los fosforotioatos, puede establecerse el orden siguiente de capacidad de estabilizar un
oligonucleótido frente a la degradación nucleolítica. ADN << fosforotioatos, AND-fosfodiéster < ANB-fosforotioatos.

55 Por lo tanto, los compuestos según la invención que son particularmente preferentes son los compuestos que, al
incubarlos en el suero (por ejemplo suero humano, bovino o de ratón), tal como en suero de feto bovino al 10% en
una solución salina fisiológica a 37°C durante 5 horas, se degradan en menor grado que el compuesto de ARNdc
correspondiente. Preferentemente, menos de 25% de la cantidad inicial del compuesto de la invención se degrada
60 tras 5 horas, más preferentemente menos de 50% de la cantidad inicial del compuesto de la invención se degrada
tras 5 horas, todavía más preferentemente, menos de 75% de la cantidad inicial del compuesto de la invención se
degrada tras 5 horas. En otra realización, resulta preferente que menos de 25% de la cantidad inicial del compuesto
de la invención se degrade tras 10 horas, y todavía más preferentemente que menos de 50% de la cantidad inicial

del compuesto de la invención se degrade tras 10 horas.

Dado el hecho de que la síntesis de ANB es compatible con la síntesis de ARN/ADN estándar y que los monómeros de ANB se mezclan libremente con muchos análogos de ácido nucleico contemporáneos, la resistencia a nucleasas de los compuestos de ANBip puede incrementarse adicionalmente según la invención mediante la incorporación de otros análogos que muestran una estabilidad frente a nucleasas incrementada o mediante el aprovechamiento de los enlaces internucleósido resistentes a nucleasas, por ejemplo los enlaces fosforomonotioato, fosforoditioato y metilfosfonato, etc.

Los monómeros de ANB pueden utilizarse libremente en el diseño de ARNip tanto en los extremos 3' protuberantes como en el extremo 5' de la cadena sentido con activación completa del efecto del ANBip y la regulación negativa de la producción de proteína (reducción >90%). Los monómeros de ANB pueden distribuirse bastante libremente en la cadena sentido en el ANBip manteniendo la capacidad de regulación negativa (reducción de 80%). El extremo 5' de la cadena antisentido en el ANBip también puede ser modificada con monómeros de ANB, dando lugar de esta manera a capacidades de regulación negativa de hasta 50-70%. La utilización de una cadena antisentido con alta sustitución de monómeros de ANB aparentemente no proporciona un efecto de regulación negativa, aunque no puede descartarse que el diseño especial de dicha combinación pueda inducir un efecto de ARNi. Las sustituciones de monómeros de ANB de los extremos 3' protuberantes conjuntamente con el extremo 5' de la cadena sentido del ANBip proporcionan la reducción más elevada de los niveles de proteína. El extremo 5' de la cadena antisentido es el más sensible a la modificación de monómero de ANB, mientras que otros muchos sitios de modificación resultan mejor tolerados.

En una realización, el compuesto de ANBip se diseña de manera que los monómeros de ANB se incorporan en el compuesto de manera que fortalecen los pares de bases en el dúplex en el extremo 5' de la cadena sentido. De esta manera la helicasa puede dirigirse al desenrollado desde el otro extremo 5' (extremo 5' de la cadena antisentido). De esta manera puede controlarse la incorporación de la cadena antisentido/guía en RISC. La helicasa inicia el desenrollado del dúplex de ARNip en el extremo de unión más débil. El extremo 3' liberado probablemente es la diana para la degradación, mientras que la cadena restante se incorpora en RISC. Los ARNip eficientes muestran acumulación de la cadena antisentido/guía y un apareamiento de bases más débil en el extremo 5' de la cadena antisentido/guía. Los efectos secundarios no deseados posiblemente puedan evitarse introduciendo únicamente la cadena correcta (la cadena antisentido/guía) en RISC y no la cadena sentido no deseado (no complementaria al ARN diana deseado).

El efecto de incorporar monómeros de ANB en el extremo 5' de la cadena antisentido puede observarse en la fig. 11. El efecto de bloqueo de la ARNi de un residuo de ANB en el extremo 5' puede eliminarse parcialmente mediante la incorporación de un despareamiento en la cadena contraria. En la fig. 11 se ha demostrado lo anterior para dianas tanto de *Renilla* como de luciérnaga.

El efecto de bloqueo de la ARNi de un monómero de ANB incorporado en el extremo 5' de la cadena antisentido puede eliminarse prácticamente por completo desplazando el monómero de ANB una posición de base hacia el extremo 3' (fig. 12). El desplazamiento del monómero de ANB hacia el extremo 3' de la cadena antisentido no afecta a la expresión génica, pero cuando el monómero de ANB se incorpora en la posición 10 o 12, se observa una reducción significativa del efecto de ARNi. El complejo RISC cortará el ARNm en una posición contraria a la posición entre 10 y 11 de la cadena antisentido del ARNip y, aparentemente, la incorporación del monómero sintético de ANB en ese sitio bloquea el corte por el complejo RISC. Al desplazar el monómero de ANB adicionalmente a lo largo de la cadena antisentido, se reduce dicho efecto de bloqueo.

Tal como se ha indicado anteriormente, la helicasa muestra un sesgo de cadena y preferentemente incorporará ARNip del extremo de unión más débil del ARNip. Por lo tanto, en principio, pueden incorporarse ambas cadenas en el dúplex de ARNip. Lo anterior, más otras propiedades del sistema de RISC+ARNip, dará lugar a efectos fuera de diana. Una manera de reducir lo anterior es incorporar los monómeros ds ANB de alta afinidad. Para el sitio Ren1, la nucleobase 5' en la cadena antisentido es U, que constituye un residuo de unión "baja". Por lo tanto, el complejo RISC leerá desde dicho lado e incorporará la cadena antisentido (la cadena correcta). Para los sitios Ren2 y Ren2, la nucleobase 5' es C, que constituye un sitio de unión "elevada". Para dichos sitios, el extremo 5' de la cadena sentido se sitúa contiguamente a una nucleobase A y una U, constituyendo ambos sitios de unión "baja". Por lo tanto, RISC puede mostrar sesgo de cadena en este caso y leer parcialmente desde la cadena sentido (la cadena incorrecta). Mediante la sustitución de los residuos de 5'-adenosina y uridina por los residuos A y U-ANB correspondientes, se elimina el sesgo de cadena y se incorpora la cadena antisentido en el complejo RISC (fig. 13). De acuerdo con lo anterior, los residuos de ANB pueden reducir el sesgo de cadena e incrementar la potencia del dúplex. El ANBip según la presente invención preferentemente presenta una secuencia antisentido que presenta por lo menos 70%, más preferentemente 90% a 100%, de identidad de secuencia con la molécula diana.

Tal como se ha indicado anteriormente, varios diseños particulares incrementan la aplicabilidad de potencia global

del ARNip nativo:

(a) la "adición de caperuza terminal" del ARNip con ANB mejora la estabilidad frente a nucleasas (figs. 2 y 15).

(b) La introducción de un monómero de ANB hacia el extremo 5' de la cadena sentido mejora la potencia del ANBip en comparación con el ARNip nativo ("bloqueo"). Lo anterior se ilustra mediante el incremento de potencia para dianas de eficiencia intermedia (figs. 13 y 15).

(c) En el "paseo de ANB" (fig. 12) se muestra que la introducción de un monómero de ANB en el sitio de corte del complejo RISC, por ejemplo en la posición 10, calculada desde el extremo 5' en la cadena antisentido, reduce la actividad del ARNip ("bloqueo").

Estas observaciones básicas son importantes para mejorar la potencia global del ARNip. En los diseños optimizados, los extremos 3' deberían recibir una "caperuza" de monómeros de ANB, garantizando de esta manera la resistencia frente a nucleasas (figs. 12 y 15). El extremo 5' de la cadena sentido también debería modificarse con ANB para incrementar la unión a la cadena antisentido y dirigir de esta manera a que la helicasa incorpore desde el "lado correcto" del dúplex. Dicho "bloqueo" del lado del extremo 5' de sentido/3' de antisentido del dúplex puede llevarse a cabo mediante la incorporación de por lo menos un monómero de ANB en cualquiera de los lados del dúplex. Dichos dúplex modificados puede contener además bases de enlace de hidrógeno ANB-ANB. La observación de que el silenciamiento génico está reducida al incorporar ANB en la posición 10 o 12 en la cadena antisentido puede utilizarse en el escenario inverso. En el caso de que el complejo RISC incorpore parte de la cadena sentido y, de esta manera, conduzca a efectos fuera de diana no deseados, podría reducirse la potencia de la incorporación no deseada mediante la incorporación de ANB en las posiciones 10 y 12 en la cadena sentido ("bloqueo"), tal como se muestra en la fig. 12.

De acuerdo con lo anterior, en una realización interesante de la invención, la cadena sentido comprende por lo menos un monómero de ANB situado en por lo menos una (tal como una) de las posiciones 9 a 13, contada desde el extremo 5'. Preferentemente, la cadena sentido comprende por lo menos un monómero de ANB situado en por lo menos una (tal como una) de las posiciones 10 a 12, contada desde el extremo 5'. En una realización interesante particular de la invención, la cadena sentido comprende un monómero de ANB en la posición 10, la posición 12 o en tanto la posición 10 como la 12, contadas desde el extremo 5'. Además, resulta particularmente preferente que el monómero de ANB, en el caso de que se incorpore en la posición 10, contenga una base nitrogenada que sea diferente de las bases de ARN naturales, es decir, diferente de A, C, G y U. En una realización preferente particular, el monómero de ANB situado en la posición 10 (contada desde el extremo 5') contiene la base nitrogenada T.

Es conocido que los monómeros de ANB incorporados en oligos inducen una estructura de tipo ARN del oligo y el híbrido que puede formar. También se ha demostrado que los residuos de ANB modifican la estructura de los residuos de ADN, en particular en el caso de que los residuos de ANB se incorporen en la proximidad del extremo 3'. La incorporación de monómeros de ANB hacia el extremo 5' aparentemente presenta un efecto más pequeño. Lo anterior implica que resulta posible modificar las cadenas de ARN que contienen monómeros de ADN y, en el caso de que uno o más residuos de ANB flanqueen los monómeros de ADN, ellos también adoptarán una estructura de tipo ARN. Por lo tanto, los monómeros de ADN y de ANB pueden sustituir los monómeros de ARN y todavía adoptar el oligo una estructura global de tipo ARN. Debido a que los monómeros de ADN son considerablemente más económicos que los monómeros de ARN, más fáciles de sintetizar y más estables frente a la degradación nucleolítica, dichas modificaciones mejorarán, por lo tanto, la utilización y aplicabilidad globales de los ARNip (ver, por ejemplo, la fig. 15).

De acuerdo con lo anterior, resulta preferente que por lo menos un (tal como un) monómero de ANB se encuentre situado en el extremo 5' de la cadena sentido. Más preferentemente, por lo menos dos (tal como dos) monómeros de ANB se encuentran situados en el extremo 5' de la cadena sentido.

En otra realización preferente de la invención, la cadena sentido comprende por lo menos un (tal como un) monómero de ANB situado en el extremo 3' de la cadena sentido. Más preferentemente, por lo menos dos (tal como dos) monómeros de ANB se encuentran situados en el extremo 3' de la cadena sentido.

En una realización preferente particular de la invención, la cadena sentido comprende por lo menos un (tal como un) monómero de ANB situado en el extremo 5' de la cadena sentido y por lo menos un (tal como un) monómero de ANB situado en el extremo 3' de la cadena sentido. Todavía más preferentemente, la cadena sentido comprende por lo menos dos (tal como dos) monómeros de ANB situados en el extremo 5' de la cadena sentido y por lo menos dos (tal como dos) monómeros de ANB situados en el extremo 3' de la cadena sentido.

Resulta preferente que por lo menos un (tal como un) monómero de ANB se encuentre situado en el extremo 3' de la cadena antisentido. Más preferentemente, por lo menos dos (tal como dos) monómeros de ANB se encuentran situados en el extremo 3' de la cadena antisentido. Todavía más preferentemente, por lo menos tres (tal como tres) monómeros de ANB se encuentran situados en el extremo 3' de la cadena antisentido. En una realización preferente particular de la invención, ningún monómero de ANB se encuentra situado en o próximo al extremo 5' (es decir a 1, 2

o 3 nucleótidos) de la cadena antisentido.

De esta manera, en una realización adicional de la invención, el monómero de ANB puede encontrarse situado en cualquier posición de las cadenas sentido y antisentido, excepto por el extremo 5' de la cadena antisentido.

5 En una realización altamente preferente de la invención, la cadena sentido comprende por lo menos un monómero de ANB en el extremo 5' y por lo menos un monómero de ANB en el extremo 3', y la cadena antisentido comprende por lo menos un monómero de ANB en el extremo 3'. Más preferentemente, la cadena sentido comprende por lo menos un monómero de ANB en el extremo 5' y por lo menos un monómero de ANB en el extremo 3', y la cadena
10 antisentido comprende por lo menos dos monómeros de ANB en el extremo 3'. Todavía más preferentemente, la cadena sentido comprende por lo menos dos monómeros de ANB en el extremo 5' y por lo menos dos monómeros de ANB en el extremo 3', y la cadena antisentido comprende por lo menos dos monómeros de ANB en el extremo 3'. Todavía más preferentemente, la cadena sentido comprende por lo menos dos monómeros de ANB en el extremo 5'
15 y por lo menos dos monómeros de ANB en el extremo 3', y la cadena antisentido comprende por lo menos tres monómeros de ANB en el extremo 3'. Se entenderá que en la realización más preferente, ninguno de los compuestos anteriormente indicados contiene un monómero de ANB que se encuentra situado en el extremo 5' de la cadena antisentido.

20 En una realización interesante adicional de la invención, el monómero de ANB se encuentra situado próximo al extremo 3', es decir, en la posición 2, 3 o 4, preferentemente en la posición 2 o 3, en particular en la posición 2, determinada desde el extremo 3'.

25 De acuerdo con lo anterior, en una realización muy interesante adicional de la invención, la cadena sentido comprende un monómero de ANB situado en la posición 2, determinada desde el extremo 3'. En otra realización, la cadena sentido comprende monómeros de ANB situados en las posiciones 2 y 3, determinadas desde el extremo 3'.

30 En una realización preferente particular de la invención, la cadena sentido comprende por lo menos un (tal como un) monómero de ANB situado en el extremo 5' y un monómero de ANB situado en la posición 2 (determinada desde el extremo 3'). En una realización adicional, la cadena sentido comprende por lo menos dos (tal como dos) monómeros de ANB situados en el extremo 5' de la cadena sentido y un monómero de ANB situado en la posición 2 (determinada desde el extremo 3').

35 Además, resulta preferente que la cadena antisentido comprenda un monómero de ANB en la posición 2, determinada desde el extremo 3'. Más preferentemente, la cadena antisentido comprende monómeros de ANB situados en las posiciones 2 y 3, determinadas desde el extremo 3'. Todavía más preferentemente, la cadena antisentido comprende monómeros de ANB situados en las posiciones 2, 3 y 4, determinadas desde el extremo 3'. En una realización preferente particular de la invención, ningún monómero de ANB se encuentra situado en o próximo al extremo 5' (es decir a 1, 2 o 3 nucleótidos) de la cadena antisentido.

40 En una realización altamente preferente de la invención, la cadena sentido comprende por lo menos un monómero de ANB en el extremo 5' y un monómero de ANB en la posición 2 (determinada desde el extremo 3'), y la cadena antisentido comprende por lo menos un monómero de ANB en la posición 2 (determinada desde el extremo 3'). Más preferentemente, la cadena sentido comprende por lo menos un monómero de ANB en el extremo 5' y un monómero de ANB en la posición 2 (determinada desde el extremo 3'), y la cadena antisentido comprende monómeros de ANB
45 en las posiciones 2 y 3 (determinadas desde el extremo 3'). Todavía más preferentemente, la cadena sentido comprende por lo menos dos monómeros de ANB en el extremo 5' y monómeros de ANB en las posiciones 2 y 3 (determinadas desde el extremo 3'), y la cadena antisentido comprende monómeros de ANB en las posiciones 2 y 3 (determinadas desde el extremo 3'). Todavía más preferentemente, la cadena sentido comprende por lo menos dos monómeros de ANB en el extremo 5' y monómeros de ANB en las posiciones 2 y 3 (determinadas desde el extremo 3'), y la cadena antisentido comprende monómeros de ANB en las posiciones 2, 3 y 4 (determinadas desde el extremo 3'). Se entenderá que en la realización más preferente, ninguno de los compuestos anteriormente indicados contiene un monómero de ANB que se encuentra situado en el extremo 5' de la cadena antisentido.

55 Tal como se ha indicado anteriormente, cada cadena comprende 12 a 35 nucleótidos. Se entenderá que estos números se refieren al número total de nucleótidos naturales, variantes y análogos de nucleótido, monómeros de ANB, etc., en la cadena. De esta manera, el número total de dichos nucleótidos naturales, variantes y análogos de nucleótido, monómeros de ANB, etc., no será inferior a 12 y no excederá de 35. En una realización interesante de la invención, cada cadena comprende 17 a 25 nucleótidos, tal como 20 a 22 o 20 a 21 nucleótidos.

60 Los compuestos según la invención pueden presentar extremos romos, y en una realización particular, el compuesto de ANBip de la invención es un 19-mero y presenta extremos romos. Más preferentemente, sin embargo, por lo menos una de las cadenas presenta un extremo 3' protuberante. Típicamente, el extremo 3' protuberante presenta 1 a 7 nucleótidos (o variantes o análogos de nucleótido o monómeros de ANB), preferentemente de 1 a 3 nucleótidos.

De esta manera, se entenderá que la cadena sentido puede contener un extremo 3' protuberante; la cadena antisentido puede contener un extremo 3' protuberante, o tanto la cadena sentido como la antisentido pueden contener extremos 3' protuberantes.

5 De manera similar, por lo menos una de las cadenas presenta un extremo 5' protuberante. Típicamente, el extremo 5' protuberante presenta 1 a 4 nucleótidos (o variantes o análogos de nucleótido o monómeros de ANB), preferentemente de 1 a 3 nucleótidos. De esta manera, se entenderá que la cadena sentido puede contener un extremo 5' protuberante; la cadena antisentido puede contener un extremo 5' protuberante, o tanto la cadena sentido como la antisentido pueden contener extremos 5' protuberantes. Resulta evidente que la cadena sentido puede
10 contener tanto un extremo 3' protuberante como un extremo 5' protuberante. Alternativamente, la cadena antisentido puede contener tanto un extremo 3' protuberante como un extremo 5' protuberante.

Típicamente, los compuestos de la invención contienen otros residuos diferentes de monómeros de ANB. Dichos otros residuos pueden ser cualesquiera otros residuos comentados en relación a la definición de "nucleótido", anteriormente, y entre ellos se incluyen, por ejemplo, monómeros de ARN nativo, monómeros de ADN nativo, así como variantes y análogos de nucleótido tales como los indicados en relación a la definición de "nucleótido", anteriormente. Entre los ejemplos específicos de dichas variantes y análogos de nucleótido se incluyen 2'-F, 2'-O-Me, 2'-O-metoxietilo (MOE), 2'-O-(3-aminopropilo) (AP), hexitol ácido nucleico (HAN), 2'-F-arabino-ácido nucleico (2'-F-AAN) y D-ciclohexenil-nucleósido (CeAN). Además, el enlace entre nucleósidos puede ser un enlace fosforodiéster, fosforotioato o N3'-P5'-fosforoamidato, tal como se ha indicado anteriormente.

En general, las cadenas individuales de los compuestos de la invención contienen por lo menos aproximadamente 5%, por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 15% o por lo menos aproximadamente 20% de monómero de ANB, basado en el número total de nucleótidos en la cadena. En determinadas realizaciones,
25 los compuestos de la invención contienen por lo menos aproximadamente 25%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 80% o por lo menos aproximadamente 90% de monómero de ANB, basado en el número total de nucleótidos en la cadena.

30 Respecto a los monómeros de ANB, se entenderá que cualquiera de los monómeros de ANB mostrados en los Esquemas 2 y 3 resulta útil para los fines de la presente invención. Sin embargo, actualmente resulta preferente que el monómero de ANB se encuentre en la forma beta-D, correspondiente a los monómeros de ANB mostrados como compuestos 3A, 3C y 3D. El monómero de ANB actualmente más preferente es el monómero mostrado como compuesto 3A en los Esquemas 3 y 4, anteriormente, es decir, el monómero de ANB actualmente más preferente es
35 la forma beta-D de oxi-ANB.

En una realización adicional de la invención, el compuesto de la invención se encuentra unido a uno o más ligandos de manera que forma un conjugado. El ligando o ligandos funcionan incrementando la incorporación celular del conjugado en comparación con el compuesto no conjugado. Dicha conjugación puede tener lugar en las posiciones
40 terminales 5'-OH y/o 3'-OH, aunque los ligandos también puede tener lugar en los azúcares y/o las nucleobases. En particular, el factor de crecimiento con el que puede conjugarse el oligonucleótido antisentido, puede comprender transferrina o folato. Los complejos de transferrina-poliilisina, oligonucleótido o los complejos de folato-poliilisina-oligonucleótido pueden prepararse para la incorporación por las células que expresan niveles elevados de receptor de transferrina o folato. Otros ejemplos de conjugados/ligandos son las fracciones de colesterol, intercalantes de dúplex tales como acridina, poli-L-lisina, "adición terminal de caperuzas" con uno o más grupos de unión resistentes a nucleasas, tales como fosforomonotioato y similares.

La preparación de complejos de transferrina como portadores de incorporación de oligonucleótidos en las células se describe en Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-8414, 1990. La administración celular de conjugados de folato-macromolécula mediante la endocitosis de receptores de folato, incluyendo la administración de un oligonucleótido antisentido, se describen Low et al., patente US n° 5.108.921, y en Leamon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88:5572, 1991.

Los compuestos o conjugados de la invención pueden conjugarse además o conjugarse adicionalmente con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo aspirina, ibuprofeno, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano, un agente quimioterapéutico o un antibiótico.

Las nucleobases de ARN nativo son A, C, G y U. La utilización de dichos monómeros de ANB constituye una modificación mínima. Sin embargo, las bases ^{Me}C (5'-metil-citosina) y T (timina) se utilizan fácilmente como monómeros de ANB y también pueden utilizarse en dúplex de ANBip, tal como se muestra en la presente memoria
60 (ver la fig. 16). Se prevé que la naturaleza de las bases utilizadas en los extremos del ANBip no afectará significativamente a la funcionalidad de la molécula de ARNip con la condición de que mantenga su capacidad de hibridarse con bases complementarias en el caso de que ocupen una posición con apareamiento de bases en la

molécula. Sin embargo, en el caso de que las modificaciones de ANB se introduzcan en posiciones internas del dúplex, por ejemplo en la posición 10 (determinada desde el extremo 5'), debe preverse que la naturaleza de la nucleobase será importante. De esta manera, las bases nativas, C y U, perturbarán el dúplex en menor grado que las modificaciones de base, T y MeC. Lo anterior proporciona sutiles posibilidades de diseño. Por ejemplo, en el caso de que se desee "bloquear" la cadena sentido en el sitio de corte, por ejemplo en la posición 10, deberá utilizarse T o MeC (en caso de que sean complementarios), aunque si resulta necesario modificar la cadena antisentido en el sitio de corte, debería utilizarse, por ejemplo, U o C en la posición 10 (en caso de ser complementarios). Por lo tanto, una realización de la invención incluye una nucleobase modificada. Un bloqueo de la nucleobase podría conseguirse mediante la utilización de grupos más voluminosos que el metilo, por ejemplo etilo, propilo, fenilo o grupos informadores como la biotina. De esta manera, el reconocimiento diferenciado de las nucleobases por el complejo RISC u otros enzimas proporciona un nivel adicional de oportunidades de diseño del ARNip modificado con ANB. De acuerdo con lo anterior, en una realización interesante de la invención, la posición 10 (determinada desde el extremo 5') comprende T o MeC.

Con el fin de permitir una rápida respuesta a cambios ambientales y de otro tipo, los sistemas biológicos típicamente se construyen como sistemas dinámicos, es decir, como sistemas en los que se mantiene el estado de equilibrio mediante la acción de tanto activadores como desactivadores. En referencia al complejo RISC, por lo tanto, puede preverse que el complejo activado (es decir, el complejo proteico que contiene el oligonucleótido intacto que cataliza la destrucción de la diana) estará sometido a una actividad de desactivación, tal como, por ejemplo, una actividad de nucleasa que elimina la totalidad o parte del oligonucleótido, inactivando de esta manera la función del complejo RISC activado. Alternativamente, la desactivación del complejo RISC puede determinarse simplemente a partir de la tasa de caída del oligonucleótido del complejo RISC, que, tras la disociación, puede no ser capaz de reasociarse.

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto interesante, la presente invención se refiere a la utilización de los compuestos dados a conocer en la presente memoria para incrementar el tiempo de vida del complejo RISC activo, incrementando de esta manera su duración de acción. En una realización de la invención, lo anterior se consigue incrementando la resistencia del componente ARN del complejo RISC frente a la degradación por la actividad o actividades de ARNasa putativas mediante incorporación de ANB y/o otros análogos de ácido nucleico y/o mediante modificaciones químicas. En otra realización de la invención, el incremento deseado del tiempo de vida del complejo RISC activo se consigue reduciendo la tasa de acaída del oligonucleótido de ARN del complejo RISC mediante la introducción de ANB y/o otros análogos de ácidos nucleicos y/o mediante modificaciones químicas que incrementan la afinidad del oligonucleótido para sus parejas de unión en el complejo RISC.

En el caso de que se diseñe como inhibidor, los ANBip de la invención se unen al ácido nucleico diana y modulan la expresión de su proteína afin. Preferentemente, dicha modulación produce una inhibición de la expresión de por lo menos 10% o de por lo menos 20% en comparación con el nivel normal de expresión, más preferentemente de por lo menos 30%, de por lo menos 40%, de por lo menos 50%, de por lo menos 60%, de por lo menos 70%, de por lo menos 80%, o de por lo menos 90% del nivel normal de expresión.

40 Preparación

Los compuestos de la invención pueden producirse utilizando técnicas de polimerización de la química de los ácidos nucleicos, las cuales son bien conocidas por el experto ordinario en la materia de la química orgánica. En general, pueden utilizarse ciclos de oligomerización estándares del enfoque de fosforamidita (S.L. Beaucage y R.P. Lyer, Tetrahedron 49:6123, 1993, y S.L. Beaucage y R.P. Lyer, Tetrahedron 48:2223, 1992), aunque también pueden utilizarse otras químicas, tales como la del H-fosfonato o la del fosfotriéster.

Para algunos monómeros, pueden resultar necesarios tiempos de acoplamiento más prolongados y/o acoplamientos repetidos con nuevos reactivos y/o la utilización de reactivos de acoplamiento más concentrados. Sin embargo, según los datos del presente solicitante, las fosforamiditas utilizadas se acoplan con un rendimiento de acoplamiento por etapas satisfactorio, >97%. La tiolación del fosfato puede llevarse a cabo intercambiando la oxidación normal, es decir, la oxidación de yodo/piridina/H₂O, con un procedimiento de oxidación utilizando el reactivo de Beaucage (disponible comercialmente). Tal como resultará evidente para el experto en la materia, pueden utilizarse otros reactivos de sulfurización.

La purificación de las cadenas individuales puede llevarse a cabo utilizando cartuchos de purificación de fase inversa desechables y/o HPLC de fase inversa y/o precipitación con etanol o butanol. Puede utilizarse la electroforesis en gel, HPLC de fase inversa, EM MALDI y EM-IEP, para verificar la pureza de los oligonucleótidos sintetizados que contienen ANB. Además, los materiales de soporte sólido en los que se ha inmovilizado ANB de nucleobases protegidas y 5'-OH-protegido resultan especialmente interesantes para la síntesis de los oligonucleótidos que contienen ANB en los que se incluye un monómero de ANB en el extremo 3'. Con este fin, el material de soporte sólido preferentemente es CPG o poliestireno sobre el que se une un monómero de ANB funcionalizado en 3' opcionalmente con nucleobases protegidas y opcionalmente 5'-OH-protegido. El monómero de ANB puede unirse al

soporte sólido utilizando las condiciones indicadas por el proveedor para dicho material de soporte sólido particular.

5 Un aspecto de la presente invención se refiere a un nuevo método para la síntesis de los compuestos de la invención, que se caracteriza porque los monómeros individuales, por ejemplo los monómeros de ANB y los monómeros de ARN, se acoplan utilizando 1H-tetrazol o 5-etiltio-1H-tetrazol. Una realización adicional de dicho aspecto es que el método implica un tiempo de acoplamiento comprendido en el intervalo de entre 200 y 1.200 segundos, tal como en el intervalo de entre 400 y 1.200 segundos, preferentemente en el intervalo de entre 600 y 900 segundos.

10 Las dianas que deben modificarse según la presente invención pueden ser dianas que participan en varios mecanismos biológicos básicos, entre ellos la proliferación de los glóbulos rojos, la proliferación celular, el metabolismo de los iones, el metabolismo de la glucosa y de la energía, la regulación del pH y el metabolismo de la matriz. Los compuestos de la invención pueden utilizarse en un método de prevención o tratamiento del cáncer que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de ARNi modulador de la diana en un ser humano que necesita dicha terapia.

Terapia y composiciones farmacéuticas

20 Tal como se ha explicado inicialmente, los compuestos de la invención constituyen fármacos adecuados con propiedades mejoradas. El diseño de un fármaco de ARNi potente y seguro requiere el ajuste fino de diversos parámetros, tales como la afinidad/especificidad, la estabilidad en líquidos biológicos, la incorporación celular, el modo de acción, las propiedades farmacocinéticas y la toxicidad.

25 De acuerdo con lo anterior, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la invención y a un diluyente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

30 En todavía otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a un compuesto según la presente invención para la utilización como medicamento.

35 Tal como se entenderá, la dosis es dependiente de la gravedad y sensibilidad del estado de enfermedad que debe tratarse, y el curso de tratamiento dura entre varios días y varios meses, o hasta que se consigue la curación o la disminución del estado de enfermedad. Pueden calcularse los programas de administración óptimos para mediciones de la acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Las dosis óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los ANBi individuales. Generalmente puede estimarse basándose en las EC₅₀ que se ha observado que resultan eficaces en modelos animales in vitro e in vivo. En general, la dosis es de entre 0,01 mg y 1 g por kg de peso corporal, y puede administrarse una o más veces al día, semana, mes o año, o incluso una vez cada 2 a 10 años, o mediante infusión continua durante horas hasta durante varios meses. Las tasas de repetición para la administración pueden estimarse basándose en los tiempos de residencia y las concentraciones del fármaco medidos en los líquidos o tejidos corporales. Tras el tratamiento con éxito, puede resultar deseable someter al paciente a terapia de mantenimiento para evitar la recurrencia del estado de enfermedad.

Composición farmacéutica

45 Debe entenderse que la invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende por lo menos un compuesto de la invención como un ingrediente activo. Debe entenderse que la composición farmacéutica según la invención comprende opcionalmente un portador farmacéutico y que la composición farmacéutica comprende opcionalmente compuestos adicionales, tales como compuestos quimioterapéuticos, compuestos antiinflamatorios, compuestos antivíricos y/o compuestos inmunomoduladores.

50 El compuesto oligomérico comprendido en la presente invención puede utilizarse en una diversidad de sales farmacéuticamente aceptables. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión se refiere a sales que conservan la actividad biológica deseada de los compuestos identificados en la presente memoria y muestran efectos toxicológicos no deseados mínimos. Pueden formarse ejemplos no limitativos de dichas sales con sales orgánicas de aminoácido y de adición de base formadas con cationes metálicos tales como cinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio, sodio, potasio y similares, o con un catión formado de amonio, N,N-dibenciletilén-diamina, D-glucosamina, tetraetilamonio o etilendiamina.

60 En una realización de la invención, el compuesto oligomérico puede encontrarse en forma de un profármaco. Los oligonucleótidos son iones cargados negativamente. Debido a la naturaleza lipofílica de las membranas celulares, la incorporación celular de los oligonucleótidos se encuentra reducida en comparación con equivalentes neutros o lipofílicos. Este "impedimento" de la polaridad puede evitarse mediante la utilización del enfoque de profármaco (ver, por ejemplo, Crooke R.M., 1998, en: Crooke S.T. Antisense Research and Application, Springer-Verlag, Berlin,

Alemania, vol. 131, páginas 103-140). En dicho enfoque, los oligonucleótidos se preparan de una manera protegida, de manera que el oligo es neutro al administrarlo. Estos grupos de protección se diseñan de manera que puedan eliminarse al ser incorporado el oligo por las células. Son ejemplos de dichos grupos de protección, S-acetiltioetilo (SATE) o S-pivaloiltioetilo (t-butil-SATE). Dichos grupos de protección son resistentes a nucleasas y son eliminados selectivamente dentro de la célula.

Los agentes de unión y adyuvantes farmacéuticamente aceptables pueden comprender parte del fármaco formulado. Las cápsulas, tabletas y píldoras, etc. pueden contener, por ejemplo, los compuestos siguientes: celulosa microcristalina, goma o gelatina como ligantes; almidón o lactosa como excipientes; estearatos como lubricantes; y diversos agentes edulcorantes o saborizantes. Para las cápsulas, la unidad de administración puede contener un portador líquido, tal como aceites grasos. De manera similar, los recubrimientos de azúcar o agentes entéricos pueden ser parte de la unidad de administración. Las formulaciones de oligonucleótidos también pueden ser emulsiones de los ingredientes farmacéuticos activos y lípidos que forman una emulsión micelar. Puede mezclarse un compuesto de la invención con cualquier material que no altere la acción deseada, o con un material que complementa la acción deseada. Entre ellos podrían incluirse otros fármacos, incluyendo otros compuestos de nucleótidos. Para la administración parenteral, subcutánea, intradérmica o tópica, la formulación puede incluir un diluyente estéril, tampones, reguladores de la tonicidad y antibacterianos. El compuesto activo puede prepararse con portadores que protegen frente a la degradación o la eliminación inmediata del cuerpo, incluyendo implantes o microcápsulas con propiedades de liberación controlada. Para la administración intravenosa los portadores preferentes son solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato. Preferentemente, el compuesto oligomérico se incluye en una formulación unitaria tal como en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable, en una cantidad suficiente para administrar en un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz sin provocar efectos secundarios graves en el paciente tratado.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de varias maneras, dependiendo de si se desea el tratamiento local o sistémico y del área que debe tratarse. La administración puede ser: (a) oral, (b) pulmonar, por ejemplo mediante inhalación o insuflado de polvos o aerosoles, incluyendo mediante nebulizador; intratraqueal o intranasal, (c) tópica, incluyendo epidérmica, transdérmica, oftálmica y en membranas mucosas, incluyendo la administración vaginal y rectal, o (d) parenteral, incluyendo intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal, o inyección o infusión intramuscular, o intracraneal, por ejemplo intratecal o intraventricular. En una realización, la composición farmacéutica se administra por vía i.v., i.p., oral, tópica o en forma de una inyección de bolo o se administra directamente en el órgano diana. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, sprays, supositorios, líquidos y polvos. Pueden resultar necesarios o deseables portadores farmacéuticos convencionales, bases acuosas, polvos o aceitosas, espesantes y similares. También pueden resultar útiles condones recubiertos, guantes y similares. Entre las formulaciones tópicas preferentes se incluyen aquellas en las que los compuestos de la invención se encuentran en mezcla con un agente de administración tópica, tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácido graso, esteroides, agentes quelantes y surfactantes. Entre las composiciones y formulaciones para la administración oral se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, tabletas o minitables. Entre las composiciones y formulaciones para la administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluirse las soluciones acuosas estériles, que pueden contener además tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados, tales como, aunque sin limitarse a ellos, intensificadores de la penetración, compuestos portadores y otros portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Entre las composiciones farmacéuticas de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una diversidad de componentes, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes. La administración de fármaco en el tejido tumoral puede incrementarse mediante la administración mediada por portador, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, liposomas catiónicos, ciclodextrinas, derivados de porfirina, dendrímeros de cadena ramificada, polietilimina, polímeros, nanopartículas y microesferas (Dass C.R., J Pharm Pharmacol 54(1):3-27, 2002). Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse convenientemente en forma de administración unitaria, pueden prepararse siguiendo técnicas convencionales bien conocidas de la industria farmacéutica. Entre dichas técnicas se incluyen la etapa de asociar los ingredientes activos con el portador o portadores o excipiente o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima los ingredientes activos con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos, o ambos, y después, en caso necesario, conformando el producto. Las composiciones de la presente invención pueden formularse en cualquiera de entre muchas formas de administración posibles, tales como, aunque sin limitarse a ellas, tabletas, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos y supositorios. Las composiciones de la presente invención también pueden formularse en forma de suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión puede contener además estabilizadores. Los

compuestos de la invención pueden conjugarse además con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo aspirina, ibuprofeno, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

5 En otra realización, las composiciones de la invención pueden contener uno o más compuestos de ANBip, con diana en un primer ácido nucleico, y uno o más compuestos de ANBip adicionales con diana en un segundo ácido nucleico diana. Pueden utilizarse dos o más compuestos combinados, conjuntamente o secuencialmente.

10 Los compuestos dados a conocer en la presente memoria resultan útiles para varias aplicaciones terapéuticas, tal como se ha indicado anteriormente. En general, entre los métodos terapéuticos se incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un ANBip en un mamífero, particularmente un ser humano. En una realización determinada, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen (a) uno o más compuestos de la invención, y (b) uno o más agentes quimioterapéuticos. En el caso de que se utilicen con los compuestos de la invención, dichos agentes quimioterapéuticos pueden utilizarse individualmente, secuencialmente o en combinación con otro u otros de dichos agentes quimioterapéuticos o en combinación con radioterapia. Todos los agentes quimioterapéuticos conocidos por el experto en la materia se incorporan en la presente memoria como tratamientos de combinación con compuesto según la invención. También pueden combinarse en composiciones de la invención otros agentes activos, tales como fármacos antiinflamatorios, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, fármacos y corticoesteroides antiinflamatorios no esteroideos, fármacos antivíricos y fármacos inmunomoduladores. Pueden utilizarse dos o más compuestos combinados, conjuntamente o secuencialmente.

20 *Cáncer*

25 En un aspecto todavía adicional, la presente invención se refiere a la utilización de un compuesto según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer. En otro aspecto, los compuestos de la presente invención pueden utilizarse en un método para el tratamiento, o la profilaxis del cáncer, comprendiendo dicho método la administración de un compuesto según la invención o una composición farmacéutica de la invención en un paciente que lo necesita.

30 Entre dichos cánceres pueden incluirse la neoplasia linforreticular, la leucemia linfoblástica, tumores cerebrales, tumores gástricos, plasmacitomas, mieloma múltiple, leucemia, tumores del tejido conectivo, linfomas y tumores sólidos.

35 En la utilización de un compuesto de la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer, dicho cáncer convenientemente puede encontrarse en forma de un tumor sólido. Análogamente, en el método de tratamiento del cáncer dado a conocer en la presente memoria, dicho cáncer convenientemente puede encontrarse en forma de un tumor sólido.

40 Además, dicho cáncer también es convenientemente un carcinoma. El carcinoma típicamente se selecciona de entre el grupo que consiste de melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma ovárico, carcinoma de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga, cáncer de vejiga superficial recurrente, carcinoma de estómago, carcinoma prostático, carcinoma pancreático, carcinoma pulmonar, carcinoma cervical, displasia cervical, papilomatosis laríngea, carcinoma de colon, carcinoma colorrectal y tumores carcinoides. Más típicamente, dicho carcinoma se selecciona de entre el grupo que consiste de melanoma maligno, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de mama, carcinoma de colon y carcinoma de células renales. El melanoma maligno típicamente se selecciona de entre el grupo que consiste de melanoma de extensión superficial, melanoma nodular, melanoma maligno lentigo, melanoma acral, melanoma amelanótico y melanoma desmoplásico.

50 Alternativamente, el cáncer puede ser convenientemente un sarcoma. El sarcoma típicamente se encuentra en la forma seleccionada de entre el grupo que consiste de osteosarcoma, sarcoma de Ewing, condrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, fibrosarcoma y sarcoma de Kaposi.

Alternativamente, el cáncer puede ser convenientemente un glioma.

55 Una realización adicional se refiere a la utilización de un compuesto según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer, en el que dicho medicamento comprende además un agente quimioterapéutico seleccionado de entre el grupo que consiste de adrenocorticoesteroides, tales como prednisona, dexametasona o decadron, altretamina (hexalén, hexametilmelamina (HMM)), amifostina (etiol), aminoglutetimida (Cytadren), amsacrina (M-AMSA), anastrozol (Arimidex), andrógenos tales como testosterona, asparaginasa (Elspar), Bacillus calmette-Guerin, bicalutamida (Casodex), bleomicina (blenoxano), busulfán (Myleran), carboplatino (paraplatino), carmustina (BCNU, BiCNU), clorambucilo (Leukeran), clordesoxiadenosina (2-CDA, cladribina, leustatina), cisplatino (platinol), citosina arabinósido (citarabina), dacarbazina (DTIC), dactinomicina (actinomicina D, cosmegen), daunorrubicina (cerubidina), docetaxel (taxotere), doxorubicina (adriomicina), epirubicina, estramustina

60

(Emcyt), estrógenos, tales como dietilestilbestrol (DES), etopósido (VP-16, VePesid, etopofos), fludarabina (fludara), flutamida (eulexina), 5-FUDR (floxuridina), 5-fluorouracilo (5-FU), gemcitabina (Gemzar), goserelina (Zodalex), herceptina (trastuzumab), hidroxiaurea (Hydrea), idarrubicina (idamicina), ifosfamida, IL-2 (proleuquina, aldesleuquina), interferón-alfa (intrón A, roferón A), irinotecán (Camptosar), leuprólido (Lupron), levamisol (Ergamisol), lomustina (CCNU), mecloratamina (mustargeno, mostaza nitrogenada), melfalán (Alkeran), mercaptopurina (purinetol, 6-MP), metotrexato (mexato), mitomicina C (mutamucina), mitoxantrona (novantrona), octreótido (sandostatina), pentostatina (2-desoxicoformicina, nipent), plicamicina (mitramicina, mitracina), prorocarbazina (matulano), estreptozocina, tamoxifina (nolvadex), taxol (paclitaxel), tenipósido (vumon, VM-26), tiotepa, topotecán (hycamtin), tretinoína (vesanoide, ácido retinoico todo-trans, vinblastina (valban), vincristina (oncovina) y vinorelbina (navelbina). Convenientemente, el agente quimioterapéutico adicional se selecciona de entre taxanos tales como Taxol, Paclitaxel o Docetaxel.

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

Dicho de manera alternativa, los compuestos de la invención pueden utilizarse en un método para el tratamiento del cáncer, comprendiendo dicho método la administración de un compuesto de la invención o una composición farmacéutica según la invención en un paciente que lo necesita y que comprende además la administración de un agente quimioterapéutico adicional. Dicha administración adicional puede ser tal que el agente quimioterapéutico adicional se conjuga con el compuesto de la invención, se encuentra presente en la composición farmacéutica o se administra en una formulación separada.

40 *Enfermedades infecciosas*

En una realización interesante particular de la invención, los compuestos de ANBip según la invención se utilizan con diana en el síndrome respiratorio agudo severo (SRAS), que apareció por primera vez en China en noviembre de 2002. Según la OMS, se han infectado más de 8.000 personas en todo el mundo, resultando en más de 900 muertes. Se ha identificado un coronavirus previamente desconocido como agente causativo de la epidemia de SRAS (Drosten C. et al., N. Engl. J. Med. 348:1967-76, 2003, y Fouchier RA et al., Nature 423:240, 2003). Tras la identificación del SRAS-CoV se realizó la secuenciación rápida del genoma vírico de múltiples aislados (Ruan et al., Lancet 361:1779-85, 2003; Rota P.A. et al., Science 300:1394-9, 2003, y Marra M.A. et al., Science 300:399-404, 2003). Esta información de secuencia hizo posible inmediatamente el desarrollo de antiviricos del SRAS mediante técnicas de inactivación basadas en ácidos nucleicos tales como ARNip. La secuencia de nucleótidos codificante de la ARN polimerasa (Pol) dependiente de ARN del SRAS-CoV se encuentra altamente conservada en toda la familia de coronavirus. El producto génico Pol se traduce a partir de ARN genómico como parte de una poliproteína y utiliza el ARN genómico como molde para sintetizar el ARN de cadena negativa y posteriormente el ARNm subgenómico. De esta manera, la proteína Pol se expresa tempranamente en el ciclo vital vírico y resulta crucial para la replicación vírica (ver la fig. 10).

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto todavía adicional, la presente invención se refiere a la utilización de un compuesto según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del síndrome respiratorio agudo severo (SRAS). Los compuestos de la invención pueden utilizarse en un método para el tratamiento del síndrome respiratorio agudo severo (SRAS), comprendiendo dicho método la administración de un compuesto según la invención o una composición farmacéutica según la invención en un paciente que lo necesita.

Se encuentra contemplado que los compuestos de la invención pueden ser ampliamente aplicables a un amplio abanico de enfermedades infecciosas, tales como difteria, tétanos, pertussis, polio, hepatitis B, Haemophilus influenza, sarampión, parotiditis y rubeola.

5 De acuerdo con lo anterior, en todavía otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un compuesto según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad infecciosa. Los compuestos de la invención pueden utilizarse en un método para el tratamiento de una enfermedad infecciosa, comprendiendo dicho método la administración de un compuesto según la invención o una composición farmacéutica según la invención en un paciente que lo necesita.

10

Enfermedades inflamatorias

15 La respuesta inflamatoria es un mecanismo de defensa esencial del organismo frente al ataque de agentes infecciosos y también participa en la patogénesis de muchas enfermedades agudas y crónicas, incluyendo los trastornos autoinmunitarios. A pesar de necesitarse para combatir patógenos, los efectos de un estallido inflamatorio pueden ser devastadores. Por lo tanto, con frecuencia resulta necesario restringir la sintomatología de la inflamación con la utilización de fármacos antiinflamatorios. La inflamación es un proceso complejo normalmente inducido por la lesión de los tejidos, que incluye la activación de un amplio abanico de enzimas, el incremento de la permeabilidad vascular y la extravasación de líquidos sanguíneos, la migración celular y la liberación de mediadores químicos, todos destinados tanto a destruir como a reparar el tejido dañado.

20

25 En todavía otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un compuesto según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad inflamatoria. Los compuestos de la invención pueden utilizarse en un método para el tratamiento de una enfermedad infecciosa, comprendiendo dicho método la administración de un compuesto según la invención o una composición farmacéutica según la invención en un paciente que lo necesita.

30

30 En una realización preferente de la invención, la enfermedad inflamatoria es una enfermedad reumática y/o una enfermedad del tejido conectivo, tal como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (LES) o lupus, escleroderma, polimiositis, enfermedad intestinal inflamatoria, dermatomiositis, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, vasculitis, artritis soriática, dermatitis soriática exfoliativa, pénfigo vulgar y síndrome de Sjögren, en particular la enfermedad intestinal inflamatoria y la enfermedad de Crohn.

35

35 Alternativamente, la enfermedad inflamatoria puede ser una inflamación no reumática, tal como bursitis, sinovitis, capsulitis, tendinitis y/o otras lesiones inflamatorias de origen traumático y/o deportivo.

Otros usos

40 Los compuestos de ARNip de la presente invención pueden utilizarse como reactivos de investigación para el diagnóstico, la terapéutica y la profilaxis. En investigación, el ARNip puede utilizarse para inhibir específicamente la síntesis de genes diana en células y animales experimentales, facilitando de esta manera el análisis funcional de la diana o una valoración de su utilidad como diana para la intervención terapéutica. En el diagnóstico los oligonucleótidos de ARNip pueden utilizarse para detectar y cuantificar la expresión de la diana en células y tejidos mediante transferencia northern, hibridación *in situ* o técnicas similares. Para la terapéutica, un animal o un ser humano que se sospecha que presenta una enfermedad o trastorno que puede tratarse mediante la modulación de la expresión de la diana se trata mediante la administración de compuestos de ARNip según la presente invención. Se proporcionan además métodos de tratamiento de un animal, en particular un ratón y una rata, y de tratamiento de un ser humano que se sospecha que presenta o es propenso a presentar una enfermedad o condición asociada a la expresión de la diana, mediante la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más de los compuestos o composiciones de ARNip de la invención.

50

La invención se ilustra adicionalmente de una manera no limitativa mediante los ejemplos siguientes.

EJEMPLOS

55

Abreviaturas

DMT:	Dimetoxitritilo
DCI:	4,5-Dicianoimidazol
DMAP:	4-Dimetilaminopiridina
DCM:	Diclorometano
DMF:	Dimetilformamida

THF:	Tetrahidrofurano
DIEA:	N,N-diisopropiletilamina
PyBOP:	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio
Bz:	Benzoilo
Ibu:	Isobutirilo
Beaucage:	1,1-Dióxido DE 3H-1,2-Benzoditiol-3-ona
GL3+:	5'-cuuacgcugaguacuucgadt-3'
GL3-:	5'-ucgaaguacucagcguagadt-3'
NPY+:	5'-ugagagaaagcacagaaaadt-3'
NPY-:	5'-uuuucugugcuucucadt-3'
RL+:	5'-aucugaagaaggagaaaadt-3'
RL-:	5'-uuuuucuccuucagadt-3'
Letras minúsculas sin prefijo:	monómero de ARN
Letras minúsculas con prefijo "d":	monómero de ADN

Ejemplo 1: síntesis de monómeros

5 La preparación de monómeros de ANB se indica en gran detalle en las referencias Koshkin et al., J. Org. Chem. 66:8504-8512, 2001, y en Pedersen et al., Synthesis 6:802-809, 2002, así como en las referencias proporcionadas en las mismas. En el caso de que los grupos protectores Z y Z* eran oxi-N,N-diisopropil-O-(2-cianoetil)fosforamidita y dimetoxitritiloxi, dichos compuestos se sintetizaron tal como se indica en el documento nº WO 03/095467; Pedersen et al., Synthesis 6:802-808, 2002; Sørensen et al., J. Am. Chem. Soc. 124:2164-2176, 2002; Singh et al., J. Org. Chem. 63:6078-6079, 1998; y Rosenbohm et al., Org. Biomol. Chem. 1:655-663, 2003. Todos los monómeros que
10 contienen citosina se sustituyeron por monómeros 5-metil-citosina para todos los acoplamientos. Todos los monómeros de ANB utilizados eran beta-D-oxi-ANB (compuesto 3A).

Ejemplo 2: síntesis de oligonucleótidos

15 Todas las síntesis se llevaron a cabo a escala de 1 mmol en una plataforma instrumental MOSS Expedite. Los procedimientos de síntesis se llevaron a cabo esencialmente tal como se indica en el manual del instrumental.

20 Se disolvieron en DCM (35 ml) monómero 5'-O-DMT-3'-hidroxi-ANB (500 mg), anhídrido succínico (1,2 eq.) y DMAP (1,2 eq.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Tras las extracciones con NaH₂PO₄ 0,1 M, pH 5,5 (2x) y solución hipersalina (1x), la capa orgánica se secó adicionalmente con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó. Se obtuvo el derivado hemiéster con un rendimiento de 95% y se utilizó sin ninguna purificación adicional.

Preparación de ANB-VPC (Vidrio de Poro Controlado)

25 Se disolvió el derivado hemiéster preparado anteriormente (90 mmoles) en una cantidad mínima de DMF. Se añadió DIEA y pyBOP (90 µmoles) y se mezclaron entre sí durante 1 min. Esta mezcla preactivada se agrupó con LCAA-VPC (500 Å, tamaño de malla de 80-120, 300 mg) en un sintetizador manual y se agitó. Tras 1,5 horas de agitación a temperatura ambiente, se separó el soporte mediante filtración y se lavó con DMF, DCM y MeOH. Tras el secado,
30 se determinó que la carga era de 57 µmoles/g (ver Tom Brown, Dorcas J.S. Brown. Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis. En: F.Eckstein, editor. Oligonucleotides and Analogues A Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1991: 13-14).

Ciclos de fosforotioato

35 Se desprotegió 5'-O-DMT (A(bz), C(bz), G(ibu) o T) unido a VPC utilizando una solución de ácido tricloroacético al 3% (v/v) en diclorometano. El VPC se lavó con acetonitrilo. El acoplamiento de fosforamiditas (A(bz), G(ibu), 5-metil-C(bz), o T-β-cianoetil-fosforamidita) se llevó a cabo mediante la utilización de una solución de amidita 0,08 M protegida con 5'-O-DMT en acetonitrilo y la activación se llevó a cabo utilizando DCI (4,5-dicianoimidazol) en
40 acetonitrilo (0,25 M). La reacción de acoplamiento se llevó a cabo durante 2 min. La tiolación se llevó a cabo mediante la utilización de reactivo de Beaucage (0,05 M en acetonitrilo) y se dejó que reaccionase durante 3 min. El soporte se lavó intensivamente con acetonitrilo y la adición de caperuza posterior se llevó a cabo utilizando soluciones estándares (CAP A) y (CAP B) para añadir una caperuza a los grupos 5' hidroxilo no reaccionados. A
45 continuación se repitió la etapa de adición de caperuza y se concluyó el ciclo mediante lavado con acetonitrilo.

Ciclos de unidad de ANB

Se desprotegió 5'-O-DMT (A(bz), C(bz), G(ibu) o T) unido a VPC utilizando el mismo procedimiento que el indicado anteriormente. El acoplamiento se llevó a cabo mediante la utilización de 5'-O-DMT-A(bz), C(bz), G(ibu) o T-β-cianoetilfosforamidita (0,1 M en acetonitrilo) y la activación se llevó a cabo con DCI (0,25 M en acetonitrilo). La reacción de acoplamiento se llevó a cabo durante 7 minutos. La adición de caperuza se llevó a cabo mediante la utilización de soluciones estándares (CAP A) y (CAP B) durante 30 s. Se oxidó el triéster de fosfito en el triéster de fosfato más estable mediante la utilización de una solución estándar de I₂ y piridina en THF durante 30 s. El soporte se lavó con acetonitrilo y se repitió la etapa de adición de caperuza. Se concluyó el ciclo mediante un lavado intensivo con acetonitrilo.

10 Corte y desprotección

Los oligonucleótidos se escindieron del soporte y se eliminó el grupo protector β-cianoetilo mediante el tratamiento del soporte con NH₄OH al 35% durante 1 h a temperatura ambiente. Se separó el soporte mediante filtración y se eliminaron los grupos protectores de base elevando la temperatura a 65°C durante 4 horas. A continuación, se eliminó el amonio mediante evaporación.

Purificación

Los oligos se purificaron mediante HPLC de fase inversa (RP-HPLC) o mediante cromatografía de intercambio aniónico (CIA).

RP-HPLC:

Columna: VYDAC™, nº de cat. 218TP1010 (vydac)
 Caudal: 3 ml/min
 Tampón: A (acetato amónico 0,1 M, pH 7,6)
 B (acetonitrilo)

25	tiempo	0	10	18	22	23	28
	% de B	0	5	30	100	100	0

AIE:

Columna: Resource™ 15Q (Amersham Pharmacia Biotech)
 Caudal: 1,2 ml/min
 Tampón: A (NaOH 0,1 M)
 B (NaOH 0,1 M, NaCl 2,0 M)

30 Gradiente:

	tiempo	0	1	27	28	32	33
	% de B	0	25	55	100	100	0

Medición de la T_f

35 Se registraron las curvas de fusión en un espectrofotómetro de UV/VIS Perkin Elmer lambda 40 acoplado a un sistema de Peltier PTP-6. Se disolvieron oligonucleótidos en tampón salino (tampón fosfato 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,0) a una concentración de 1,5 μM y utilizando celdas de camino óptico de 1 cm. Las muestras se desnaturalizaron a 95°C durante 3 min. y se enfriaron lentamente a C antes de las mediciones. Las curvas de fusión se registraron a 260 nm utilizando una tasa de calentamiento de 1°C/min., una ranura de 2 nm y una respuesta de 0,2 s. Se obtuvieron los valores de T_f a partir del máximo de la primera derivada de las curvas de fusión.

Ejemplo 3: síntesis de oligonucleótidos de ANB/ARN

45 Síntesis

Se sintetizaron oligonucleótidos de ANB/ARN en modo DMT-off a escala de 1,0 mmol utilizando un sintetizador automatizado de ácidos nucleicos (MOSS Expedite 8909) y utilizando reactivos estándares. Se utilizaron 1H-tetrazol o 5-etilitio-1H-tetrazol como activadores. La concentración de ANB A^{B2}, G^{IBU} y T fosforamidita era de 0,1 M en acetonitrilo anhidro. Se disolvió Me^eC^{Bz} en THF al 15% en acetonitrilo. El tiempo de acoplamiento para todos los

50

acoplamiento de monómero era de 600 s. Las fosforamiditas de ARN (Glen Research, Sterling, Virginia) se encontraban N-acetil- y 2'-O-triisopropilsililoximetil-protegidas (TOM). La concentración de monómero era 0,1 M (acetonitrilo anhidro) y el tiempo de acoplamiento era 900 s. El tiempo de oxidación se fijó en 50 s. El soporte sólido era DMT-ANB-VPC (1.000 Å, 30 a 40 mmoles/g).

5

Tratamiento final y purificación

La escisión de la resina y la desprotección de nucleobase/fosfato se llevó a cabo en un tubo estéril mediante tratamiento con 1,5 ml de una solución de metilamina (1:1, metilamina al 33% en etanol:metilamina al 40% en agua) a 35°C durante 6 h o se dejaron durante la noche. Se centrifugó el tubo y la solución de metilamina se transfirió a un segundo tubo estéril. La solución de metilamina se evaporó en una centrífuga de vacío. Para eliminar los grupos de protección de 2'-O, el residuo se disolvió en 1,0 ml de TBAF 1,0 M en THF y se calentó a 55°C durante 15 min. y se dejó a 35°C durante la noche. Se evaporó el THF en una centrífuga de vacío dejando una goma amarillo pálido, que se neutralizó con aprox. 600 µl (volumen total de la muestra: 1,0 ml) de tampón Tris 1,0 M libre de ARNasa (pH 7). La mezcla se homogeneizó mediante agitación y calentamiento a 65°C durante 3 min. El desalado de los oligonucleótidos se llevó a cabo en columnas NAP-10 (Amersham Biosciences, ver posteriormente). Se recogió el filtrado de la etapa 4 (ver posteriormente) y se analizó mediante MALDI-TOF y electroforesis en gel (gel de acrilamida de secuenciación al 16% (1 mm), tampón TBE al 0,9% [Tris: 89 mM, ácido bórico: 89 mM, EDTA: 2 mM, pH 8,3], se hizo migrar durante 2 h a 20 W como parámetro limitativo. Se tiñó el gel en CyberGold (Molecular Probes, 1:10.000 en 0,9xTBE) durante 30 min., seguido de escaneo en un instrumento Bio-Rad FX Imager). La concentración del oligonucleótido se midió mediante espectrometría de UV a 260 nm.

20

Esquema A. Desalado en columnas de NAP-10:

Etapa	Reactivo	Operación	Volumen	Observaciones
1	-	Vaciado de tampón de almacenamiento	-	Descartar
2	H ₂ O (libre de ARNasa)	Lavado	2 x volumen total	Descartar
3	Oligo en tampón (libre de ARNasa)	Carga	1,0 ml	Descartar
4	H ₂ O (libre de ARNasa)	Elución	1,5 ml	Recolección -contiene oligo
5	H ₂ O (libre de ARNasa)	"Elución"	0,5 ml	Recolección - contiene sales + cantidad pequeña de oligo

Tal como apreciará el experto en la materia, las cuestiones más importantes en la síntesis de los oligos de ANB/ARN en comparación con los procedimientos estándares son que: i) resultan necesarios tiempos de acoplamiento extendidos para conseguir una buena eficiencia de acoplamiento, e ii) el tiempo de extensión debe ampliarse para minimizar la formación de fragmentos de deleción. Además, el acoplamiento de 2'-O-TOM protegió mejor a las fosforamiditas que la protección con 2'-O-TBDMS. Considerando lo anterior, los oligonucleótidos en bruto eran de suficiente calidad para poder evitar la purificación adicional. Debería llevarse a cabo un análisis de EM después de la eliminación de los grupos TOM.

30

Ejemplo 4: estabilidad mejorada de ANBip en comparación con el ARNip

En la fig. 2 se muestra la estabilidad mejorada de ANBip en comparación con la de ARNip. El ARNip tanto ligera como fuertemente modificado mostró una estabilidad mejorada. Se evaluó la estabilidad en suero de feto bovino al 10% diluido en una solución salina fisiológica. Se incubó ARNip y ANBip en el suero a 37°C. Se extrajeron muestras en diferentes puntos temporales y se analizaron en geles de poli(acrilamida)-TBE al 15% y se tiñeron con SYBR-oro (Molecular Probes). Se cuantificaron las bandas y se representaron en un gráfico. Para el compuesto de ARNip no modificado, pudo observarse una acumulación de una banda intermedia (entre el ARNdc y el ARNcs) identificada como un 19-mero de doble cadena, es decir, ARNip con extremos 3' protuberantes degradados. No se observó lo anterior para los ANBip correspondientes.

40

Ejemplo 5: ensayo del diseño de ANBip en un sistema informador de mamífero

45

En primer lugar se evaluó la eficacia de diferentes diseños y combinaciones de ANBip en un sistema informador de luciferasa en cultivo de células de mamífero. En la Tabla 1 se muestran los oligonucleótidos utilizados. Se hibridaron los oligonucleótidos sentido y los antisentido correspondientes con el fin de generar dobles cadenas, es decir, ARNip o ANBip.

Las células utilizadas eran líneas celulares 293 de riñón embrionario humano (HEK). Se mantuvieron las células HEK 293 en DMEM complementado con suero de feto bovino al 10%, penicilina, estreptomycin y glutamina (Invitrogen, Paisely, Reino Unido). Los plásmidos utilizados fueron pGL3-Control codificante de luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor y el intensificador de SV40 y pRL-TK codificante de luciferasa de Renilla bajo el control del promotor del VHS-TK (Promega, Madison, WI, USA).

Transfección

Un día antes de la transfección, las células se sembraron en 500 µl de medio en placas de 24 pocillos con el fin de que se adhiriesen y alcanzar una confluencia de 70% a 90% en el momento de la transfección. Las células se sembraron en el medio sin antibióticos y se transfirieron a 500 µl de Opti-MEM I inmediatamente antes de la adición de mezcla de transfección a las células. Se preparó una mezcla de cotransfección estándar para pocillos por triplicado mediante la adición por separado de 510 ng de pGL3-Control, 51 ng de pRL-TK y 340 ng de ARNip a 150 ml de Optim-MEM I (Invitrogen) y 3 µl de LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) a otros 150 µl de Opti-MEM I. Se mezclaron las dos soluciones y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 a 30 minutos antes de la adición a las células. Se añadieron 100 µl de la mezcla de transfección a cada uno de los tres pocillos. El volumen final del medio más mezcla de transfección era de 600 µl. La concentración de ANBip o ARNip correspondía a aproximadamente 13 nM. Se incubaron las células con la mezcla de transfección durante 4 horas y a continuación se cambió el medio por DMEM completamente complementado.

Se recolectaron células en tampón de lisis pasivo y se sometieron a ensayo siguiendo el protocolo (Promega) utilizando un luminómetro de formato de 96 pocillos NovoSTAR 96 con dispensador de sustrato (BMG Lab Technologies, Offenburg, Alemania). Se aplicaron 10 µl de muestra a cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se añadieron 50 µl de reactivo II de ensayo de luciferasa (sustrato para la luciferasa de luciérnaga) a un pocillo por el luminómetro y se efectuó la medición. A continuación, se añadieron 50 µl de Stop and Glow (solución de parada para la luciferasa de luciérnaga y sustrato para la luciferasa de *Renilla*) y se efectuó la medición. Se utilizó el promedio de las actividades de luciferasa medidas durante 10 s para calcular las proporciones entre la luciferasa de luciérnaga y de *Renilla* o viceversa.

Ejemplo 6: modelo *in vitro* evaluación de la eficacia sobre una diana endógena

Las células utilizadas eran las líneas celulares PC12 de feocromocitoma adrenal de rata. Se mantuvieron las PC12 en DMEM complementado con suero de caballo al 10%, suero de feto bovino al 5%, penicilina, estreptomycin y glutamina. El protocolo de transfección de ANBip o ARNip para los genes endógenos (como NPY en las células PC12) sigue el mismo procedimiento que el indicado anteriormente aunque sin plásmidos con luciferasa y añadiendo sólo ARNip con diana en NPY (ya que el gen NPY se expresa endógenamente en las células PC12). Las concentraciones finales de ANBip o ARNip se encontraban comprendidas entre 1 y 100 nM. Las células se recolectaron habitualmente 24 a 48 horas después de la transfección y se extrajo el ARNm. Se midieron los niveles de ARNm utilizando PCR en tiempo real. La regulación negativa de la diana NPY en PC12 se muestra en la fig. 3.

Ejemplo 7: modelo *in vitro* - Análisis de la inhibición de la diana

Expresión mediante PCR en tiempo real

El silenciamiento génico con ANBip o ARNip de una diana puede someterse a ensayo en una diversidad de modos conocidos de la técnica. Por ejemplo, los niveles de ARNm diana pueden cuantificarse mediante, por ejemplo, análisis de transferencia northern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) competitiva o PCR en tiempo real. La PCR cuantitativa en tiempo real actualmente resulta preferente. El análisis del ARN puede llevarse a cabo en ARN celular total o en ARNm. Los métodos de aislamiento de ARN y de análisis de ARN tales como el análisis de transferencia northern son rutinarios en la técnica y se enseñan en, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons.

Se recolectaron las células y se extrajo el ARNm. Se utilizaron protocolos estándares de PCR en tiempo real para amplificar los genes diana a partir de ARNm con cebadores específicos de gen conjuntamente con una pareja de cebadores hacia un gen de mantenimiento como control interno (tal como ciclofilina). La regulación negativa se expresó como proporción entre la cantidad de ARNm diana y la cantidad de ARNm de control. La PCR cuantitativa en tiempo real puede llevarse a cabo convenientemente utilizando el sistema de detección de PCR en tiempo real iQ Multi-Color comercialmente, disponible de BioRAD.

Ejemplo 8: análisis *in vitro* inhibición con ARNip de la expresión diana de informador por oligonucleótidos de ANBip

Pudieron utilizarse monómeros de ANB para modificar ambos extremos de la cadena sentido en ARNip con un

efecto mantenido en comparación con el ARNip (inhibición >90% de la expresión de la luciferasa de luciérnaga en comparación con muestras no tratadas). También pudo modificarse la cadena antisentido en el extremo 3' sin pérdida de eficiencia, mientras que una modificación en el extremo 5' de la cadena antisentido redujo el efecto a una inhibición de 25% a 50%. Mediante el intercambio de todos los residuos que contenían uracilo por ANB timinas en la cadena sentido se redujo el efecto a 80% de inhibición. Una modificación similar de la cadena antisentido anuló el efecto (fig. 4). La fosforilación del extremo 5' de la cadena antisentido de ANBip no mejoró la reducción (20% a 30% de reducción, datos no mostrados). Algunos experimentos similares con diana en la luciferasa de Renilla demostraron que ambos extremos de la cadena de sentido podían modificarse con monómeros de ANB mientras que la cadena antisentido tolera una modificación del extremo 3' con un monómero de ANB (95% de inhibición en todos los casos), pero mostró una menor inhibición con una modificación de ANB tanto del extremo 3' como del extremo 5'. Todavía se observaba una inhibición de hasta 75% (fig. 5). Se midió la estabilidad de ANB/ARN en todos los oligos de ARN uracilo a ANB timidina (2189) en suero de rata al 100%, en el que la estabilidad era similar a oligos de ADN desnudos. Una cadena sencilla de ARN no modificado (GL3-) y una doble cadena no modificada (GL3/-) se degradaron ya en el punto de tiempo cero (fig. 6).

Ejemplo 9: análisis *in vitro* inhibición con ARNip de diana endógena por ANBip

Inhibición de la citotoxicidad

Se transfectaron células con 85 nM del ARNip o ANBip respectivo (SRAS 1-4, ver la fig. 7) o con ARNip de control con diana en el gen de luciferasa de luciérnaga (Luc) o el gen de neuropéptido Y (NPY) de rata. Se trataron células simuladamente transfectadas con lipofectamina-2000 únicamente y se utilizaron como control positivo. Se incluyeron células no infectadas como control negativo. Se infectaron células transfectadas con 60.000, 6.000 o 600 DICT₅₀ de SRAS-CoV. Tras 50 horas de infección, se midió el ECP y la citotoxicidad. Se observó una diferencia marcada en el ECP entre células tratadas con el ARNip más eficaz, SRAS 1, y las células simuladamente transfectadas (fig. 8). Se determinó la citotoxicidad como porcentaje de liberación de LDH a partir de las células tratadas respecto a las células de control simuladamente transfectadas. Se calculó el porcentaje de inhibición de la citotoxicidad como 100-porcentaje de citotoxicidad en la muestra tratada con ARNip. Los cuatro ARNip y ANBip específicos de Pol presentaron diversos efectos sobre la citotoxicidad (fig. 9). Los ARNip y ANBip más eficaces fueron los que presentaban como diana el sitio SRAS 1, con citotoxicidad reducida y con hasta 65% a 600 DICT₅₀. El sitio SRAS 3 presentaba una eficiencia intermedia al utilizar ARNip a las tres dosis víricas. Sin embargo, SRAS 3 se convirtió en un sitio de igual eficiencia a SRAS 1 al utilizar ANBip, también a las tres dosis víricas. Los sitios SRAS 2 y SRAS 4 no mostraron ningún efecto de ARNip o ANBip a ninguna dosis vírica. Los datos representan medias y desviaciones estándares determinadas en tres experimentos independientes por cuadruplicado.

Virus y células

Se utilizaron células Vero para todos los experimentos celulares. Las células se cultivaron en medio MEM de Eagle sin rojo fenol que contenía FCS al 5% y PEST al 1% a 37°C y con 5% de CO₂. Se cultivó el aislado Frankfurt 1 (GenBank número de acceso AY291315, cortesía de Dr. H. W. Doerr) a título elevado en células Vero. Se agruparon los sobrenadantes de dos matraces de cultivo celular T225 y se congelaron a -80°C en viales de 1 ml, constituyendo la solución madre de virus. El virus madre se identificó como SRAS-CoV mediante PCR con transcriptasa inversa diagnóstico utilizando los cebadores BNLoutS2 y BNLoutAs¹¹ y los cebadores Cor-p-F2 y Cor-p-R1². Se utilizó el virus madre en diluciones de diez veces o a una dilución fija para infectar células Vero en placas de cultivo celular de 96 pocillos. El virus madre se diluyó 600.000 veces (determinado mediante el método de Reed-Muench) hasta alcanzar una DICT₅₀ en placas de cultivo celular de 96 pocillos.

Se produjeron los oligonucleótidos de ANBip tal como se ha indicado anteriormente. Se muestra la secuencia en la fig. 7.

Transfecciones

Se utilizó lipofectamina-2000 (Invitrogen) para transfectar las células con ARNip y ANBip. La eficiencia de transfección era elevada y la mayoría de células resultó transfectada. Se cambió el medio de transfección a MEM de Eagle sin rojo fenol tras cuatro horas y se cultivaron las células durante la noche para formar una monocapa confluyente.

Citopatogenicidad y citotoxicidad

Se detectó el efecto citopatogénico (ECP) sobre las células infectadas como un redondeamiento celular y desprendimiento de la placa de cultivo celular. Se evaluó el ECP bajo un microscopio óptico. Se midió la citotoxicidad utilizando un kit de detección de citotoxicidad (LDH) (Roche, Alemania). Las células simuladamente transfectadas con lipofectamina-2000 únicamente se fijaron como 100% de citotoxicidad causada por la infección

vírica en cada dilución vírica. Se utilizaron células no infectadas para determinar la citotoxicidad de fondo. Se determinó el porcentaje de citotoxicidad como $[(\text{Abs490 muestra} - \text{fondo})/(\text{Abs490 controles simuladamente transfecados} - \text{fondo}) \times 100]$. Se determinó la inhibición de citotoxicidad como $[(1 - (\text{Abs490 muestra} - \text{fondo})/(\text{Abs490 controles simuladamente transfecados} - \text{fondo})) \times 100]$.

5

Ejemplo 10: reducción de efectos fuera de sitio

La inhibición de la diana sentido/antisentido de SRAS en 3'UTR de luciferasa de luciérnaga se llevó a cabo con ARNip/ANBip 1,6 nM con los plásmidos siguientes: pS3X (pGL3 con diana sentido de SRAS), pS3Xas (pGL3 con diana antisentido de SRAS) y pGL3 (sin diana de SRAS).

10

Se clonó la secuencia diana de SRAS 3 en la dirección de sentido (secuencia correspondiente al ARNm de SRAS) y antisentido (secuencia complementaria al ARNm de SRAS) en 3'UTR de luciferasa de luciérnaga, entre la región codificante de luciferasa y poliA en pGL3. Se cortó pGL3 con Xba 1 (entre el codón de parada de luc. y poliA) y un oligo dúplex de ADN secuencia diana de SRAS S3 con extremos protuberantes de XbaI.

15

(diana SRAS 3 (posición genómica de SRAS 14593) oligo dúplex de ADN con extremos protuberantes de XbaI) 5'-ctagcaaacgtcaaac-ccggtaatcttc-3' (sentido, igual que el ARNm) 3'-gttgacagttggccattaaaggatc-5' (antisentido, complementario al ARNm)

20

La ligación del oligo dúplex resultó en dos productos plásmidos con diana sentido o antisentido (pS3Xs: diana en dirección sentido, pS3Xas: diana en dirección antisentido). Se transfectaron los dos plásmidos diferentes en cultivos celulares de HEK293 separados conjuntamente con el plásmido de control pRL-TK y ARNip con diana en SRAS 3 o ANBip con diana en SRAS 3 (concentración final: 1,6 nM), siguiendo el protocolo indicado en el Ejemplo 5. Las células se incubaron durante 24 horas; se recolectaron las células y se midió la actividad de luciferasa tal como se indica en el Ejemplo 5.

25

El ANBip puede inactivar la cadena sentido no deseada, manteniendo simultáneamente el efecto completo de la cadena antisentido. El ARNip muestra el efecto de ambas cadenas. Se clonó la secuencia diana SRAS 3 tanto en dirección sentido como antisentido, en la que se sometieron a ensayo ANBip y ARNip para los efectos de inhibición sobre los dos plásmidos diferentes.

30

El ARNip mostraba una regulación negativa de tanto la diana sentido (parte de la secuencia de ARNm de SRAS, ~90% de reducción de la actividad de luciferasa), así como la diana antisentido (secuencia complementaria al ARNm de SRAS) (reducción de ~50%). Por lo tanto, tanto la cadena sentido como la antisentido en el ARNip presentan un efecto regulador negativo. Sin embargo, el ANBip de SRAS 3 mostraba un efecto regulador negativo igualmente bueno de la diana sentido (reducción de ~90%), mientras que no se detectó actividad sobre la diana antisentido (0% de reducción). Por lo tanto, la cadena antisentido en el ANBip mantiene el efecto completo, mientras que se anula el efecto de la cadena sentido no deseada. Lo anterior significa que el ANBip puede minimizar las dianas incorrectas de la cadena sentido mediante la inactivación de la misma en la maquinaria de interferencia de ARN (fig. 17).

35

40

Ejemplo 11: eficacia *in vivo* del ANBip

El propósito del presente estudio era someter a ensayo la eficacia *in vivo* de dos ARNip anti-proteína fluorescente verde mejorada (PFV_m) que habían sido modificadas mediante la incorporación de monómeros de ANB. Los compuestos utilizados eran 3029/3031 y 3030/3031.

45

Brevemente, en ratones desnudos hembra (NMRI nu/nu, Charles River Netherlands, Maastricht, Países Bajos) se inyectaron xenoinjertos 15PC3 y Miapaca. Las células 15PC3 y las células Miapaca expresan PFV_m tal como han descrito Fluiter et al. Cancer Research 62:2024-2028, 2002).

50

Tras dos semanas de crecimiento tumoral, se adaptaron en los ratones subcutáneamente minibombas osmóticas (Alzet 1007D, lote n° 10052-02 (bombas de 7 días) (Durect Corporation, Cupertino, CA)). Estas bombas se llenaron con 3029/3031 o 3030/3031, proporcionando una dosis de 0,5 mg/kg/día. Se trataron los ratones durante 5 días. En el quinto día, se sacrificaron los ratones y se obtuvieron imágenes de la fluorescencia tumoral y se midieron utilizando un analizador de imágenes luminiscentes LAS3000 (Fujifilm). Se cuantificó la fluorescencia utilizando el software AIDA (Raytest GmbH, Straubenhardt, Alemania). Tras la obtención de las imágenes, se extrajeron los tumores y se reservaron para el análisis de las proteínas (transferencia western). Los resultados obtenidos para 15PC3 se muestran en la fig. 18. Tal como puede observarse, los compuestos de ANBip presentaron un efecto significativo sobre el crecimiento tumoral. Se obtuvieron resultados similares con el modelo de xenoinjerto Miapaca.

55

60

Se comprobó el ANBip antes de la implantación y después del experimento (residuo en la bomba) utilizando el análisis MALDI-TOF. Se purificó el ANBip mediante intercambio iónico sobre las placas de purificación del kit de

genotipado Nucleave (Waters, Milford, MA, USA) y se analizaron utilizando espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz y tiempo de vuelo (MALDI-TOF) en un instrumento MALDI Biflex III (Brucker Instruments, Leipzig, Alemania). Se muestran los resultados en la fig. 20.

5

Tabla 1

Nº	Secuencia (5'→3')	Conc. (µM)	Pureza
2184	cuuacgcugaguacuucgaTT	440	~ 30%
2185	MeCuuacgcugaguacuucgaTT	320	~ 70%
2186	ucgaaguacucagcguaagTT	380	~ 65%
2187	TcgaaguacucagcguaagTT	340	~ 60%
2187-phos	Phos-TcgaaguacucagcguaagTT	350	~ 80%
2188	MeCTTcgcTagTactTcgaTT	410	~ 50%
2189	TcgaagTactcagcgTaagTT	390	~ 55%
2189-phos	Phos-TcgaagTactcagcgTaagTT	330	~ 80%
2699-1	uuuuucuccuucucagauTT	400	~ 80%
2700-1	aucugaagaaggagaaaaTT	400	~ 80%
2701-1	TuuuucuccuucucagauTT	360	~ 80%
2702-1	AucugaagaaggagaaaaTT	430	~ 80%
2703-1	MeCTTcgcTgagTactTcgaTT	500	~ 80%

Letras mayúsculas: monómero beta-D-oxi-ANB
 Letras minúsculas: monómero de ARN
 Phos: 5'-fosfato
^{Me}C: 5-metilcitosina

Tabla 2

Nº	Secuencia (5'→3')
2780	MeCTTAMeCGMeCTGAGTAMeCTTMeCGATT
2781	dcTdtAdcGdcTdgAdgTdaMeCdtTdcCdaTT
2782	dcTdtMeCdgdgcTdgdaGtdaMeCdtTdcCdaTT
2783	MeCuuAcGcuGaGuaMeCuuMeCgaTT
2784	MeCduduAdcGdcduGdaGdudaMeCduduMeCdgdTT
2785	uMeCGAAGTAMeCTMeCAGMeCGT AAGTT
2786	uMeCdGAdaGdtAdcTdcAdgMeCdGtDaAdgTT
2787	UMeCdGdaAdgdtAdcTdcAdgMeCdGdtAdagTT
2788	ucGaaGuaMeCucAgcGuAagTT
2789	uMeCgaaguacucagcguaagTT
2790	ucGaaguacucagcguaagTT
2792	ucgaAguacucagcguaagTT
2793	ucgaaGuacucagcguaagTT
2794	ucgaaguAcucagcguaagTT
2795	TgAgAgaai4gcAcAgaAaaTT
2796	TgagagaaaagcacagaaaaTT
2797	TuuucugugcuuucucucaTT

Letras mayúsculas: monómero beta-D-oxi-ANB
 Letras minúsculas sin prefijo: monómero de ARN
 Letras minúsculas con prefijo "d": monómero de ADN
^{Me}C: 5-metilcitosina

Tabla 3

Nº	Secuencia (5'→3')
2842-1	GgaugaggaaggcauuuaTT
2843-1	uaaaauugccuuccucauccTT
2872-1	CugguacgauuucggugauTT
2845-1	aucaccgaaaucguaccagTT
2846-1	AcugucaaacccgguaaauTT
2847-1	aaauaccggguuugacaguTT
2848-1	GacaacuccuauucguaguTT
2849-1	acuacgaauaggaguugucTT
2862-1	UccagaacaaaccaaaccgTT
2863-1	AaacaugcagaaaugcugTT

2864-1	ucgaaguaMeCucagcguagTT
2865-1	ucgaaguacTcagcguagTT
2866-1	ucgaaguacuMeCagcguagTT
2867-1	ucgaaguacucAgcguagTT
2865-U	ucgaaguacAcagcguagTT
3029	GcugaccugaagucaucTT
3030	GMeCTgacMeCcuGaagTTcaucTT
3031	gaugaacuucagggucagcTT
Letras mayúsculas: monómero beta-D-oxi-ANB Letras minúsculas sin prefijo: monómero de ARN ^{Me} C: 5-metilcitosina	

REALIZACIONES

- capaces de interferencia de ARN específica de diana, en las que dicho compuesto de doble cadena
- 5
1. Un compuesto de doble cadena que comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, en el que cada cadena comprende 12 a 35 nucleótidos y en el que dicho compuesto comprende por lo menos un monómero de ácido nucleico bloqueado (ANB).
- 10
2. El compuesto según la realización 1, en el que la cadena sentido comprende por lo menos un monómero de ANB.
3. El compuesto según la realización 2, en el que la cadena sentido comprende por lo menos 1 a 10 monómeros de ANB.
- 15
4. El compuesto según la realización 2 o 3, en el que por lo menos un monómero de ANB se encuentra situado en el extremo 5' de la cadena sentido.
5. El compuesto según la realización 4, en el que por lo menos dos monómeros de ANB se encuentran situados en el extremo 5' de la cadena sentido.
- 20
6. El compuesto según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que por lo menos un monómero de ANB se encuentra situado en el extremo 3' de la cadena sentido.
7. El compuesto según la realización 6, en el que por lo menos dos monómeros de ANB se encuentran situados en el extremo 3' de la cadena sentido.
- 25
8. El compuesto según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la cadena antisentido comprende por lo menos un monómero de ANB.
- 30
9. El compuesto según la realización 8, en el que la cadena antisentido comprende 1 a 10 monómeros de ANB.
10. El compuesto según la realización 8 o 9, en el que por lo menos un monómero de ANB se encuentra situado en el extremo 3' de la cadena antisentido.
- 35
11. El compuesto según la realización 10, en el que por lo menos dos monómeros de ANB se encuentran situados en el extremo 3' de la cadena antisentido.
12. El compuesto según la realización 11, en el que por lo menos tres monómeros de ANB se encuentran situados en el extremo 3' de la cadena antisentido.
- 40
13. El compuesto según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que ningún monómero de ANB se encuentra situado en el extremo 5' de la cadena antisentido.
14. El compuesto según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la cadena sentido comprende por lo menos un ANB y la cadena antisentido comprende por lo menos un monómero de ANB.
- 45
15. El compuesto según la realización 14, en el que la cadena sentido comprende por lo menos 1 a 10 monómeros de ANB y la cadena antisentido comprende 1 a 10 monómeros de ANB.
- 50
16. El compuesto según la realización 14 o 15, en el que la cadena sentido comprende por lo menos un monómero de ANB en el extremo 5' y por lo menos un monómero de ANB en el extremo 3', y en el que la cadena antisentido

- comprende por lo menos un monómero de ANB en el extremo 3'.
- 5 17. El compuesto según la realización 16, en el que la cadena sentido comprende por lo menos un monómero de ANB en el extremo 5' y por lo menos un monómero de ANB en el extremo 3', y en el que la cadena antisentido comprende por lo menos dos monómeros de ANB en el extremo 3'.
- 10 18. El compuesto según la realización 17, en el que la cadena sentido comprende por lo menos dos monómeros de ANB en el extremo 5' y por lo menos dos monómeros de ANB en el extremo 3', y en el que la cadena antisentido comprende por lo menos dos monómeros de ANB en el extremo 3'.
- 15 19. El compuesto según la realización 18, en el que la cadena sentido comprende por lo menos dos monómeros de ANB en el extremo 5' y por lo menos dos monómeros de ANB en el extremo 3', y en el que la cadena antisentido comprende por lo menos tres monómeros de ANB en el extremo 3'.
- 20 20. El compuesto según cualquiera de las realizaciones 14 a 19, en el que ningún monómero de ANB se encuentra situado en el extremo 5' de la cadena antisentido.
21. El compuesto según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la cadena sentido comprende por lo menos un monómero de ANB situado en por lo menos una de las posiciones 9 a 13, contada desde el extremo 5'.
- 25 22. El compuesto según la realización 21, en el que la cadena sentido comprende por lo menos un monómero de ANB en la posición 10.
23. El compuesto según la realización 21 o 22, en el que la cadena sentido comprende por lo menos un monómero de ANB en la posición 11.
24. El compuesto según cualquiera de las realizaciones 21 a 23, en el que la cadena sentido comprende por lo menos un monómero de ANB en la posición 12.
- 30 25. El compuesto según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que cada cadena comprende 17 a 25 nucleótidos.
26. El compuesto según la realización 25, en el que cada cadena comprende 20 a 22 nucleótidos.
- 35 27. El compuesto según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que por lo menos una de las cadenas presenta un extremo 3' protuberante.
28. El compuesto según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que dicho monómero de ANB se selecciona de entre el grupo que consiste de oxi-ANB, amino-ANB y tio-ANB.
- 40 29. El compuesto según la realización 28, en el que dicho monómero de ANB es oxi-ANB.
30. El compuesto según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que dicho monómero de ANB se encuentra en la forma beta-D.
- 45 31. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto según se define en cualquiera de las realizaciones 1 a 30 y un diluyente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 50 32. La composición farmacéutica según la realización 31, en la que dicha composición comprende además por lo menos un agente activo.
33. La composición farmacéutica según la realización 32, en el que dicho agente activo es un agente quimioterapéutico.
- 55 34. La composición farmacéutica según la realización 33, en la que dicho agente quimioterapéutico se selecciona de entre el grupo que consiste de adrenocorticoesteroides, tales como prednisona, dexametasona o decadron, altretamina (hexalén, hexametilmelamina (HMM)), amifostina (etioli), aminoglutetimida (Cytadren), amsacrina (M-AMSA), anastrozol (Arimidex), andrógenos tales como testosterona, asparaginasa (Elspar), Bacillus calmette-Guerin, bicalutamida (Casodex), bleomicina (blenoxano), busulfán (Myleran), carboplatino (paraplatino), carmustina (BCNU, BiCNU), clorambucilo (Leukeran), clorodesoxiadenosina (2-CDA, cladribina, leustatina), cisplatino (platinol), citosina arabinósido (citarabina), dacarbazina (DTIC), dactinomicina (actinomicina D, cosmegen), daunorrubicina (cerubidina), docetaxel (taxotere), doxorubicina (adriomicina), epirubicina, estramustina (Emcyt), estrógenos, tales como dietilestilbestrol (DES), etopósido (VP-16, VePesid, etopofos), fludarabina (fludara), flutamida (eulexina), 5-

- FUDR (floxuridina), 5-fluorouracilo (5-FU), gemcitabina (Gemzar), goserelina (Zodalex), herceptina (trastuzumab), hidroxiaurea (Hydrea), idarrubicina (idamicina), ifosfamida, IL-2 (proleuquina, aldesleuquina), interferón-alfa (intrón A, roferón A), irinotecán (Camptosar), leuprólido (Lupron), levamisol (Ergamisol), lomustina (CCNU), mecloratamina (mustargeno, mostaza nitrogenada), melfalán (Alkeran), mercaptopurina (purinetol, 6-MP), metotrexato (mexato), mitomicina C (mutamucina), mitoxantrona (novantrona), octreótido (sandostatina), pentostatina (2-desoxicoformicina, nipent), plicamicina (mitramicina, mitracina), prorocarbazina (matulano), estreptozocina, tamoxifina (nolvadex), taxol (paclitaxel), tenipósido (vumon, VM-26), tiotepa, topotecán (hycamtin), tretinoína (vesanoide, ácido retinoico todo-trans, vinblastina (valban), vincristina (oncovina) y vinorelbina (navelbina).
- 5
- 10 35. El compuesto según cualquiera de las realizaciones 1 a 30 para la utilización como medicamento.
36. Utilización de un compuesto según cualquiera de las realizaciones 1 a 30 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.
- 15 37. Utilización según la realización 36, en la que dicho cáncer se encuentra en forma de un tumor sólido.
38. Utilización según la realización 36 o 37, en la que dicho cáncer es un carcinoma.
- 20 39. Utilización según la realización 38, en la que dicho carcinoma se selecciona de entre el grupo que consiste de melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma ovárico, carcinoma de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga, cáncer de vejiga superficial recurrente, carcinoma de estómago, carcinoma prostático, carcinoma pancreático, carcinoma pulmonar, carcinoma cervical, displasia cervical, papilomatosis laríngea, carcinoma de colon, carcinoma colorrectal y tumores carcinoides.
- 25 40. Utilización según la realización 39, en la que dicho carcinoma se selecciona de entre el grupo que consiste de melanoma maligno, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de mama, carcinoma de colon y carcinoma de células renales.
- 30 41. Utilización según la realización 40, en la que dicho melanoma maligno se selecciona de entre el grupo que consiste de melanoma de extensión superficial, melanoma nodular, melanoma maligno lentigo, melanoma acral, melanoma amelanótico y melanoma desmoplásico.
42. Utilización según la realización 36 o 37, en la que dicho cáncer es un sarcoma.
- 35 43. Utilización según la realización 42, en la que dicho sarcoma se selecciona de entre el grupo que consiste de osteosarcoma, sarcoma de Ewing, condrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, fibrosarcoma y sarcoma de Kaposi.
44. Utilización según la realización 36 o 37, en la que dicho cáncer es un glioma.
- 40 45. Utilización de un compuesto según se define en cualquiera de las realizaciones 1 a 30 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de arterosclerosis, soriasis, retinopatía diabética, artritis reumatoide, asma, verrugas o dermatitis alérgica.
- 45 46. Utilización de un compuesto según se define en cualquiera de las realizaciones 1 a 30 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer, en el que dicho medicamento comprende además un agente quimioterapéutico seleccionado de entre el grupo que consiste de adrenocorticoesteroides, tales como prednisona, dexametasona o decadron, altretamina (hexalén, hexametilmelamina (HMM)), amifostina (etiol), aminoglutetimida (Cytadren), amsacrina (M-AMSA), anastrozol (Arimidex), andrógenos tales como testosterona, asparaginasa (Elspar), Bacillus calmette-Guerin, bicalutamida (Casodex), bleomicina (blenoxano), busulfán (Myleran), carboplatino (paraplatino), carmustina (BCNU, BiCNU), clorambucilo (Leukeran), clordesoxiadenosina (2-CDA, cladribina, leustatina), cisplatino (platinol), citosina arabinósido (citarabina), dacarbazina (DTIC), dactinomicina (actinomicina D, cosmegen), daunorubicina (cerubidina), docetaxel (taxotere), doxorubicina (adriomicina), epirubicina, estramustina (Emcyt), estrógenos, tales como dietilestilbestrol (DES), etopósido (VP-16, VePesid, etopofos), fludarabina (fludara), flutamida (eulexina), 5-FUDR (floxuridina), 5-fluorouracilo (5-FU), gemcitabina (Gemzar), goserelina (Zodalex), herceptina (trastuzumab), hidroxiaurea (Hydrea), idarrubicina (idamicina), ifosfamida, IL-2 (proleuquina, aldesleuquina), interferón-alfa (intrón A, roferón A), irinotecán (Camptosar), leuprólido (Lupron), levamisol (Ergamisol), lomustina (CCNU), mecloratamina (mustargeno, mostaza nitrogenada), melfalán (Alkeran), mercaptopurina (purinetol, 6-MP), metotrexato (mexato), mitomicina C (mutamucina), mitoxantrona (novantrona), octreótido (sandostatina), pentostatina (2-desoxicoformicina, nipent), plicamicina (mitramicina, mitracina), prorocarbazina (matulano), estreptozocina, tamoxifina (nolvadex), taxol (paclitaxel), tenipósido (vumon, VM-26), tiotepa, topotecán (hycamtin), tretinoína (vesanoide, ácido retinoico todo-trans, vinblastina (valban), vincristina (oncovina) y vinorelbina (navelbina).
- 60

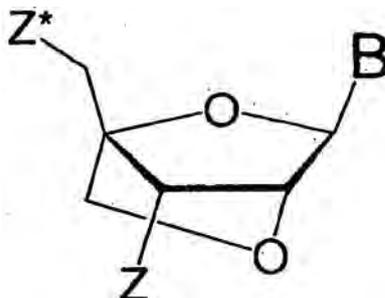
47. La utilización según la realización 46, en la que el agente quimioterapéutico es taxol (Paclitaxel).
48. Utilización de un compuesto según se define en cualquiera de las realizaciones 1 a 30 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer, en el que dicho medicamento comprende además la administración de un agente quimioterapéutico adicional seleccionado de entre el grupo que consiste de adrenocorticoesteroides, tales como prednisona, dexametasona o decadron, altretamina (hexalén, hexametilmelamina (HMM)), amifostina (etiol), aminoglutetimida (Cytadren), amsacrina (M-AMSA), anastrozol (Arimidex), andrógenos tales como testosterona, asparaginasa (Elspar), Bacillus calmette-Guerin, bicalutamida (Casodex), bleomicina (blenoxano), busulfán (Myleran), carboplatino (paraplatino), carmustina (BCNU, BiCNU), clorambucilo (Leukeran), clorodesoxiadenosina (2-CDA, cladribina, leustatina), cisplatino (platinol), citosina arabinósido (citarabina), dacarbazina (DTIC), dactinomicina (actinomicina D, cosmegen), daunorrubicina (cerubidina), docetaxel (taxotere), doxorubicina (adriomicina), epirubicina, estramustina (Emcyt), estrógenos, tales como dietilestilbestrol (DES), etopósido (VP-16, VePesid, etopofos), fludarabina (fludara), flutamida (eulexina), 5-FUDR (floxuridina), 5-fluorouracilo (5-FU), gemcitabina (Gemzar), goserelina (Zodalex), herceptina (trastuzumab), hidroxiiurea (Hydrea), idarrubicina (idamicina), ifosfamida, IL-2 (proleuquina, aldesleuquina), interferón-alfa (intrón A, roferón A), irinotecán (Camptosar), leuprólido (Lupron), levamisol (Ergamisol), lomustina (CCNU), mecloratamina (mustargeno, mostaza nitrogenada), melfalán (Alkeran), mercaptopurina (purinetol, 6-MP), metotrexato (mexato), mitomicina C (mutamucina), mitoxantrona (novantrona), octreótido (sandostatina), pentostatina (2-desoxicoformicina, nipent), plicamicina (mitramicina, mitracina), prorocarbazina (matulano), estrepto-zocina, tamoxífina (nolvadex), taxol (paclitaxel), tenipósido (vumon, VM-26), tiotepa, topotecán (hycamtin), tretinoína (vesanoide, ácido retinoico todo-trans, vinblastina (valban), vincristina (oncovina) y vinorelbina (navelbina).
49. La utilización según la realización 48, en la que el agente quimioterapéutico es taxol (Paclitaxel).
50. El compuesto de la invención para la utilización en un método para el tratamiento del cáncer, comprendiendo dicho método la administración de un compuesto según se define en cualquiera de las realizaciones 1 a 30 o una composición farmacéutica según se define en cualquiera de las realizaciones 31 a 34 en un paciente que necesita del mismo.
51. El compuesto según la realización 50, en el que dicho cáncer se encuentra en forma de un tumor sólido.
52. El compuesto según la realización 50 o 51, en el que dicho cáncer es un carcinoma.
53. El compuesto según la realización 52, en el que dicho carcinoma se selecciona de entre el grupo que consiste de melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma ovárico, carcinoma de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células renales, carcinoma de vejiga, cáncer de vejiga superficial recurrente, carcinoma de estómago, carcinoma prostático, carcinoma pancreático, carcinoma pulmonar, carcinoma cervical, displasia cervical, papilomatosis laríngea, carcinoma de colon, carcinoma colorrectal y tumores carcinoides.
54. El compuesto de la invención para la utilización en un método según la realización 53, en el que dicho carcinoma se selecciona de entre el grupo que consiste de melanoma maligno, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de mama, carcinoma de colon y carcinoma de células renales.
55. El compuesto de la invención para la utilización en un método según la realización 54, en la que dicho melanoma maligno se selecciona de entre el grupo que consiste de melanoma de extensión superficial, melanoma nodular, melanoma maligno lentigo, melanoma acral, melanoma amelanótico y melanoma desmoplásico.
56. El compuesto de la invención para la utilización en un método según la realización 50 o 51, en el que dicho cáncer es un sarcoma.
57. El compuesto de la invención para la utilización en un método según la realización 56, en la que dicho sarcoma se selecciona de entre el grupo que consiste de osteosarcoma, sarcoma de Ewing, condrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, fibrosarcoma y sarcoma de Kaposi.
58. El compuesto de la invención para la utilización en un método según la realización 50 o 51, en el que dicho cáncer es un glioma.
59. El compuesto de la invención para la utilización en un método para el tratamiento del cáncer, comprendiendo dicho método la administración de un compuesto según se define en cualquiera de las realizaciones 1 a 30 o una composición farmacéutica según se define en cualquiera de las realizaciones 31 a 34 en un paciente que lo necesita y que comprende además la administración de un agente quimioterapéutico adicional seleccionado de entre el grupo que consiste de adrenocorticoesteroides, tales como prednisona, dexametasona o decadron, altretamina (hexalén, hexametilmelamina (HMM)), amifostina (etiol), aminoglutetimida (Cytadren), amsacrina (M-AMSA), anastrozol

- 5 (Arimidex), andrógenos tales como testosterona, asparaginasa (Elspar), Bacillus calmette-Guerin, bicalutamida (Casodex), bleomicina (blenoxano), busulfán (Myleran), carboplatino (paraplatino), carmustina (BCNU, BiCNU), clorambucilo (Leukeran), clordesoxiadenosina (2-CDA, cladribina, leustatina), cisplatino (platinol), citosina arabinósido (citarabina), dacarbazina (DTIC), dactinomicina (actinomicina D, cosmegen), daunorrubicina (cerubidina), docetaxel (taxotere), doxorubicina (adriomicina), epirubicina, estramustina (Emcyt), estrógenos, tales como dietilestilbestrol (DES), etopósido (VP-16, VePesid, etopofos), fludarabina (fludara), flutamida (eulexina), 5-FUDR (floxuridina), 5-fluorouracilo (5-FU), gemcitabina (Gemzar), goserelina (Zodalex), herceptina (trastuzumab), hidroxíurea (Hydrea), idarrubicina (idamicina), ifosfamida, IL-2 (proleuquina, aldesleuquina), interferón-alfa (intrón A, roferón A), irinotecán (Camptosar), leuprólido (Lupron), levamisol (Ergamisol), lomustina (CCNU), mecloratamina (mustargeno, mostaza nitrogenada), melfalán (Alkeran), mercaptopurina (purinetol, 6-MP), metotrexato (mexato), mitomicina C (mutamucina), mitoxantrona (novantrona), octreótido (sandostatina), pentostatina (2-desoxicoformicina, nipent), plicamicina (mitramicina, mitracina), prorocarbazina (matulano), estrepto-zocina, tamoxifina (nolvadex), taxol (paclitaxel), tenipósido (vumon, VM-26), tiotepa, topotecán (hycamtin), tretinoína (vesanoide, ácido retinoico todo-trans, vinblastina (valban), vincristina (oncovina) y vinorelbina (navelbina).
- 10
- 15 60. El compuesto de la invención para la utilización en un método según la realización 59, en el que el agente quimioterapéutico es taxol (Paclitaxel).
- 20 61. Utilización de un compuesto según se define en cualquiera de las realizaciones 1 a 30 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del síndrome respiratorio agudo severo (SRAS).
- 25 62. El compuesto de la invención para la utilización en un método para el tratamiento del síndrome respiratorio agudo severo (SRAS), comprendiendo dicho método la administración de un compuesto según se define en cualquiera de las realizaciones 1 a 30 o una composición farmacéutica según se define en cualquiera de las realizaciones 31 a 34 en un paciente que necesita del mismo.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de doble cadena capaz de interferencia de ARN, en el que dicho compuesto de doble cadena comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, en el que cada cadena comprende 12 a 35 nucleótidos y en el que dicho compuesto comprende por lo menos un monómero de ácido nucleico bloqueado (ANB).

2. Compuesto de doble cadena según la reivindicación 1 o 2 que comprende ARN, ADN, análogos de ácido nucleico o una combinación de los mismos, en el que el compuesto comprende por lo menos un monómero de ANB de la fórmula siguiente:



en la que Z y Z* se seleccionan independientemente de entre un enlace internucleósido, un grupo terminal o un grupo protector, y B constituye una nucleobase natural o no natural y se selecciona de entre adenina, citosina, 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, guanina, timina, uracilo, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, 2,6-diaminopurina, 2-cloro-6-aminopurina, 7-propín-7-deaza-adenina, 7-propín-7-deazaguanina, 5-propín-6-fluorouracilo y 5-metilthiazol-uracilo.

3. Compuesto de doble cadena según la reivindicación 1 o 2, en el que se incorpora por lo menos un monómero de ANB en la cadena sentido y se incorpora por lo menos un monómero de ANB en la cadena antisentido.

4. Compuesto de doble cadena según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que por lo menos una cadena presenta un extremo 3' protuberante de 1 a 3 nucleótidos.

5. Compuesto de doble cadena según la reivindicación 4, en el que el monómero o monómeros de ANB se incorporan en por lo menos uno de los extremos 3' protuberantes.

6. Compuesto de doble cadena según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que cada cadena presenta una longitud de entre 17 y 25 nucleótidos.

7. Compuesto de doble cadena según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que cada cadena presenta una longitud de entre 20 y 22 nucleótidos.

8. Compuesto de doble cadena según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que un monómero de ANB se encuentra situado en el extremo 5' de la cadena sentido y en el que ningún monómero de ANB se encuentra situado en el extremo 5' de la cadena antisentido.

9. El compuesto de doble cadena según la reivindicación 8, en el que por lo menos un monómero de ANB se encuentra situado en el extremo 3' de la cadena sentido.

10. Compuesto de doble cadena según la reivindicación 9, en el que un monómero de ANB se encuentra situado en el extremo 3' de la cadena antisentido.

11. Compuesto de doble cadena según la reivindicación 9, en el que un monómero de ANB se encuentra situado en el extremo 3' de la cadena sentido y en el que un monómero de ANB se encuentra situado en el extremo 3' de la cadena antisentido.

12. Compuesto de doble cadena según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que la cadena sentido comprende un monómero de ANB en por lo menos una de las posiciones 9 a 13, contada desde el extremo 5'.

13. Compuesto de doble cadena según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que la cadena sentido comprende un monómero de ANB en la posición 10 o 12 contada desde el extremo 5'.

14. Compuesto de doble cadena según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que la cadena sentido comprende un monómero de ANB en la posición 12 contada desde el extremo 5'.
- 5 15. Compuesto de doble cadena según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la utilización como medicamento o farmacéutico.
16. Compuesto de doble cadena según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la utilización en el tratamiento del cáncer.
- 10 17. Compuesto de doble cadena según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la utilización en la interferencia de ARN.

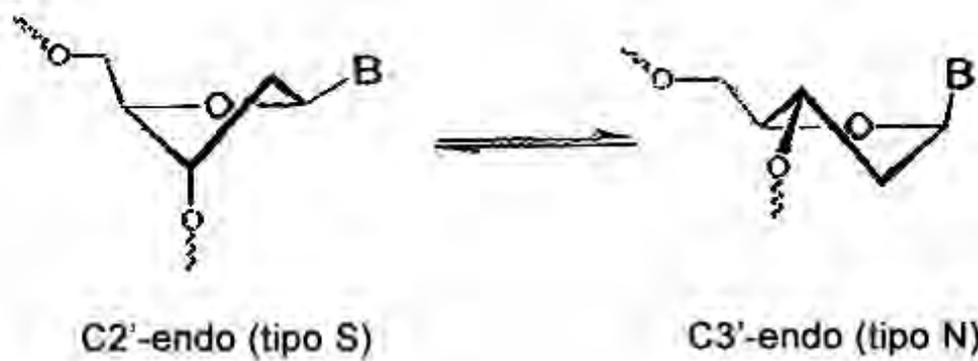


Fig. 1

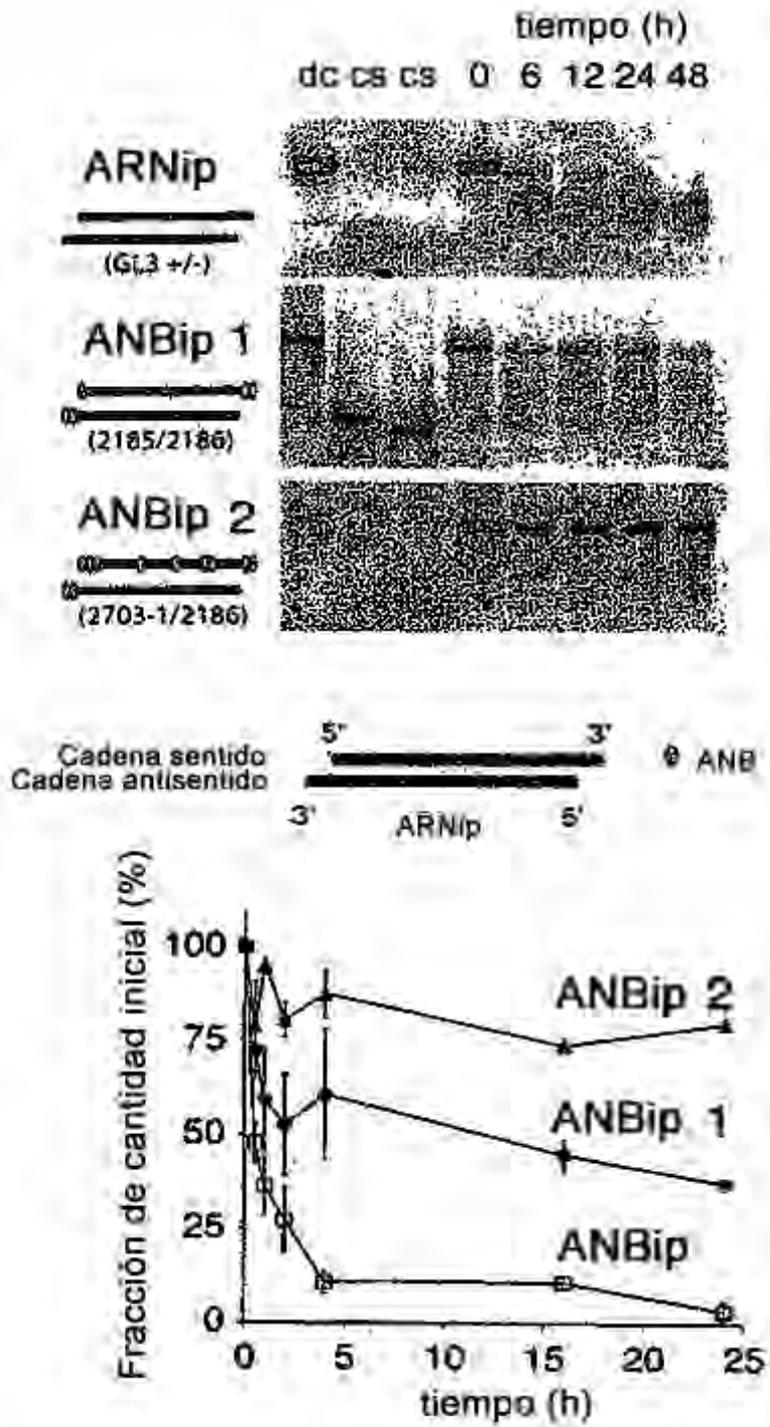


Fig. 2

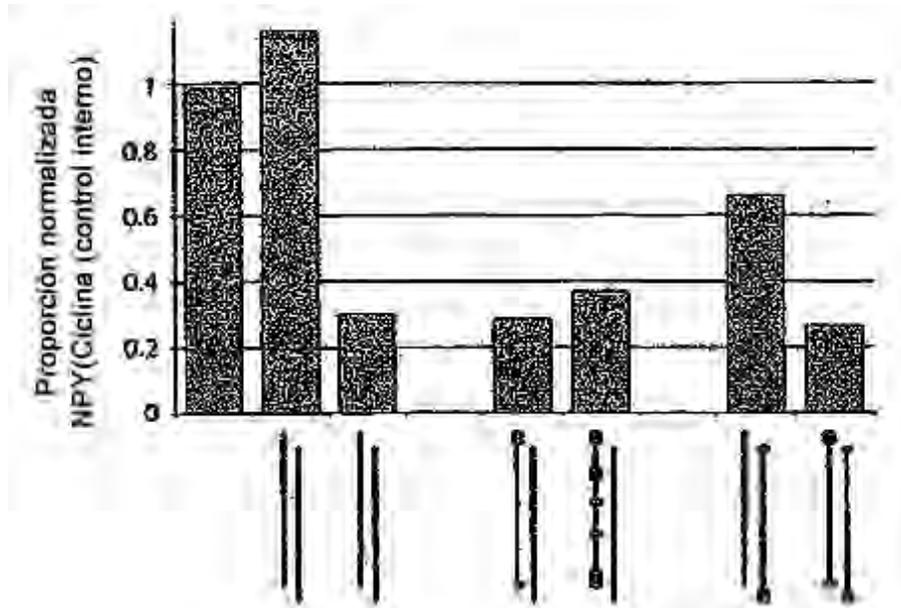


Fig. 3

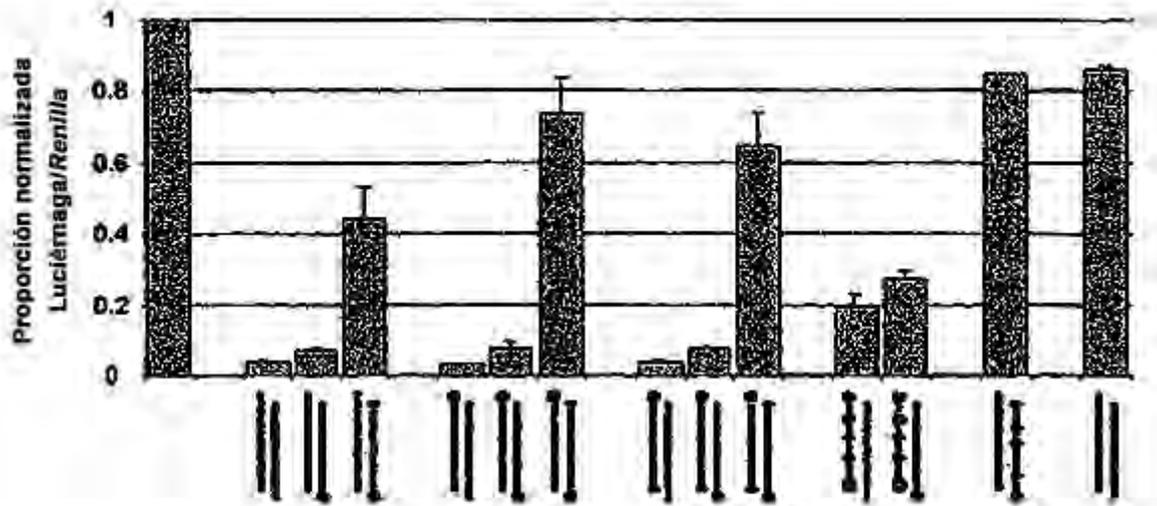


Fig. 4

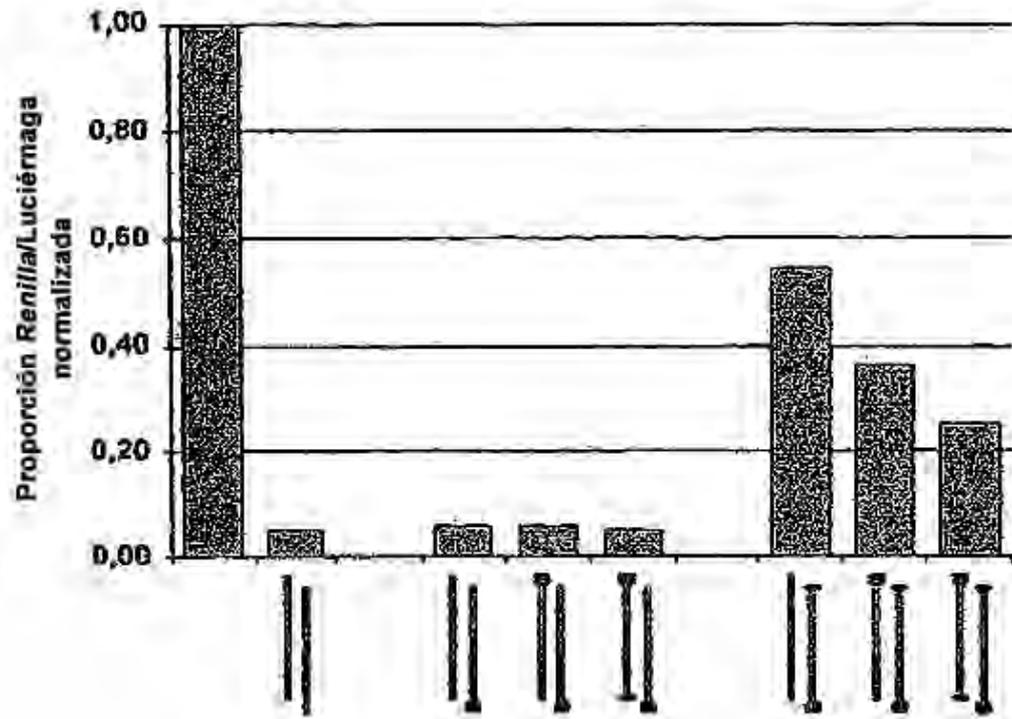


Fig. 5

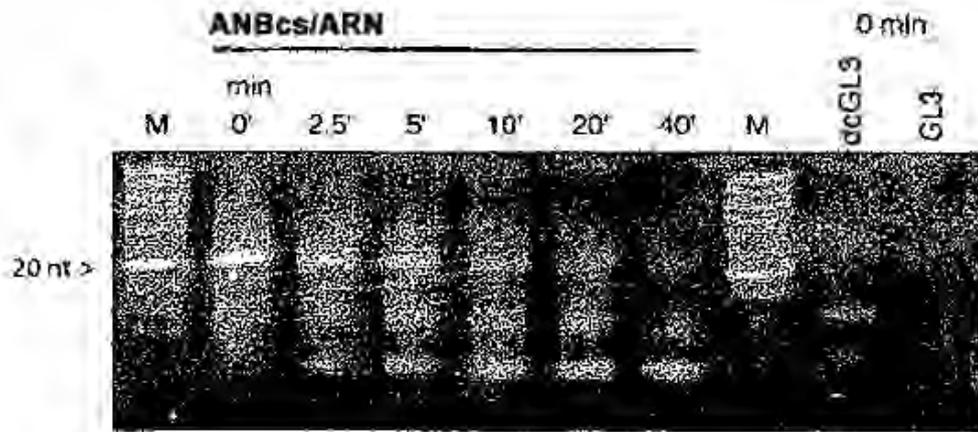
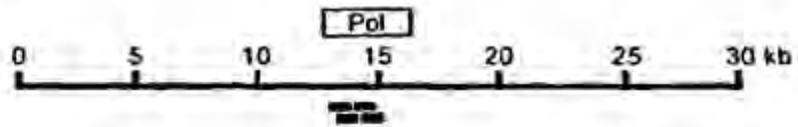


Fig. 6

ARNip/ANBip con diana en SRAS



	Posición Inicial		Posición final
ARNip	ARNip SRAS 1: 13,547	5'-ggaugaggaaggcauuuat t-3' 3'-ttccuacucuccguuuuu-5'	13,567
	ARNip SRAS 2: 14,015	5'-cugguacgauuuuggugaut t-3' 3'-ttgaccaugcuaaaagccacua-5'	14,035
	ARNip SRAS 3: 14,595	5'-acugucaaaaccgguaauut t-3' 3'-ttugacaguuuugggccauuu-5'	14,615
	ARNip SRAS 4: 14,770	5'-gacaacuccuauucguagut t-3' 3'-ttcuguugaggauaagcauca-5'	14,790
ANBip	ANBip SRAS 1: 13,547	5'-GgaugaggaaggcauuuaTT-3' 3'-TTccuacuccuuccguuuuu-5'	13,567
	ANBip SRAS 2: 14,015	5'-CugguacgauuuuggugauTT-3' 3'-TTgaccaugcuaaaagccacua-5'	14,035
	ANBip SRAS 3: 14,595	5'-AcugucaaaaccgguaauuTT-3' 3'-TTugacaguuuugggccauuu-5'	14,615
	ANBip SRAS 4: 14,770	5'-GacaacuccuauucguaguTT-3' 3'-TTcuguugaggauaagcauca-5'	14,790

Fig. 7

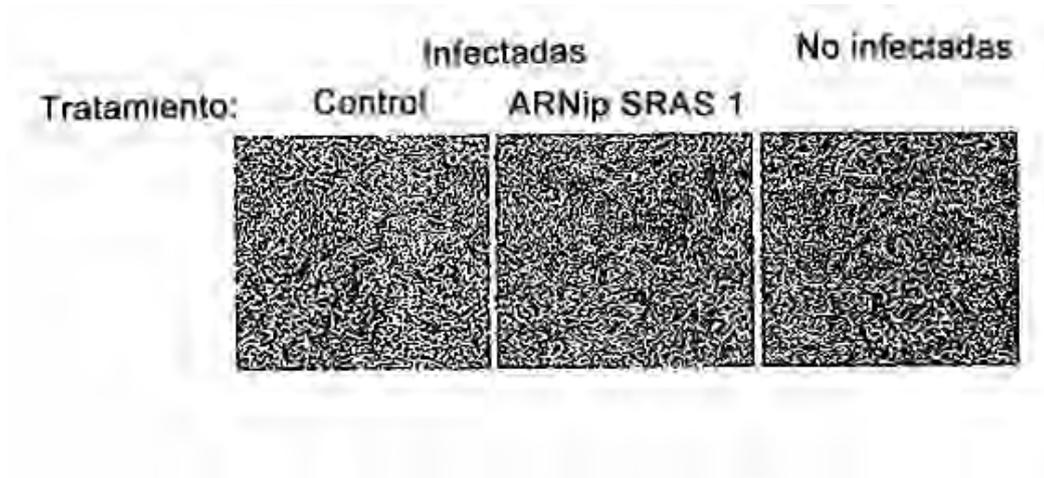


Fig. 8

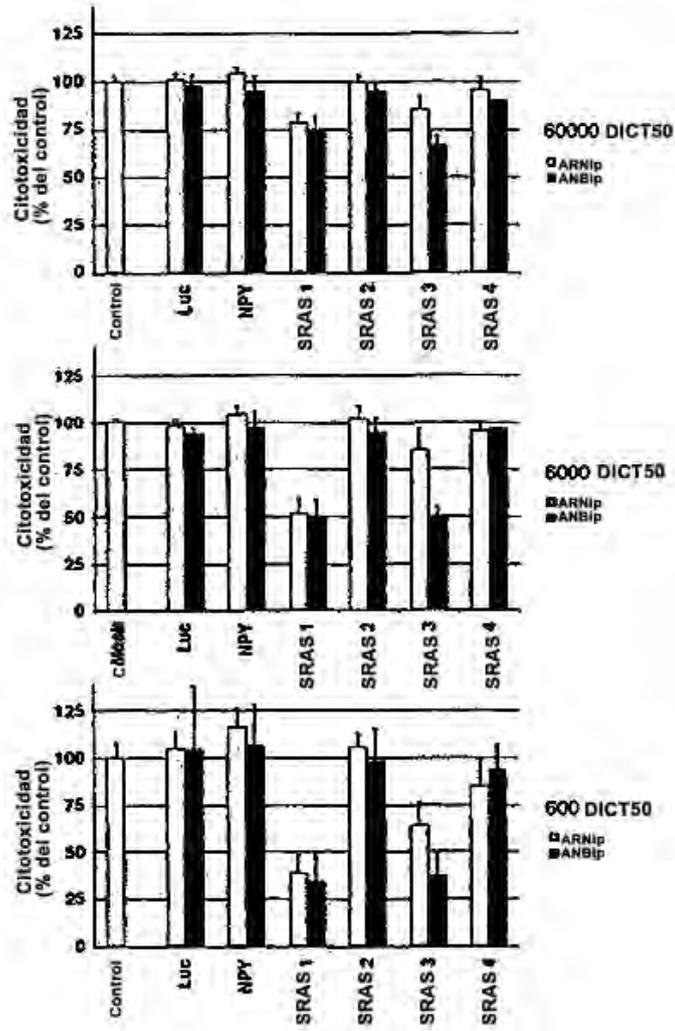


Fig. 9

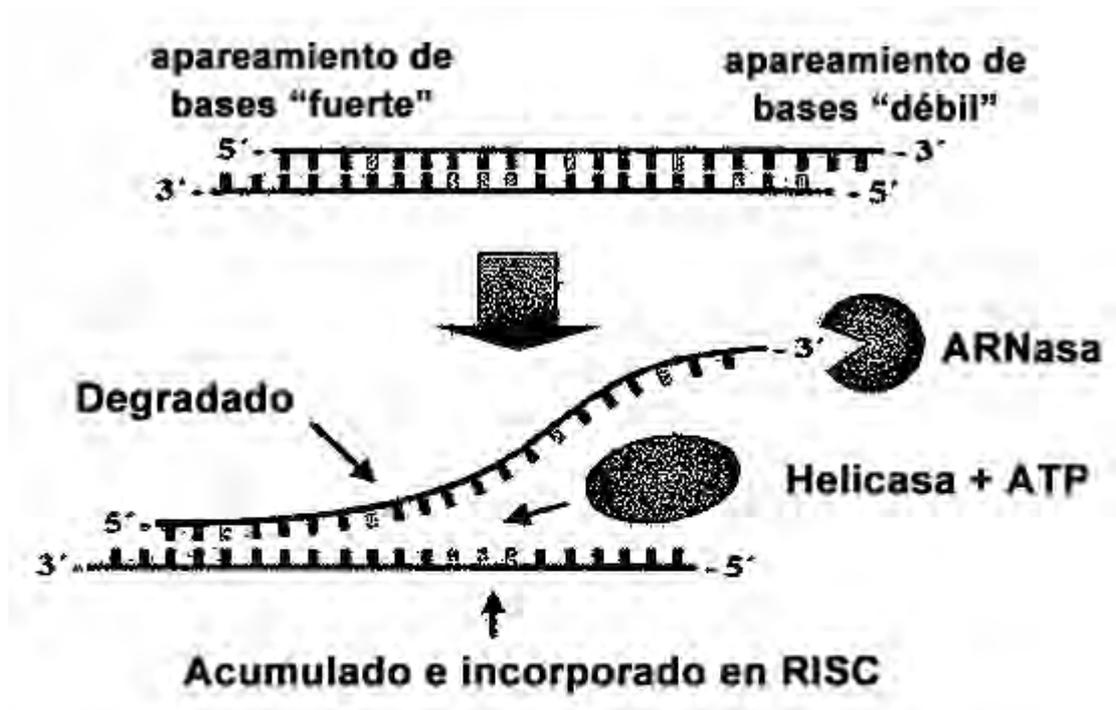


Fig. 10

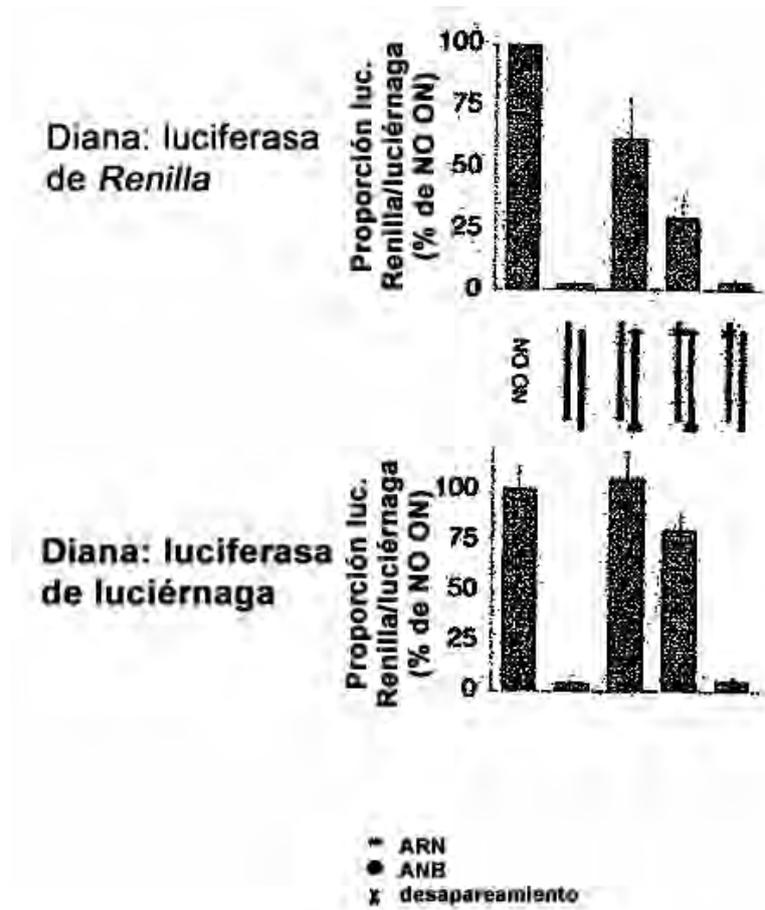


Fig. 11

Paseo de ANB en cadena antisentido de ARNip

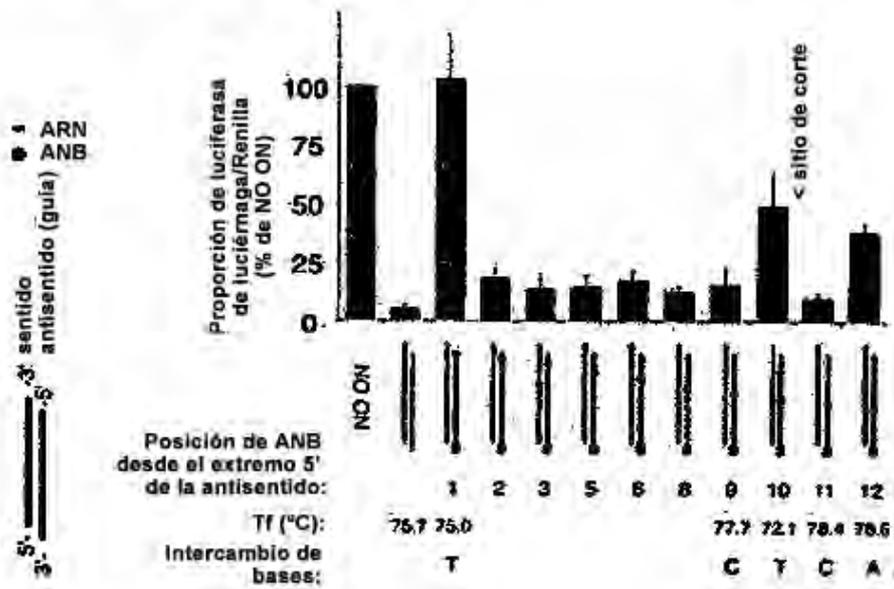


Fig. 12

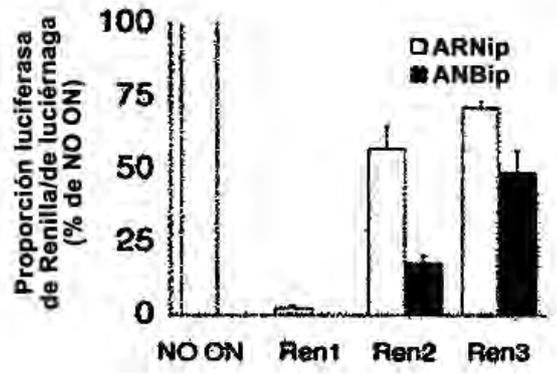
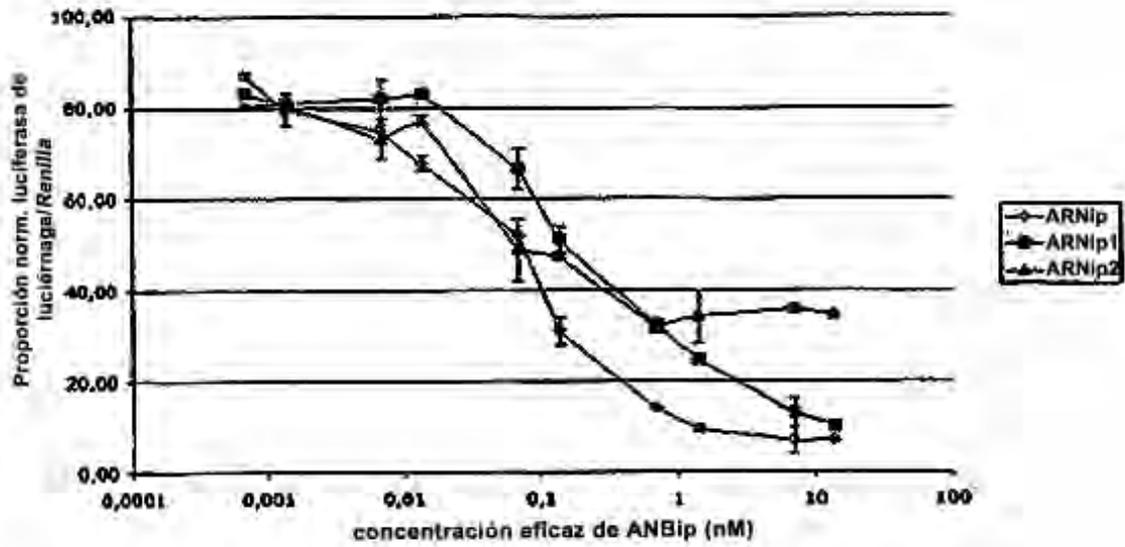


Fig. 13



ARNip: 5' -cuuacgcugaguacuucgatt-3'
3' -ttgaaugcgacucaugaagcu-5'

ANBip1: 5' -CuuacgcugaguacuucgaTT-3'
3' -TTgaaugcgacucaugaagcu-5'

ANBip2 5' -CTTAcgcTgagTAcTTcgaTT-3'
3' -TTgaaugcgacucaugaagcu-5'

Fig. 14

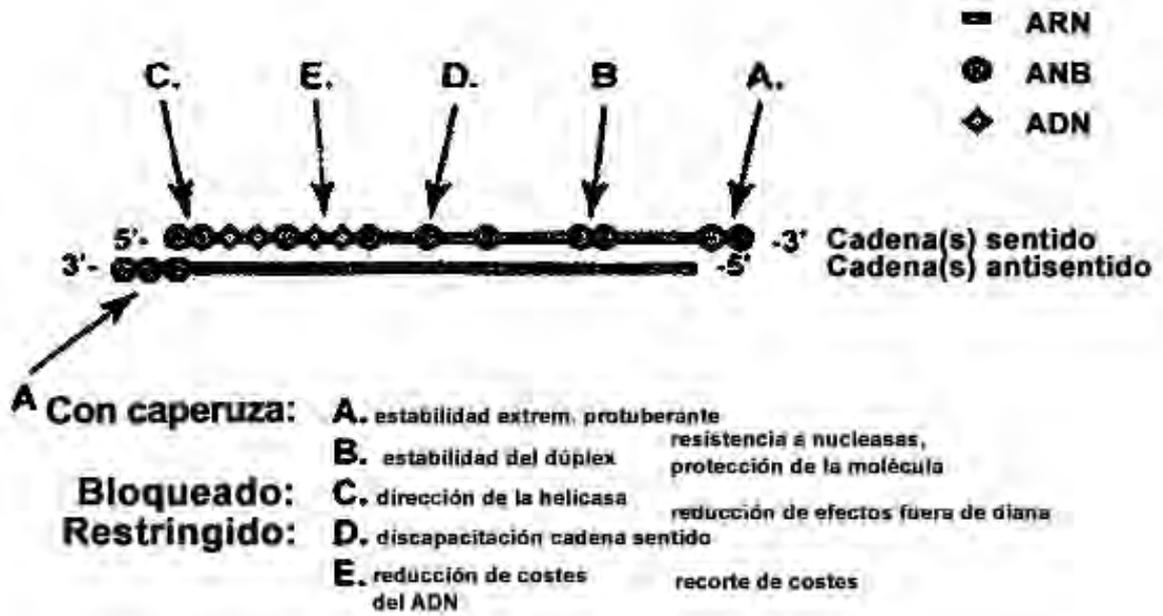


Fig. 15

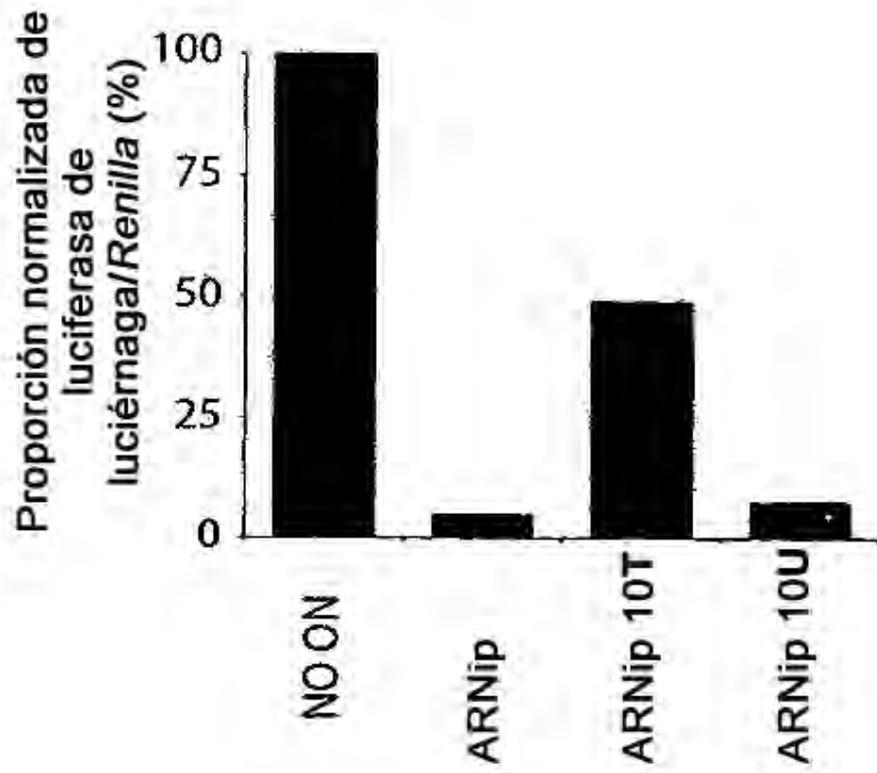


Fig. 16

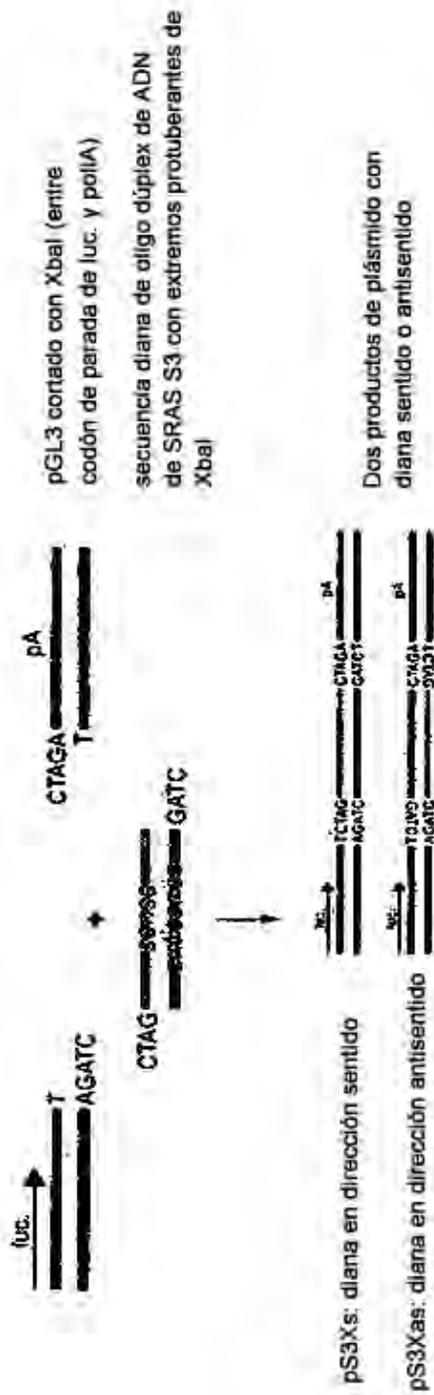
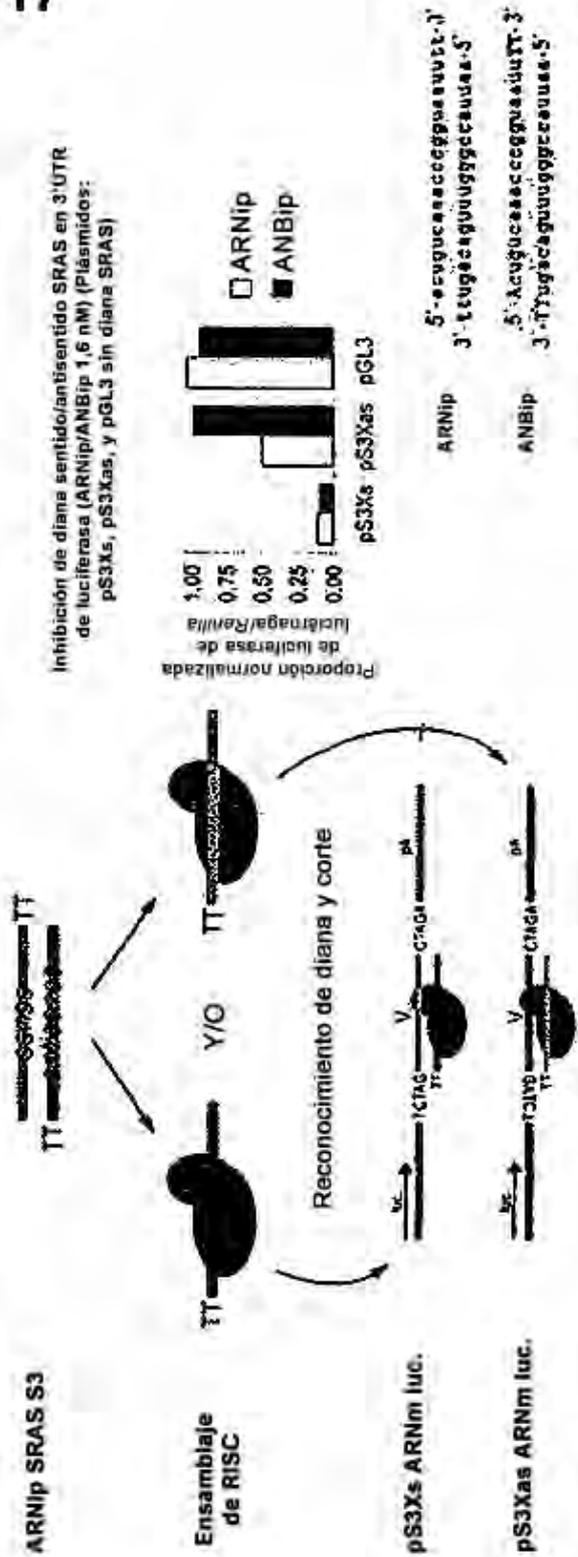
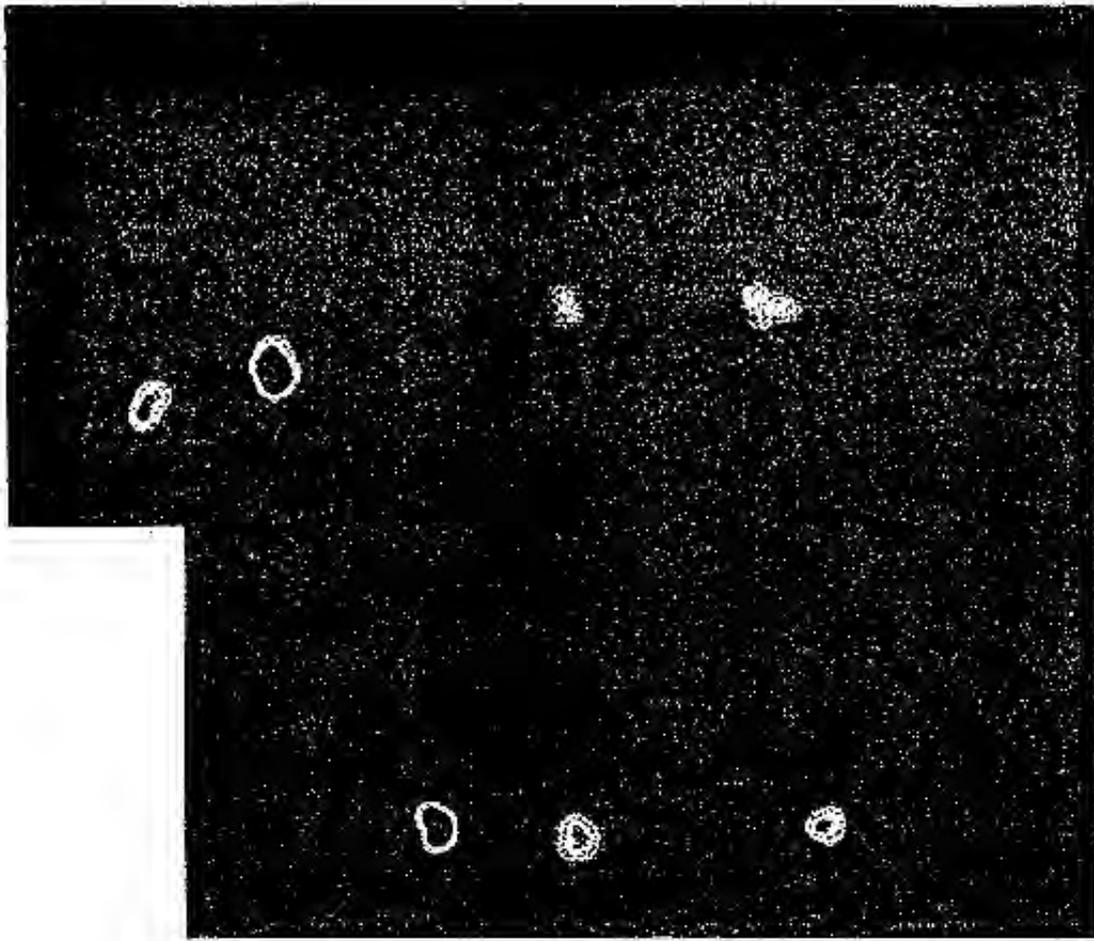


Fig. 17
ensamblaje de ARNip RISC y corte de diana ANBip mantiene el efecto completo de la cadena antisentido pero anula el efecto de la cadena sentido según la cadena incorporada





Fluorescencia de PFVm de xenoinjerto 15PC3

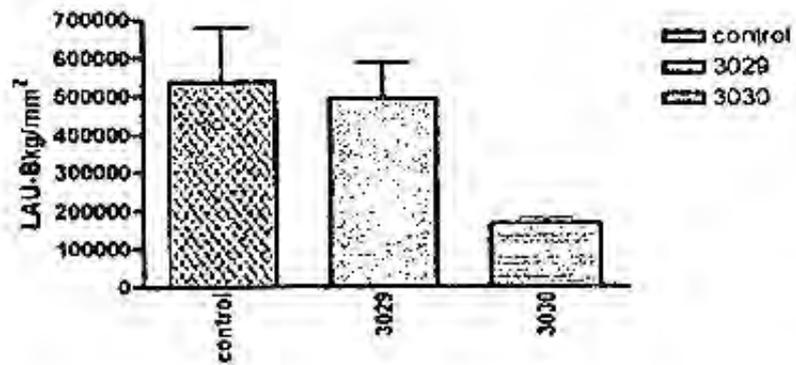


Fig. 18

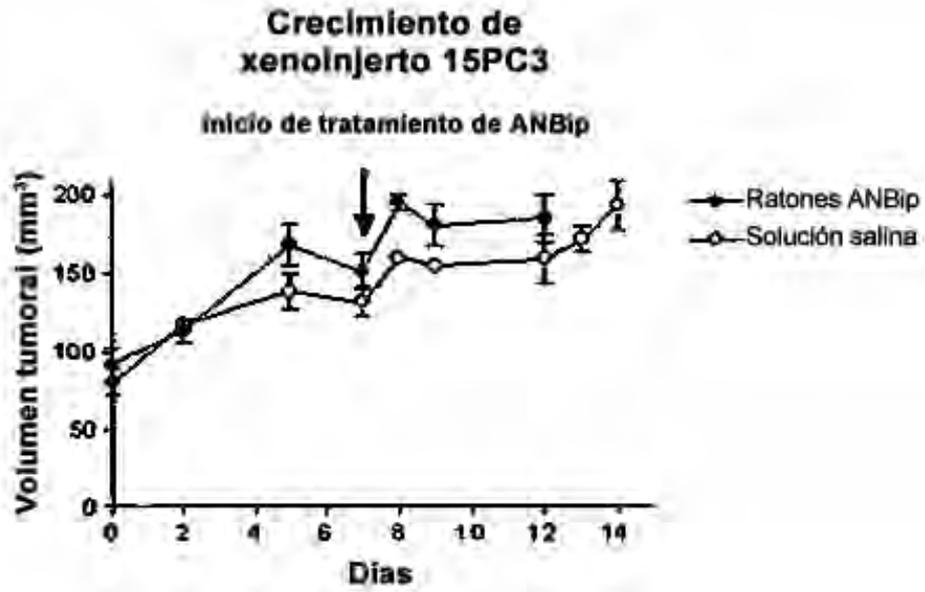


Fig. 19

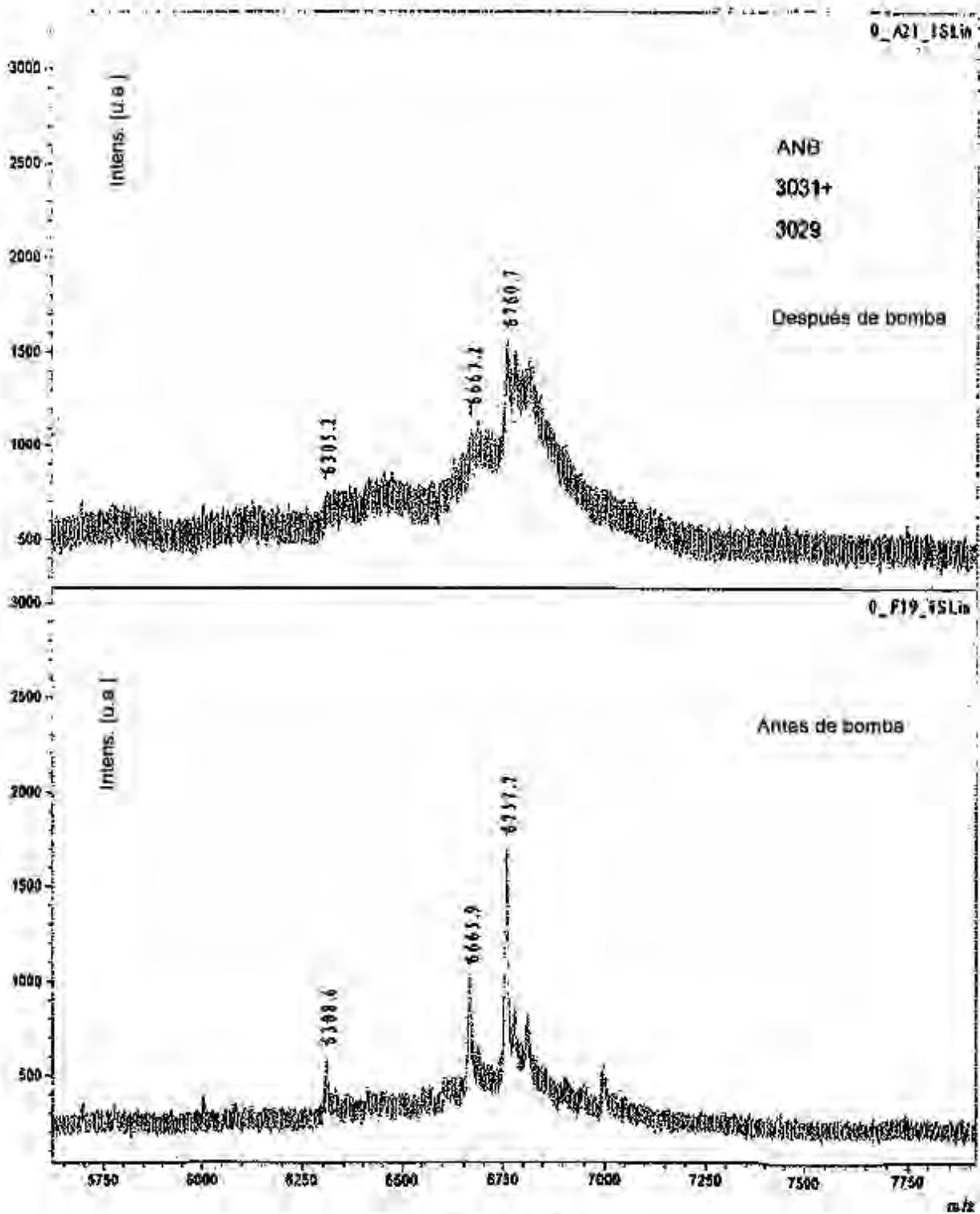


Fig. 20

