(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 605 618**

(51) Int. CI.:

C12N 15/09 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2009 PCT/JP2009/056638**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2009 WO09123185**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2009 E 09729165 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2264167**

(54) Título: **ARN de doble cadena, modificado con lípidos con elevado efecto de interferencia por ARN**

(30) Prioridad:

31.03.2008 JP 2008094154

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.03.2017

(73) Titular/es:

NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (50.0%)
3-1, Kasumigaseki 1-chome, Chiyoda-ku
Tokyo 100-8921, JP y
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)

(72) Inventor/es:

KUBO, TAKANORI;
OHBA, HIDEKI;
TOYOBUKU, HIDEKAZU y
HAYASHI, HIROTAKE

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

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

DESCRIPCIÓN

ARN de doble cadena, modificado con lípidos con elevado efecto de interferencia por ARN

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un ARN de doble cadena, modificado con lípidos, que puede inhibir de manera eficiente la expresión de un gen diana tal como se define en la reivindicación 1. Más específicamente, la presente invención se refiere a un ARN de doble cadena, modificado con lípidos, que tiene una alta resistencia a las nucleasas y alta eficiencia de captación celular, y que puede producir un excelente efecto de interferencia por ARN. La presente invención se refiere, además, a una composición farmacéutica que utiliza el ARN de doble cadena, modificado con lípidos, y a un método para suprimir la expresión de un gen diana utilizando el ARN de doble cadena, modificado con lípidos.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

El desarrollo de medicamentos que puedan tratar eficazmente enfermedades intratables tales como el cáncer y el SIDA es uno de los objetivos más importantes en el campo de las ciencias de la vida. Uno de los métodos que tiene un alto potencial como solución es el uso de medicamentos de genes que actúan sólo en genes específicos. En particular, un método de interferencia por ARN (ARNi) utilizando un ARN de doble cadena corto, de 21 bases de longitud (ARN interferente pequeño: ARNip) ha estado atrayendo la atención recientemente. El método del ARNi fue reseñado por primera vez por Fire et al., en 1998 (véase el Documento No Patente 1). De acuerdo con el método descrito por Fire et al., un ARN de doble cadena, de aproximadamente 100 pares de bases, que es homólogo a una región específica de un gen cuya función es la de ser inhibido se introduce en una célula y se digiere en fragmentos de ARN de doble cadena, de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 pares de bases por la acción de Dicer en el citoplasma. Los fragmentos de ARN se combinan entonces con una pluralidad de proteínas para formar un complejo de ARN/proteína (a este complejo se le alude como un "RISC": complejo de silenciamiento inducido por ARN). Este complejo se une a una región homóloga de ARNm producido a partir del gen diana, suprimiendo de este modo potencialmente la expresión génica. Sin embargo, se informó que cuando ARN de doble cadena de aproximadamente 30 pares de bases o más largo se introduce en células de mamífero, se induce una respuesta de interferón que es una respuesta antiviral, provocando el fenómeno de la apoptosis. Así pues, se considera difícil aplicar el método de ARNi a sistemas de células de mamíferos. A la vista de este problema, Tuschl et al. sintetizaron químicamente un ARN de doble cadena de 21 bases de longitud que tiene extremos que cuelgan en ambos extremos 3' de las cadenas, e informaron que la introducción directa del ARN de doble cadena de 21 bases de longitud en células de mamíferos puede secuenciar de forma específica y potentemente suprimir la expresión de genes, evitando al mismo tiempo una respuesta de interferón (véase el Documento no Patente 2). Tuschl et al. sintetizaron además ARNs de doble cadena cortos en los que la región de doble cadena es de 19 pares de bases y tiene extremos colgantes de longitudes variadas en los extremos 3' o los extremos 5', y se investigaron sus efectos de interferencia por ARN. Los resultados demostraron que ARNip de 21 bases de longitud que tiene extremos colgantes de 2 bases de longitud en ambos extremos 3' produce un muy alto efecto de interferencia por ARN, mientras que ningún otro tipo de ARNs de doble cadena cortos produce un notable efecto de interferencia por ARN. Sobre la base de este informe, el principal método utilizado en la actualidad es un método de interferencia por ARN utilizando un ARN de doble cadena de 21 bases de longitud que tiene extremos colgantes de 2 bases de longitud en ambos extremos 3'. Al método para inhibir la expresión de un gen diana utilizando un ARN de doble cadena, corto, de 21 bases de longitud se le alude en esta memoria como el "método de ARNip", para distinguirlo del método de ARNi.

Debido a que el método de ARNip utiliza ARN sintético, la preparación de la muestra es relativamente sencilla y la manipulación también es sencilla. Además, se pueden producir efectos muy potentes. Por lo tanto, el método de ARNip ha estado atrayendo mucha atención no sólo en el campo de las ciencias de la vida, sino también en el sector empresarial de la biotecnología.

Sin embargo, también existen problemas con este método de ARNip excelente que deben ser resueltos. Tal como se describió anteriormente, el ARNip se compone de moléculas de ARN que son fácilmente digeridas por la acción de nucleasa contenida en las células o en un medio. Aunque la región de ARN de doble cadena tiene una resistencia relativamente alta a la nucleasa en comparación con ARN de cadena sencilla, el ARN de doble cadena

de 19 pares de bases apenas exhibe un efecto de interferencia por ARN a niveles convencionales. Como tal, se ha informado que, si bien el ARNip sintético exhibe un potente efecto supresor sobre la expresión génica de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 días después de la introducción en las células que contienen una secuencia de gen diana, su efecto de interferencia por ARN se reduce bruscamente a partir de entonces, y se pierde casi por completo en aproximadamente 7 días.

Recientemente se han descrito diversos ARNips modificados químicamente con el fin de lograr una alta eficiencia de captación celular y un prolongado efecto de interferencia por ARN, altamente activo, en el ARN sintético. Por ejemplo, se han sintetizado ARNips modificados terminalmente con un grupo amino, un grupo tiol o un sitio abásico para potenciar la resistencia a la digestión por exonucleasa. Sin embargo, se ha informado que la modificación terminal de ARNip de 21 bases de longitud reduce drásticamente el efecto de interferencia por ARN en la mayoría de los casos.

Un reciente informe de J. Rossi et al. reveló que un ARN de doble cadena de 27 pares de bases tiene un efecto de interferencia por ARN que es aproximadamente 100 veces mayor que el de un ARNip de 21 bases de longitud (véase el Documento No Patente 3). Se considera que este potente efecto se conseguirá por la siguiente razón: después de haber escindido un ARN de 27 pares de bases con Dicer, que es una enzima de tipo RNasa III, en un ARNip de 21 bases de longitud, se reconoce el ARNip como es por el complejo de proteína RISC, de modo que los efectos de ARNip se pueden producir con alta eficiencia.

El documento US 2004/0192626 describe ácidos nucleicos interferentes cortos (ANip) que opcionalmente son conjugados derivados de fosfolípidos. El ANip se puede conjugar en los extremos 3', 5' o en ambos extremos 3' ó 5' de la cadena sentido de un ANip de doble cadena y/o el extremo 3' de la cadena antisentido del ANip.

El documento WO 2004/090105 se refiere a polinucleótidos modificados para su uso en la interferencia de ARN. Se proporciona una diversa gama de conjugados e incluye, entre otros, lípidos, esteroides, fosfolípidos, ácidos grasos e hidrocarburos.

El documento WO 2007/056861 describe moléculas de ARNip que fijan como objetivo la expresión de genes del virus de la gripe. En un aspecto el documento describe partículas de ácido nucleicos-lípidos, que comprenden ARNip, un lípido catiónico, un lípido no catiónico y opcionalmente un lípido conjugado.

Dado que ARN de 27 bases de longitud puede producir un excelente efecto de interferencia por ARN tal como se describe anteriormente, las expectativas para su futuro uso como un medicamento génico han ido en aumento. Sin embargo, se desconoce por completo el método técnico que sea útil para potenciar adicionalmente el efecto de interferencia por ARN del ARN de 27 bases de longitud. Además, es también desconocido el método técnico para potenciar el efecto de interferencia por ARN de los ARNs de doble cadena de base de longitudes de bases que no sean de 27 bases.

ARNs de doble cadena que producen un efecto de interferencia por ARN son por lo general estructurados para tener uno o más extremos colgantes en los extremos. También se han investigado los efectos de interferencia por ARN de los ARNs de doble cadena que no tienen un extremo colgante (es decir, de extremos romos). Sin embargo, los resultados sugirieron que los ARNs de doble cadena que son de extremos romos en el lado extremo 5' de la cadena sentido tienen un efecto de interferencia de ARN que es sustancialmente el mismo o menor que el de los ARNs de doble cadena que tienen un extremo colgante en el lado extremo 5' de la cadena sentido (véase el Documento No Patente 4).

Los lípidos tienen una alta afinidad por las membranas celulares y una alta permeabilidad a través de las membranas celulares, y son conocidos por ser útiles para suministrar fármacos a las células. Sería de esperar que la unión de un lípido de este tipo a un ARN de doble cadena que tiene un efecto de interferencia por ARN mejore la eficiencia de la captación celular y aumente el efecto de interferencia por ARN. Sin embargo, se ha sabido que meramente la unión de un lípido a un ARN de doble cadena que tiene un efecto de interferencia por ARN reduce drásticamente el efecto de interferencia por ARN. En la técnica anterior, todavía no se ha construido un ARN modificado con lípido que pueda producir tanto un excelente efecto de interferencia por ARN como un efecto útil basado en el lípido.

Documento No Patente 1: Fire et al., Nature, 391, 806-811 (1998)
Documento No Patente 2: Tuschl et al, EMBO Journal, 20, 6877-6888 (2001)

Documento No Patente 3: J. Rossi et al., Nature Biotech., 23, 222-226 (2005)
Documento No Patente 4: J.T. Marques et al., Nature Biotech, 24, 559-565 (2006).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

PROBLEMA A RESOLVER POR LA INVENCIÓN

Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo ARN de doble cadena que tenga una alta resistencia a las nucleasas y una alta eficiencia de captación celular y que pueda producir un excelente efecto de interferencia por ARN. Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica utilizando el nuevo ARN de doble cadena, y un método para suprimir la expresión de un gen diana utilizando el nuevo ARN de doble cadena.

MEDIOS PARA RESOLVER EL PROBLEMA

Los autores de la presente invención llevaron a cabo una amplia investigación para lograr los objetos anteriores, y encontraron que cuando un lípido, en donde el lípido de doble cadena es fosfatidiletanolamina, se une directamente o a través de un enlazador a al menos uno de los primeros a sextos nucleótidos desde el extremo 5' de una cadena sentido de un ARN de doble cadena que comprende la cadena sentido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia diana en un gen diana, y una cadena antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la cadena sentido, y que puede suprimir la expresión del gen diana, el ARN de doble cadena resultante tiene una alta resistencia a las nucleasas y una alta eficiencia de captación celular, y puede producir un excelente efecto de interferencia por ARN. La presente invención se logró como resultado de la investigación adicional, sobre la base de este hallazgo.

Más específicamente, la presente invención proporciona los siguientes ARNs de doble cadena modificados con lípidos, composiciones farmacéuticas, el uso de los mismos, y un método para suprimir la expresión de un gen diana.

1. Un ARN de doble cadena, modificado con lípidos, que comprende una cadena sentido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia diana en un gen diana, y una cadena antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la cadena sentido, siendo capaz el ARN de doble cadena de suprimir la expresión del gen diana, y teniendo la cadena sentido un lípido de doble cadena unido directamente o a través de un enlazador a al menos uno de los primeros a sextos nucleótidos desde el extremo 5', en donde el lípido de doble cadena es fosfatidiletanolamina.

2. El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de acuerdo con el punto 1, que es de extremos romos en el lado del extremo 5' de la cadena sentido, y es de extremos romos o tiene un extremo colgante en el lado extremo 3' de la cadena sentido.

3. El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de acuerdo con el punto 1, que tiene extremos colgantes en ambos lados extremos 3' y 5’ de la cadena sentido.

4. El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en donde la cadena sentido consiste en 21 a 27 nucleótidos.

5. El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de acuerdo con el punto 2, que es
a) de extremos romos en ambos lados extremos 5' y 3' de la cadena sentido, consistiendo cada una de las cadenas sentido y antisentido en 27 nucleótidos; o
b) de extremos romos en ambos lados extremos 5' y 3' de la cadena sentido, consistiendo cada una de las cadenas sentido y antisentido en 23 nucleótidos; o
c) de extremos romos en el lado extremo 5' de la cadena sentido consistiendo la cadena sentido en 25 bucleótidos y consistiendo la cadena antisentido en 23 nucleótidos.

6. El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de acuerdo con el punto 3, en donde cada una de las cadenas sentido y antisentido consiste en 21 nucleótidos.

7. El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de acuerdo con el punto 1, en donde dos grupos hidrófobos del lípido de doble cadena son iguales o diferentes, y cada uno es un residuo de ácido graso saturado o insaturado que tiene de 6 a 50 átomos de carbono.

8. El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de acuerdo con el punto 1, en donde el lípido de cadena doble es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en dimiristoilfosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidiletanolamina, 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidiletanolamina y dioleoilfosfatidiletanolamina.

9. El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de acuerdo con el punto 1, en donde el lípido está unido a al menos uno del primero a sexto nucleótidos desde el extremo 5' de la cadena sentido mediante un enlazador representado por la fórmula (L-27)
[Quím. 1]

$$-CO-(CH_2)_{n3}-CO-NH-(CH_2)_{n4}- \qquad (L\text{-}27)$$

en donde n3 y n4 son iguales o diferentes, y cada uno representa un número entero de 1 a 20.

10. Una composición farmacéutica, que comprende el ARN de doble cadena, modificado con lípidos de uno cualquiera de los puntos 1 a 9, y un soporte farmacéuticamente aceptable.

11. Uso del ARN de doble cadena, modificado con lípidos de uno cualquiera de los puntos 1 a 9 para producir una composición farmacéutica para suprimir la expresión de un gen diana.

12. El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de uno cualquiera de los puntos 1 a 9 para uso en un método para suprimir la expresión de un gen diana, que comprende una etapa de introducir en una célula el ARN de doble cadena, modificado con lípidos.

EFECTO DE LA INVENCIÓN

El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la presente invención está modificado con un lípido de doble cadena, en donde el lípido de doble cadena es fosfatidiletanolamina, en el lado extremo 5' de la cadena sentido. En base a esta característica estructural, el ARN de doble cadena, modificado con lípidos tiene un efecto significativamente incrementado de interferencia por ARN. En particular, debido a que el ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la presente invención tiene una fosfatidiletanolamina de doble cadena unida a un sitio específico, se proporcionan una resistencia a nucleasas y un efecto de interferencia por ARN notablemente potenciados sin perjudicar el procesamiento de Dicer o la capacidad del ARN para formar un complejo con RISC, contribuyendo así en gran medida en sus aplicaciones medicinales.

El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención tiene una capacidad notablemente alta para ser suministrado intracelularmente, incluso cuando se utiliza solo. Por lo tanto, el ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención se puede introducir en una célula sin el uso de reactivos de transfección génica conocidos, o utilizando un reactivo de transfección génica conocido en una cantidad reducida. Por consiguiente, el ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención puede suprimir el desarrollo de citotoxicidad, que es una preocupación cuando se utilizan reactivos de transfección génica convencionales, asegurando así una alta seguridad en aplicaciones clínicas.

Por lo tanto, cuando se utiliza la composición farmacéutica o el uso en un método para suprimir la expresión de un gen diana que utiliza el ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención, es clínicamente posible suprimir o inhibir más eficazmente la expresión del gen diana.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 muestra los resultados del análisis por HPLC realizado en las cadenas sentido de doble cadena modificadas con lípidos en el Ejemplo 1.

La FIG. 2 muestra los resultados de confirmar la formación de los ARNs de doble cadena de los ARNs de doble cadena modificados con lípidos en el Ejemplo 1;
en la FIG. 2A, la pista (1) representa ARNip de 21 nt, la pista (2) representa el ARN de DPPE L21A/L21B, la pista (3) representa el ARN de POPE L21A / L21B, la pista (4) representa el ARN de DOPE L21A / L21B y la pista (5) representa el ARN de DMPE L21A/L21B; y
en la FIG 2B, la pista (1) representa ARNdc de 27nt, la pista (2) representa el ARN de DPPE L27A/L27B, la pista (3) representa el ARN de POPE L27A/L27B, la pista (4) representa el ARN de DOPE L27A/L27B y la pista (5) representa el ARN de DMPE L27A/L27B.
La FIG. 3 muestra los resultados de la investigación de la resistencia a las nucleasas de los ARN de doble cadena modificado con lípido en el Ejemplo 1.
La FIG. 4 muestra los resultados de la investigación de procesamiento con Dicer de los ARNs de doble cadena, modificado con lípidos en el Ejemplo 1.
La FIG. 5 muestra los resultados de la investigación de los efectos de interferencia por ARN de los ARNdcs de 27nt de doble cadena modificados con lípidos a una concentración de 2 nM en el Ejemplo 1.
La FIG. 6 muestra los resultados del análisis por HPLC realizado en las cadenas sentido de doble cadena modificadas con lípidos en el Ejemplo 2.
La FIG. 7 muestra los resultados de confirmar la formación de las dobles cadenas de los ARNs de doble cadena modificados con lípidos en el Ejemplo 2;
en la FIG. 7A, las pistas (1) y (2) de A-1 representan el ARNip de 21nt y el ARN de DPPE v21A/v21B, respectivamente; y las pistas (1), (2), (3) y (4) de A-2 representan el ARNip de 21nt, el ARN de POPE v27A/v27B, el ARN de DOPE v27A/v27B y el ARN de DMPE v27A/v27B, respectivamente; y
en la FIG. 7B, las pistas (1), (2), (3), (4) y (5) representan ARNdc de 27nt, el ARN de DPPE v27A/v27B, el ARN de POPE v27A/v27B, el ARN de DOPE v27A/v27B y el ARN de DMPE v27A/v27B, respectivamente.
La FIG. 8 muestra los resultados de la investigación de la resistencia a las nucleasas de los ARNs de doble cadena, modificado con lípidos en el Ejemplo 2.
La FIG. 9 muestra los resultados de la investigación del procesamiento con Dicer de los ARNs de doble cadena modificados con lípidos en el Ejemplo 2.
La FIG. 10 muestra los resultados de la investigación de los efectos de interferencia por ARN de los ARN de doble cadena de lípidos modificados en el gen VEGF en células HeLa y células A549 en el Ejemplo 2.
La FIG. 11-1 muestra los resultados de la investigación de las eficiencias de absorción celular de los ARNs de doble cadena modificados con lípidos dirigidos al gen VEGF en células HeLa;
en donde "FL" designa las imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia; "Trans" designa las imágenes tomadas con un microscopio de contraste de fase en el mismo campo de visión que el de las imágenes FL; y "Combinar" designa las imágenes obtenidas por superposición de las imágenes FL y Trans.
La FIG. 11-2 muestra los resultados de la investigación de las eficiencias de absorción celular de los ARNs de doble cadena modificados con lípidos dirigidos al gen VEGF en células A549;
en donde "FL" designa las imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia; "Trans" designa las imágenes tomadas con un microscopio de contraste de fase en el mismo campo de visión que el de las imágenes FL; y "Combinar" designa las imágenes obtenidas por superposición de las imágenes FL y Trans.
La FIG. 12 muestra los resultados del análisis por HPLC realizado en el ARN de doble cadena, modificado con lípidos en el Ejemplo 3.
La FIG. 13 muestra los resultados de confirmar la síntesis del ARN de doble cadena, modificado con lípidos en el Ejemplo 3.

MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

En esta memoria descriptiva, "extremo romo" o "de extremos romos" se refiere a una estructura terminal de ARN de doble cadena en la que las bases en la región terminal de la cadena sentido y bases en la región terminal de la cadena antisentido complementaria a la cadena sentido se emparejan sin formar una porción de una sola cadena (es decir, sin formar una proyección). El "extremo colgante" también se llama un "colgante". Este término se refiere a una estructura de secuencia de nucleótidos terminal (una proyección) en la que está presente una cadena sencilla sin formar una cadena doble, ya que las bases complementarias no están presentes en la región terminal de una cadena sentido de un ARN de doble cadena o en la región terminal de una cadena antisentido complementaria a la cadena sentido. En la presente memoria descriptiva, el "ARN modificado con lípidos de doble cadena " se refiere a moléculas de ARN de doble cadena que tienen un lípido de doble cadena unido a la misma, y se utilizan indistintamente con "ARN de doble cadena, modificado con lípidos" en esta memoria.

El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención comprende una cadena sentido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia diana en un gen diana.

Gen diana, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un gen cuya expresión está suprimida por el efecto de interferencia por ARN. En el ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención, el gen diana no está particularmente limitado, y puede seleccionarse adecuadamente de acuerdo con el uso pretendido del ARN de doble cadena, modificado con lípidos.

La secuencia diana del gen diana no está particularmente limitada, en la medida en que la expresión del gen puede ser suprimida por el efecto de interferencia por ARN. La secuencia diana se puede determinar adecuadamente de acuerdo con un método conocido, por ejemplo, mediante el uso de una búsqueda NCBI BLAST, etc. Por ejemplo, la secuencia diana puede ser una región que consiste en 19 a 30 bases siguientes a las bases "AA" en la región del exón que está 50 a 100 bases aguas abajo del codón de inicio de la región codificante (ORF) del gen diana, y que tiene un contenido de GC de aproximadamente 50%. Empíricamente se conoce en este campo técnico que un excelente efecto de interferencia por ARN se puede producir mediante el uso de una cadena complementaria a una secuencia diana de este tipo. La secuencia diana también puede determinarse, por ejemplo, de acuerdo con las instrucciones del IDT (Integrated DNA Technologies, Inc.; Diseño de ARNi del Sustrato Dicer). Además, un informe reciente reveló que se puede producir un ARN de doble cadena que tiene un elevado efecto de interferencia por ARN diseñando un ARN de doble cadena que satisface las siguientes características estructurales: (i) que tiene un par A/U en el extremo 5' de la cadena antisentido, (ii) que tiene un par G/C en el extremo 5' de la cadena sentido, y (iii) que tiene aproximadamente cinco pares A/U presentes en la región del extremo 5' de la cadena antisentido;(iv) y el ARN de doble cadena que no tiene nueve o más pares G/C (Ui-Tei et al., Nucleic Acids Res., 32, 936-948 (2004)).

Cuando el ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención no tiene extremo colgante en la cadena sentido, la cadena sentido consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia diana. Cuando un extremo colgante está presente en el extremo 5’ y/o el extremo 3' de la cadena sentido, la cadena sentido consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia diana, y una secuencia de nucleótidos en el extremo colgante que está fijada al extremo 5’ y/o al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos complementaria.

En la medida en que se pueda producir el efecto de interferencia por ARN, el número de nucleótidos que constituyen la cadena sentido del ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención no está particularmente limitado, y puede seleccionarse adecuadamente de acuerdo con la estructura deseada del ARN de doble cadena, modificado con lípidos, etc. El número de nucleótidos es típicamente de 21 a 27, preferiblemente 21, 23, 25 ó 27, y más preferiblemente 21 ó 27. Cuando no está presente extremo colgante alguno en la cadena sentido, el número de nucleótidos que constituyen la cadena sentido, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere al número total de nucleótidos que constituyen la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia diana. Cuando un extremo colgante está presente en la cadena sentido, el número de nucleótidos que constituyen la cadena sentido se refiere a la suma del número de nucleótidos que constituye el extremo colgante, y el número de nucleótidos que constituye la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia diana.

El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención comprende una cadena antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la cadena sentido.

Cuando el ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención no tiene un extremo colgante en la cadena antisentido, la cadena antisentido consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una parte o la totalidad de la "secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia diana" de la cadena sentido. Cuando un extremo colgante está presente en el extremo 5' y/o en el extremo 3' de la cadena antisentido, la cadena antisentido consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una parte o a la totalidad de la "secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia diana" de la cadena sentido, y una secuencia de nucleótidos enlazada al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos complementaria de la cadena sentido.

En la medida en la que se pueda producir el efecto de interferencia por ARN, el número de nucleótidos que constituyen la cadena antisentido en el ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención no está particularmente limitado, y puede seleccionarse adecuadamente de acuerdo con la estructura deseada del ARN de doble cadena, etc. El número de los nucleótidos es típicamente sw 21 a 27, preferiblemente 21, 23, 25 ó 27, y más preferiblemente 21, 23 ó 27. Cuando no está presente extremo colgante alguno en la cadena antisentido, el número

de nucleótidos que constituyen la cadena antisentido, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere al número total de nucleótidos que constituyen la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la secuencia diana. Cuando un extremo colgante está presente en la cadena antisentido, el número de nucleótidos que constituyen la cadena antisentido se refiere a la suma del número de nucleótidos que constituye el extremo colgante, y el número de nucleótidos que constituyen la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la secuencia diana.

Los nucleótidos que constituyen la cadena sentido y la cadena antisentido del ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención son principalmente ribonucleótidos. Para potenciar la resistencia a la digestión enzimática, la secuencia de ARN puede incluir, además, diversos nucleótidos químicamente modificados tales como nucleótidos 2'-O-metil-modificados, nucleótidos 2'-F-modificados, nucleótidos de LNA (ácido nucleico bloqueado) o desoxirribonucleótidos. En particular, cuando el ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención tiene un extremo colgante, el extremo colgante de la cadena sentido y/o la cadena antisentido puede estar compuesto por desoxirribonucleótidos. Ejemplos de tales nucleótidos modificados químicamente incluyen nucleótidos de cadena principal modificada con fosfato tales como ADN/ARN modificado con fosforotioato y ADN/ARN modificado con boranofosfato; nucleótidos 2'-modificados tales como ARN 2'-0Me-modificado y ARN 2'-F-modificado; nucleótidos modificados obtenidos por reticulación de la molécula de azúcar de un nucleótido tal como LNA (ácido nucleico bloqueado) y ENA (los ácidos nucleicos 2'-O,4'-C-etileno-puenteados); nucleótidos modificados que tienen diferentes cadenas principales tales como PNA (ácido nucleico peptídico) y morfolina-nucleótido; nucleótidos modificados con bases tales como 5-fluorouridina y 5-propiluridina; y similares.

La estructura del ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención no está particularmente limitada, en la medida en que la cadena sentido y antisentido se hibriden en una cadena doble. Por ejemplo, son preferibles las siguientes estructuras: estructura (A) en la que el ARN de doble cadena es de extremos romos (es decir, tiene un extremo romo) en el lado del extremo 5' de la cadena sentido, y es de extremos romos o tiene un extremo colgante (una región de cadena sencilla o una proyección) en el lado extremo 3' de la cadena sentido; y la estructura (B), en la que el ARN de doble cadena tiene extremos colgantes en los dos lados extremos 5' y 3' de la cadena sentido. Basado en la estructura anterior (A) o (B), el ARN de doble cadena, modificado con lípidos puede mantener su efecto de interferencia por ARN, aunque modificado con un lípido de doble cadena, y también una eficiencia de absorción celular acusadamente potenciada. La estructura de "que tiene un extremo colgante en el lado extremo 3' de la cadena sentido", tal como se utiliza en esta memoria, incluye ambos de los siguientes casos: el caso en el que la región del extremo 3' de la cadena sentido forma un extremo colgante; y el caso en el que la región del extremo 5' de la cadena antisentido forma un extremo colgante. La estructura de "que tiene un extremo colgante en el lado del extremo 5' de la cadena sentido", tal como se utiliza en esta memoria, incluye ambos de los siguientes casos: el caso en el que la región del extremo 5' de la cadena sentido forma un extremo colgante; y el caso en el que la región del extremo 3' de la cadena antisentido forma un extremo colgante

Para proporcionar un efecto particularmente excelente de interferencia por ARN, por ejemplo, son particularmente preferibles las siguientes estructuras del ARN de doble cadena del ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención entre las estructuras (A) y (B) anteriores: estructura (A-1), en la que el ARN de doble cadena es de extremos romos en los dos lados extremos 5' y 3' de la cadena sentido, y cada una de las cadenas sentido y antisentido consiste en 27 nucleótidos; estructura (A-2), en la que el ARN de doble cadena es de extremos romos en los dos lados extremos 5' y 3' de la cadena sentido, y cada una de las cadenas sentido y antisentido consiste en 23 nucleótidos; estructura (A-3), en la que el ARN de doble cadena es de extremos romos en el lado extremo 5' de la cadena sentido, y la cadena sentido consiste en 25 nucleótidos y la cadena antisentido consiste en 23 nucleótidos; y estructura (B-1), en la que el ARN de doble cadena tiene extremos colgantes de dos nucleótidos en los dos extremos 31 de las cadenas sentido y antisentido, y cada una de las cadenas sentido y antisentido consiste en 21 nucleótidos.

Más específicamente, en las estructuras (A-1) y (A-2), las cadenas sentido y antisentido se hibridan sin formar extremo colgante alguno en los extremos. En la estructura (A-3), las cadenas sentido y antisentido se hibridan de tal manera que el ARN de doble cadena es de extremos romos en el lado extremo 5' de la cadena sentido, y el primer y segundo nucleótidos del extremo 3' de la cadena sentido forman un extremo colgante. En la estructura (B-1), el primero al 19º nucleótido desde el extremo 5' de la cadena sentido y el tercero al 21º nucleótido desde el extremo 3' de la cadena antisentido se hibridan de tal manera que el primer y segundo nucleótidos desde el extremo 3' de la cadena codificante forman un extremo colgante, y el primer y segundo nucleótidos desde el extremo 3' de la cadena antisentido forman un extremo colgante.

De acuerdo con el ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención, un lípido está unido a al menos uno del primer a sexto nucleótidos desde el extremo 5' de la cadena sentido. El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención no tiene sustituyentes unidos a cualquier posición distinta de la región extrema 5' de la cadena sentido. Más específicamente, ninguna parte de la cadena de sentido diferente de la región del extremo 5' y la cadena antisentido tienen sustituyentes, y estas porciones solamente consisten en nucleótidos. La unión de un lípido sólo a la región del extremo 5' de la cadena sentido potencia la eficiencia de la absorción celular y también puede aumentar notablemente el efecto de interferencia por ARN. Más específicamente, en el ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la presente invención, una estructura de ARN de doble cadena, el uso de un lípido de doble cadena para modificar el ARN de doble cadena, y el sitio de unión del lípido de doble cadena son características estructurales que están inseparablemente relacionadas. Sobre la base de estas características estructurales, el ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención tiene una excelente eficiencia de la absorción celular y resistencia a nucleasa, y puede producir un efecto notablemente potenciado de interferencia por ARN.

En el ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención, el lípido de doble cadena unido a la cadena sentido es fosfatidiletanolamina tal como dilauroilfosfatidiletanolamina, dimiristoilfosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidiletanolamina, diestearoilfosfatidiletanolamina, dioleoilfosfatidiletanolamina, 1-palmitoil-2-oleilfosfatidiletanolamina, 1-oleil-2-palmitoilfosfatidiletanolamina y dierucoilfosfatidiletanolamina. Para proporcionar una resistencia a nucleasas más notable, la eficiencia de la absorción celular y un efecto más notable interferencia por ARN, se utilizan fosfatidiletanolaminas. Más preferiblemente, se pueden utilizar dimiristoilfosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidiletanolamina, 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidiletanolamina y dioleoilfosfatidiletanolamina.

La manera de unir el lípido de doble cadena a la cadena sentido en el ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención no está particularmente limitada. El lípido y la cadena sentido pueden estar unidos directamente o a través de un enlazador (una región de enlace). El enlazador utilizado para unir el lípido a la cadena sentido no comprende un ácido nucleico.

El enlazador que se puede utilizar no está particularmente limitado, en la medida en que el lípido y la cadena sentido están vinculados a través del mismo. Ejemplos de enlazadores utilizables incluyen los de las siguientes estructuras:
[Quím. 2]

-O-CO-O-	(L-1)
-NH-CO-O-	(L-2)
-NH-CO-NH-	(L-3)
-NH- $(CH_2)_{n1}$-	(L-4)
-S-$(CH_2)_{n1}$-	(L-5)
-CO-$(CH_2)_{n1}$-CO-	(L-6)
-CO-$(CH_2)_{n1}$-NH-	(L-7)
-NH -$(CH_2)_{n1}$-NH-	(L-8)
-CO-NH-$(CH_2)_{n1}$-NH-CO-	(L-9)
-C(=S)-NH-$(CH_2)_{n1}$-NH-CO-	(L-10)
-C(=S)-NH-$(CH_2)_{n1}$-NH-C-(=S)-	(L-11)
-CO-O-$(CH_2)_{n1}$-O-CO-	(L-12)
-C(=S)-O-$(CH_2)_{n1}$-O-CO-	(L-13)
-C(=S)-O-$(CH_2)_{n1}$-OC-(=S)-	(L-14)
-CO-NH-$(CH_2)_{n1}$-O-CO-	(L-15)
-C(=S)-NH-$(CH_2)_{n1}$-O-CO-	(L- 16)
-C(=S)-NH-$(CH_2)_{n1}$-OC-(=S)-	(L-17)
-CO-NH-$(CH_2)_{n1}$-O-CO-	(L-18)
-C =S)-NH-$(CH_2)_{n1}$-CO-	(L-19)
-C(=S)-O-$(CH_2)_{n1}$-NH-CO-	(L-20)
-C(=S)-NH-$(CH_2)_{n1}$-OC-(=S)-	(L-21)
-NH-$(CH_2CH_2O)_{n2}$-CH(CH_2OH)-	(L-22)
-NH-$(CH_2CH_2O)_{n2}$-CH_2-	(L-23)
-NH-$(CH_2CH_2O)_{n2}$-CH_2-CO-	(L-24)
-O-$(CH_2)_{n3}$-S-S-$(CH_2)_{n4}$-OP(= O)$_2$-	(L-25)
-CO-$(CH_2)_{n3}$-O-CO-NH-$(CH_2)_{n4}$-	(L-26)
-CO-$(CH_2)_{n3}$-CO-NH-$(CH_2)_{n4}$-	(L-27)

En las fórmulas (L-4) a (L-21), n1 es un número entero de 1 a 40, preferiblemente de 2 a 20, y más preferiblemente de 2 a 12.

En las fórmulas (L-22) a (L-24), n2 es un número entero de 1 a 20, preferiblemente de 1 a 10, y más preferiblemente de 1 a 6.

En las fórmulas (L-25) a (L-27), n3 y n4 pueden ser iguales o diferentes, y son un número entero de 1 a 20, preferiblemente de 1 a 10, y más preferiblemente de 1 a 6.

ADN de cadena sencilla puede estar unido al lado de la izquierda o de la derecha de los enlazadores de fórmulas (L-1) a (L-27). Preferiblemente, un lípido de doble cadena está unido al lado de la izquierda del enlazador, y la región del extremo 5' de la cadena sentido de un ARN de doble cadena está unida al lado de la derecha del mismo.

El sitio de unión del lípido de doble cadena y el enlazador puede seleccionarse adecuadamente de acuerdo con los tipos de lípidos de doble cadena y enlazador. Cualquier posición distinta de grupos hidrófobos de los lípidos de doble cadena puede estar enlazada al enlazador por un enlace químico. Por ejemplo, cuando se utiliza una fosfatidiletanolamina, el enlace puede hacerse formando un enlace amida, etc. entre el grupo amino de la fosfatidiletanolamina y el enlazador. Cuando se utiliza un fosfatidilglicerol, el enlace puede hacerse formando un enlace éster, un enlace éter, etc. entre el grupo hidroxilo del residuo de glicerol y el enlazador. Cuando se utiliza una fosfatidilserina, el enlace puede hacerse formando un enlace amida o un enlace éster, etc. entre el grupo amino o el grupo carboxilo del residuo de serina y el enlazador. Cuando se utiliza un ácido fosfatídico, el enlace puede hacerse formando un enlace fosfoéster, etc. entre el residuo fosfato y el enlazador. Cuando se utiliza un fosfatidilinositol, el enlace puede hacerse formando un enlace éster, un enlace éter, etc. entre el grupo hidroxilo del resto inositol y el enlazador.

El enlazador se puede seleccionar adecuadamente de acuerdo con el tipo de lípido a enlazar. Por ejemplo, cuando el lípido de cadena doble es un fosfolípido que contiene un grupo amino (p. ej., fosfatidiletanolamina o fosfatidilserina) o un fosfolípido que contiene hidroxilo (p. ej., fosfatidilglicerol o fosfatidilinositol), se utilizan preferiblemente enlazadores de fórmulas (L-6), (L-7), (L-9), (L-10), (L-18), (L-26) y (L-27).

Además de los ejemplos anteriores de enlazadores, también son utilizables otros enlazadores tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato, ácido N-4-maleimida-butírico, S-(2-piridilditio)cisteamina, yodoacetoxisuccinimida, N-(4-maleimidebutiriloxi)succinimida, ácido N-[5-(3'-maleimida propilamida)-1-carboxipentil]iminodiacético, ácido N-(5-aminopentil)iminodiacético, y enlazadores bifuncionales similares (enlazadores que contienen dos grupos funcionales).

El nucleótido de la cadena sentido a la que está unido el lípido de doble cadena o el enlazador utilizado para enlazar el lípido de doble cadena no está particularmente limitado, en la medida en que sea al menos uno de los primero a sexto nucleótidos desde el extremo 5' de la cadena sentido. Es preferible al menos uno de los primero a cuarto nucleótidos desde el extremo 5'. Son más preferibles el primer y/o segundo nucleótidos desde el extremo 5'. Es particularmente preferible el nucleótido en el extremo 5' (el primer nucleótido desde el extremo 5').

El sitio de unión de la cadena sentido a la que está unido el lípido de doble cadena o el enlazador utilizado para enlazar el lípido no está particularmente limitado. El lípido de doble cadena o el enlazador utilizado para enlazar el lípido de doble cadena está preferiblemente unido a la cadena sentido por sustitución del átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo de la parte de fosfato de un nucleótido específico en la cadena sentido con el lípido o enlazador.

El número de los lípidos de doble cadena unidos al ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención no está particularmente limitado. Por ejemplo, pueden estar unidos uno a tres lípidos de doble cadena, preferiblemente uno o dos lípidos de doble cadena, y más preferiblemente un lípido de doble cadena.

El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención se puede producir mediante la síntesis de cada una de las cadenas sentido mencionadas anteriormente que tiene al menos un lípido de doble cadena unido a la misma y la cadena antisentido mencionada anteriormente, y mediante la hibridación de las cadenas sentido y antisentido de acuerdo con un método conocido. Un método conocido también puede utilizarse para producir la cadena sentido que tiene un lípido de doble cadena enlazado a la misma.

Alternativamente, el ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la presente invención también se puede producir mediante la síntesis de las cadenas sentido y antisentido antes mencionados de acuerdo con métodos conocidos, mediante la hibridación de las cadenas sentido y antisentido en un ARN de doble cadena, y después enlazando un lípido de doble cadena al extremo 5' de la cadena sentido del ARN de doble cadena mediante una técnica sintética conocida.

El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención puede suprimir o inhibir la expresión de un gen diana cuando se introduce en células. Por lo tanto, el ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención se puede utilizar como un producto farmacéutico para suprimir la expresión de un gen diana o un producto farmacéutico para la terapia génica, o como un material experimental utilizado para evaluar un efecto supresor sobre la expresión de un gen diana.

La célula en la que se introduce el ARN de doble cadena, modificado con lípidos puede ser cualquier célula derivada de seres humanos, mamíferos no humanos, aves, insectos, etc. Son preferibles las células derivadas de seres humanos o mamíferos no humanos.

El método de introducir el ARN de doble cadena, modificado con lípidos en una célula puede ser el mismo que los métodos conocidos para introducir ARNip. Se puede utilizar cualquier método que puede llevar una cantidad eficaz del ARN de doble cadena, modificado con lípidos en contacto con la célula diana. La introducción del ARN de doble cadena, modificado con lípidos en una célula se puede realizar in vivo, in vitro o ex vivo.

Por ejemplo, la introducción in vivo del ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención en las células se puede realizar utilizando un método que comprende cultivar células en presencia de una cantidad apropiada del ARN de doble cadena, modificado con lípidos. Además, la introducción in vitro o ex vivo del ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención en células cultivadas, células derivadas de un organismo o tejidos derivados de un organismo se puede llevar a cabo mediante la incubación de las células cultivadas, las células derivadas de un organismo o tejidos derivados de un organismo en presencia del ARN de doble cadena, modificado con lípidos. Además, la introducción in vivo del ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención en las células se puede realizar mediante la administración del ARN de doble cadena, modificado con lípidos por inserción directa en los tejidos; inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intraocular, digestiva o dental; administración por inhalación en la cavidad nasal, cavidad oral, pulmones, etc.; administracion oral; administración transdérmica a través de la piel; y administración transmucosal a través de la mucosa oral, mucosa vaginal, mucosa ocular, mucosa rectal o mucosa uterina; etc.

El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención se puede utilizar en cualquier cantidad que sea eficaz para introducir el ARN en la célula diana. La cantidad del ARN de doble cadena, modificado con lípidos a utilizar puede ser, por ejemplo, 0,001 a 10 pmol (picomoles), preferiblemente 0,001 a 1 pmol, y más preferiblemente 0,01 a 0,1 pmol, por célula.

El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención tiene una alta capacidad de ser suministrado intracelularmente, incluso cuando se utiliza solo. Por lo tanto, el ARN de doble cadena, modificado con lípidos se puede introducir en las células sin utilizar reactivos de transfección de genes conocidos que se utilizan para la introducción de ARNip en las células, o mediante el uso de un reactivo de transfección de genes conocido en una cantidad reducida.

El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención puede suprimir o inhibir la expresión de un gen diana cuando se introduce en una célula. Por lo tanto, el ARN de doble cadena, modificado con lípidos se puede utilizar, por ejemplo, en el campo médico para prevenir, mejorar o tratar una enfermedad provocada por la expresión del gen diana. Cuando el ARN de doble cadena, modificado con lípidos de la invención se utiliza en el campo médico, el ARN de doble cadena, modificado con lípidos se proporciona como una composición farmacéutica producida mediante el uso del ARN y un soporte farmacológicamente aceptable.

El soporte farmacéuticamente aceptable a ser utilizado en la composición farmacéutica no está particularmente limitado, y se puede seleccionar adecuadamente de acuerdo con la forma de dosificación de la composición farmacéutica. Ejemplos de tales soportes incluyen soportes acuosos tales como agua purificada, disoluciones acuosas de azúcar, tampones, solución salina fisiológica, disoluciones acuosas de polímeros y agua libre de RNasa, excipientes, etc.

La proporción del ARN de doble cadena, modificado con lípidos en la composición farmacéutica puede seleccionarse adecuadamente a partir de un intervalo que permita que el ARN de doble cadena, modificado con lípidos sea utilizado en la cantidad arriba mencionada. La proporción del ARN de doble cadena, modificado con lípidos es, por ejemplo, de 0,001 a 50% en peso, preferiblemente de 0,01 a 10% en peso, y más preferiblemente de 0,1 a 1% en peso, basado en la cantidad total de la composición farmacéutica.

La forma de dosificación de la composición farmacéutica no está particularmente limitada, en la medida en que el ARN de doble cadena, modificado con lípidos pueda ser introducido en las células. Ejemplos de la forma de dosificación incluyen líquidos (tales como jarabes), gotas, inyecciones, y formulaciones líquidas similares; formulaciones liofilizadas, jarabes secos, comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas (tales como cápsulas blandas), y formulaciones sólidas similares; etc. Cuando la composición farmacéutica de la invención es una preparación sólida, la composición se puede utilizar en forma de una disolución mediante la adición de agua destilada para inyección, agua estéril, o similar, cuando se utiliza.

La enfermedad o afección diana para la que se utiliza la composición farmacéutica de la invención no está particularmente limitada, en la medida en que la expresión del gen diana esté asociada con la enfermedad o afección. La relación entre el gen diana y la enfermedad es conocida en este campo técnico.

La composición farmacéutica de la invención puede introducirse en células derivadas de seres humanos para el tratamiento de seres humanos, o se puede utilizar para tratar a animales distintos de los seres humanos (mamíferos no humanos).

EJEMPLOS

La presente invención se describe en detalle con referencia a los siguientes Ejemplos; sin embargo, la invención no está limitada a estos Ejemplos.

Ejemplo 1 Efectos Inhibidores de ARNs de Doble Cadena Modificados con Lípidos 5' sobre la Expresión del Gen Luciferasa

1. Síntesis de ARNs de Doble Cadena Modificados con Lípidos que fijan como Objetivo el Gen Luciferasa

1-1. Secuencias de Cadenas Sentido y Cadenas Antisentido

ARNs de doble cadena de cadenas sentido de 21 y 27 bases de longitud y cadenas antisentido de 21 y 27 bases de longitud se diseñaron para que tuvieran secuencias homólogas a luciferasa de Renilla y fuesen capaces de suprimir la expresión del gen luciferasa de Renilla. Los ARNs de doble cadena formados fueron como sigue: Cuando se utilizaron una cadena antisentido y una cadena sentido de 21 bases de longitud, se formó un ARN de doble cadena 21 bases de longitud que tiene un extremo colgante de dos bases en el extremo 3'. Cuando se utilizaron una cadena antisentido y una cadena sentido de 27 bases de longitud, se formó un ARN de doble cadena 27 bases de longitud en el que los dos extremos eran extremos romos. Las secuencias de los ARN utilizados son los siguientes.

ARNdc de 27 nt
Cadena sentido L27A:
5'-CUGGCCUUUCACUACUCCUACGAGCAC-3' (SEQ ID NO: 1)
Cadena antisentido L27B:
3'-GACCGGAAAGUGAUGAGGAUGCUCGUG-5' (SEQ ID NO 2)
ARNip de 21 nt
Cadena sentido L21A:
5'-GGCCUUUCACUACUCCUACGA-3' (SEQ ID NO: 3)
Cadena antisentido L21B:
3'-GACCGGAAAGUGAUGAGGAUG-5' (SEQ ID NO 4).

Los ARNs de doble cadena se prepararon utilizando estas cadenas sentido y cadenas antisentido. Cada uno de los ARNs de doble cadena se preparó mezclando cantidades equimolares de una cadena sentido de cadena sencilla y una cadena antisentido en un tampón universal (Hayashi Kasei Co., Ltd.), calentando la mezcla durante 2 minutos a 92°C, y luego reduciendo gradualmente la temperatura a 4°C. Los ARNs de doble cadena sintetizados se

sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 20% durante 60 minutos a 250 V, y después se confirmaron mediante tinción con un kit de tinción de plata (GE Health Care Bioscience).

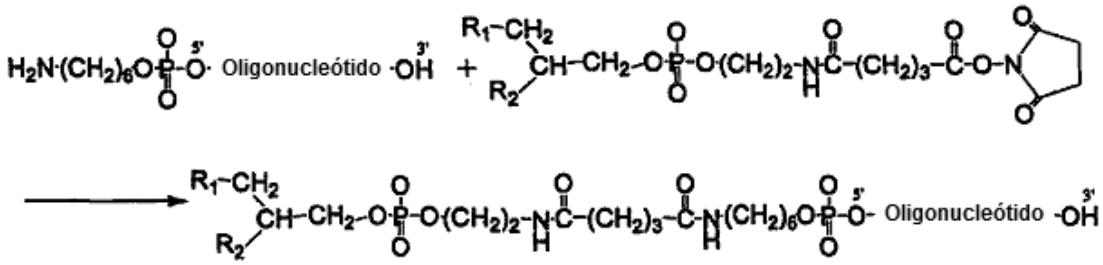
De estos ARN de doble cadena, el ARN de doble cadena de 21 bases de longitud que tiene un extremo colgante de dos bases en el extremo 3' se designa como "si L21A/L21B", y el ARN de doble cadena de 27 bases de longitud en el que los dos extremos eran extremos romos se designa como "Dc L27A/L27B".

1-2. Síntesis de ARNs de Doble Cadena Modificados con Lípidos que fijan como Objetivo el Gen Luciferasa

Cadenas sentido modificadas con lípidos de doble cadena se sintetizaron enlazando los lípidos de doble cadena a los extremos 5' de las cadenas sentido de los ARNs de doble cadena capaces de suprimir la expresión del gen luciferasa. En cada una de estas cadenas sentido de doble cadena modificadas con lípidos, un lípido de doble cadena se unió covalentemente a través de un grupo aminoalquilo (Amino Modifier C6; Glen Research) enlazado al extremo 5' de la cadena sentido. Cada una de las cadenas sentido de doble cadena modificadas con lípidos se sintetizó haciendo reaccionar, en una fase líquida, un compuesto lipídico que contiene un grupo éster activo (al que se alude en adelante como un "compuesto lipídico que contiene éster activo") con una cadena sentido, cuyo extremo 5' fue modificado por aminación (Esquema de Reacción 1 que figura a continuación).

[Quím. 3]

Esquema de Reacción 1

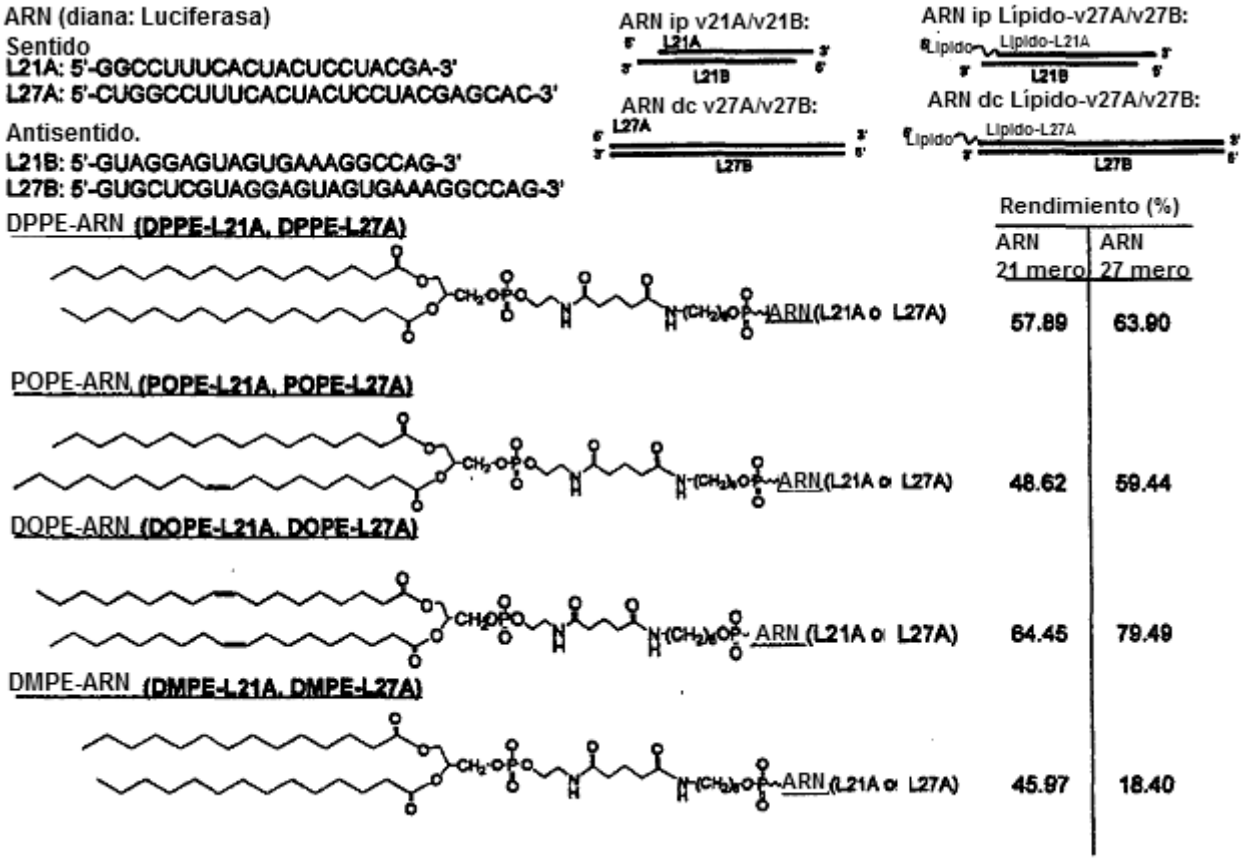


en donde R_1 y R_2 son iguales o diferentes, y cada uno representa un residuo de ácido graso.

Se describe a continuación un proceso de síntesis específico. Con el fin de aminar el extremo 5' del ARN, se realizó un proceso convencional (el proceso de síntesis de fosforamidita) utilizando 5'-Amino-Modifier C6 (Glen Research) en la síntesis en fase sólida del ARN, sintetizando de ese modo una cadena sentido modificada con un grupo aminoalquilo en el extremo 5'. La cadena sentido modificada con un grupo aminoalquilo en el extremo 5', que ya había sido purificada por HPLC y sometida a análisis de MALDI-TOF MS, se adquirió de Hayashi Kasei Co., Ltd. En la cadena sentido resultante, modificada con un grupo aminoalquilo en el extremo 5', $-(CH_2)_6-NH_2$ se enlazó al extremo 5' (el residuo fosfato del primer nucleótido desde el extremo 5'). La concentración del ARN de cadena sencilla resultante se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm utilizando un espectrómetro UV. El ARN de cadena sencilla, así obtenido, modificado con un grupo aminoalquilo se mezcló en condiciones de condensación con cada uno de los siguientes derivados de lípidos que contienen éster activos [DPPE-NHS (N-(succinimidil-glutaril)-L-α-fosfatidiletanolamina, dipalmitoílo); POPE-NHS (N-(succinimidil-glutaril)-L-α-fosfatidiletanolamina, 1-palmitoil-2-oleoílo); DOPE-NHS (N-(succinimidil-glutaril)-L-α-fosfatidiletanolamina, dioleoílo); y DMPE-NHS; (N-(succinimidil-glutaril)-L-α-fosfatidiletanolamina, dimiristoílo); todos de NOF Corporation], que se disolvió en cloroformo, sintetizando de esta manera una cadena sentido de doble cadena modificada con lípidos. Después de la reacción, la mezcla de reacción se purificó por HPLC con el fin de separar el reactivo no deseado en la mezcla de reacción que contiene la cadena sentido de doble cadena modificada con lípidos. La purificación por HPLC se realizó con tampón A: 100% de TEAA 20 mM (pH 7,0) y tampón B: 80% CH_3CN/ TEAA 20 mM (pH 7,0) en un gradiente lineal de 10-100% de tampón B durante un período de 50 minutos. CAP CELL (4,6 x 150 mm, 5 µm; Shiseido) se utilizó como la columna de purificación. La FIG. 1 muestra resultados analíticos de HPLC a modo de ejemplo. La cadena sentido de

doble cadena modificada con lípidos, purificada por HPLC, se liofilizó y se disolvió en agua purificada, después de lo cual la concentración y el rendimiento sintético de la misma se determinaron por análisis espectral UV.

Las estructuras y los rendimientos de las cadenas sentido de doble cadena modificadas con lípidos se muestran a continuación.



Cada una de las cadenas sentido modificadas con lípidos de doble cadena sintetizadas se emparejó con una cadena antisentido para producir un ARN de doble cadena, modificado con lípidos. Estos ARNs de doble cadena se formaron de acuerdo con el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente, y se confirmaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20% (véase la FIG. 2).

2. Resistencia Enzimática Degradativa de ARNs de Doble Cadena Modificados con Lípidos

Se investigó la resistencia a nucleasas de ip L21A/L21B y Dc L27A/L27B de doble cadena modificados con lípidos. Los experimentos se realizaron como sigue: Cada uno de los ARNs de doble cadena, modificado con lípidos, modificados en el extremo 5' de la cadena sentido (ip L21A/L21B y Dc L27A/L27B), ajustado a una concentración final de 2 mM, se incubó a 37°C en un medio RPMI-1640 (Invitrogen) que contiene FBS al 10% (Sanko Junyaku, Co., Ltd.) (volumen final: 110 µl). Después de 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h y 48 h de incubación, una parte alícuota de 10 µl de cada uno de los ARNs se extrae y se inserta en un tubo de muestras que contiene 2 µl de un colorante de carga. Con el fin de detener la reacción de degradación, la muestra tomada fue liofilizada rápidamente en nitrógeno líquido y conservada a -20°C. El producto resultante se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 20% a 250 V durante 70 minutos. Después, el producto se tiñó con un kit de tinción de plata (GE Health Care Bioscience) (véase el manual del producto para las condiciones de tinción), y se sometió a análisis en gel en un ChemiImager 4000 (Alpha Innotech Corporation). Como comparación, se evaluó de manera similar la

resistencia a nucleasa de ip L21A/L21B y Dc L27A/L27B no modificado. La FIG. 3 muestra los resultados de la electroforesis en gel.

Como resultado, el ip L21A/L21B no modificado fue digerido rápidamente en el medio que contiene suero, y la desaparición del ARN de muestra se confirmó en aproximadamente 1 a 2 horas. Por el contrario, el ip L21A/L21B (ip DPPE-L21A/L21B) de doble cadena, modificado con lípidos exhibió resistencia muy alta a nucleasas en comparación con ip L21A/L21B, y el ARN sobrevivió incluso después de 48 horas. El Dc L27A/L27B no modificado también exhibió una alta resistencia a nucleasas, pero el Dc L27A/L27B (Ds DPPE-L27A/L27B) de doble cadena, modificado con lípidos exhibió incluso una mayor resistencia a las nucleasas. Además de ello, se encontró que la resistencia enzimática de degradación de los ARNs de doble cadena modificados con lípidos ha mejorado debido a que se unieron a proteínas séricas.

Estos resultados condujeron a un nuevo hallazgo de que los ARNs de doble cadena modificados con lípidos poseían una estabilidad *in vivo* acusadamente superior a la de 21ARNAsip que están generalmente en amplio uso.

3. Procesamiento con Dicer de los ARNs de Doble Cadena Modificados con Lípidos que fijan como Objetivo el Gen Luciferasa

Se investigó el procesamiento de los ARNs sintetizados y los ARNs de doble cadena modificados con lípidos por Dicer recombinante. Los experimentos de escisión con Dicer se realizaron como sigue: 10 µl de 0,5 U de Dicer recombinante (Gene Therapy Systems) y cada uno de los ARNs no modificados o ARNs de doble cadena modificados con lípidos ajustados a una concentración final de 2 µM en una disolución de Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), NaCl 15 mM y $MgCl_2$ 2,5 mM se prepararon en tubos de muestra. Las muestras se incubaron en una incubadora a 37°C durante 12 horas. Con el fin de detener posteriormente las reacciones de escisión mediante Dicer, se añadieron 2 µl de Dolución de Parada Dicer (Gene Therapy Systems) a las mezclas de reacción, seguido de la adición de 2 µl de un colorante de carga. Los productos de muestra resultantes se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 20% a 250 V durante 70 minutos. Los productos se tiñeron después con un kit de tinción de plata (GE Health Care Bioscience) (véase el manual del producto para las condiciones de tinción), y se sometieron a análisis en gel en un ChemiImager 4000 (Alpha Innotech Corporation). Como control, 21ARNip no modificado también se analizó por electroforesis en gel. Los resultados se muestran en la FIG. 4.

Los resultados obtenidos demostraron que el Dc L27A/L27B no modificado se procesó en ARNs de 21 bases de longitud mediante la acción de Dicer; y que los ARNs de doble cadena modificados con lípidos de 27 bases de longitud (Dc Lípido-L27A/L27B) también se procesaron en ARNs de 21 bases de longitud y otros ARNs por la acción de Dicer. Estos resultados han revelado que los ARNs de 27 bases de longitud a los que están enlazados lípidos son reconocidos por Dicer, y se someten a procesamiento.

En contraposición, se encontró que el ip L21A/L21B no modificado no sufrió un procesamiento con Dicer, y que los ARNs de doble cadena en donde el ARN de 21 bases de longitud fue modificado con lípidos de doble cadena (ip Lípido-L21A/L21B) tampoco se sometieron a procesamiento con Dicer. Además de ello, el ip L21A/L21B de doble cadena, modificado con lípidos, cuando se coloca junto con la proteína Dicer, mostró un aumento en el peso molecular, lo que confirma la formación de un complejo entre el ip L21A/L21B de doble cadena, modificado con lípidos y la proteína Dicer.

4. Supresión de la Expresión del Gen Luciferasa por ARNs de Doble Cadena Modificados con Lípidos

Los efectos de inteferencia por ARN de los ARNs no modificadas sintetizados y los ARNs de doble cadena modificados con lípidos se sometió a ensayo utilizando luciferasa de Renilla como el gen diana. Las células HeLa (células de cáncer cervical humano; Institute of Development, Aging and Cancer, Universidad de Tohoku), ajustadas a 1 x 10^5 células/ml antes de los experimentos fueron sembradas en una placa de 96 pocillos a razón de 100 µl por pocillo y fueron incubadas a 37°C durante la noche. Al día siguiente se retiró el medio viejo de los pocillos y se añadió un nuevo medio libre de antibióticos a razón de 80 µl por pocillo; posteriormente, 10 µl de una disolución compleja de un vector que expresa luciferasas de luciérnaga y Renilla se añadió a cada uno de los pocillos (psiCHECK™ -2 Vector; Promega) y Lipofectamine™ 2000 (nombre comercial; Invitrogen). El vector de expresión se ajustó a 0,02 µg por pocillo, Lipofectamine™ 2000 se ajustó a 0,2 µl por pocillo y OptiMem (Invitrogen) se utilizó para ajustar el volumen a un nivel necesario. Para formar un complejo, el vector de expresión y Lipofectamine™ 2000 se mezclaron utilizando OptiMem, y después la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después

de la adición de la disolución de complejo, las células se incubaron durante 4 horas a 37°C en presencia de 5% de CO_2. Después de la incubación, los ARNs de doble cadena no modificados y los ARNs de doble cadena modificados con lípidos obtenidos mediante la introducción de los lípidos de doble cadena en los extremos 5' de las cadenas sentido, conteniendo cada uno una secuencia antisentido homóloga a la secuencia del gen de la luciferasa Renilla, fueron complejados con Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) a concentraciones finales de 0 nM, 0,2 nM, 0,5 nM, 1 nM, 2 nM, 5 nM y 10 nM; y 10 µl de cada una de las disoluciones de complejos resultantes se añadieron a las células HeLa en las que se había introducido el vector de expresión. El volumen final por pocillo era de 100 µl. La disolución de complejos de cada uno de los ARNs y Lipofectamine™ 2000 se preparó mezclando la disolución acuosa de ARN a razón de 5 µl por pocillo y una disolución OptiMem de Lipofectamine™ 2000 (0,2 µl) a razón de 5 µl por pocillo, e incubando la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la introducción de ARN, las células se incubaron durante 48 horas, y los niveles de expresión de luciferasa de luciérnaga y Renilla se analizaron utilizando un Sistema de Ensayo de Luciferasa Dual-Glo™ (Promega) y un luminómetro (MicroLumat LB96p; Berthold), y los efectos de la supresión sobre la expresión de luciferasa de Renilla se determinaron en base al nivel de expresión de luciferasa de luciérnaga como control.

Los resultados se muestran en la FIG. 5. En la FIG. 5, el Gráfico A muestra los resultados de la supresión de la expresión del gen luciferasa utilizando los ARNips de 21nt de doble cadena modificados con lípidos; y el Gráfico B muestra los resultados de la supresión de la expresión del gen luciferasa utilizando los ARNdcs de 27nt de doble cadena modificados con lípidos. También se evaluaron el ARNip de 21nt y el ARNdc de 27nt no modificados. Los resultados confirmaron que los ARNips de 21nt y los ARNdcs de 27nt a la que se enlazaron lípidos de doble cadena demostraron efectos de interferencia de ARN acusadamente más altos que los del ARNip de 21nt y del ARNdc de 27nt no modificados.

Ejemplo 2 Efectos Inhibidores de ARNs de Doble cadena, modificado con lípidos 5' en la Expresión Génica de VEGF

1. Síntesis de ARNs de Doble Cadena Modificados con Lípidos que fijan como Objetivo el Gen VEGF

1-1. Secuencias de Cadenas Sentido y Cadenas Antisentido

ARNs de doble cadena de cadenas sentido de 27 y 21 bases de longitud y cadenas antisentido de 27 y 21 bases de longitud se diseñaron para que tuvieran secuencias homólogas a VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y fuesen capaces de suprimir la expresión del gen VEGF. Los siguientes experimentos se llevaron a cabo utilizando estos ARNs de doble cadena. Obsérvese que 21ARNip es un ARN de doble cadena que tiene extremos colgantes de dos bases en los extremos 3' tanto de la cadena sentido como de la cadena antisentido; y el ARNdc de 27nt es un ARN de doble cadena por completo que no tiene extremos colgantes (regiones de cadena sencilla), es decir, un ARN de doble cadena en el que ambos de los extremos 5' y 3' de la cadena sentido son extremos romos. Las secuencias del ARNdc de 27nt y 21ARNip utilizadas son las siguientes.

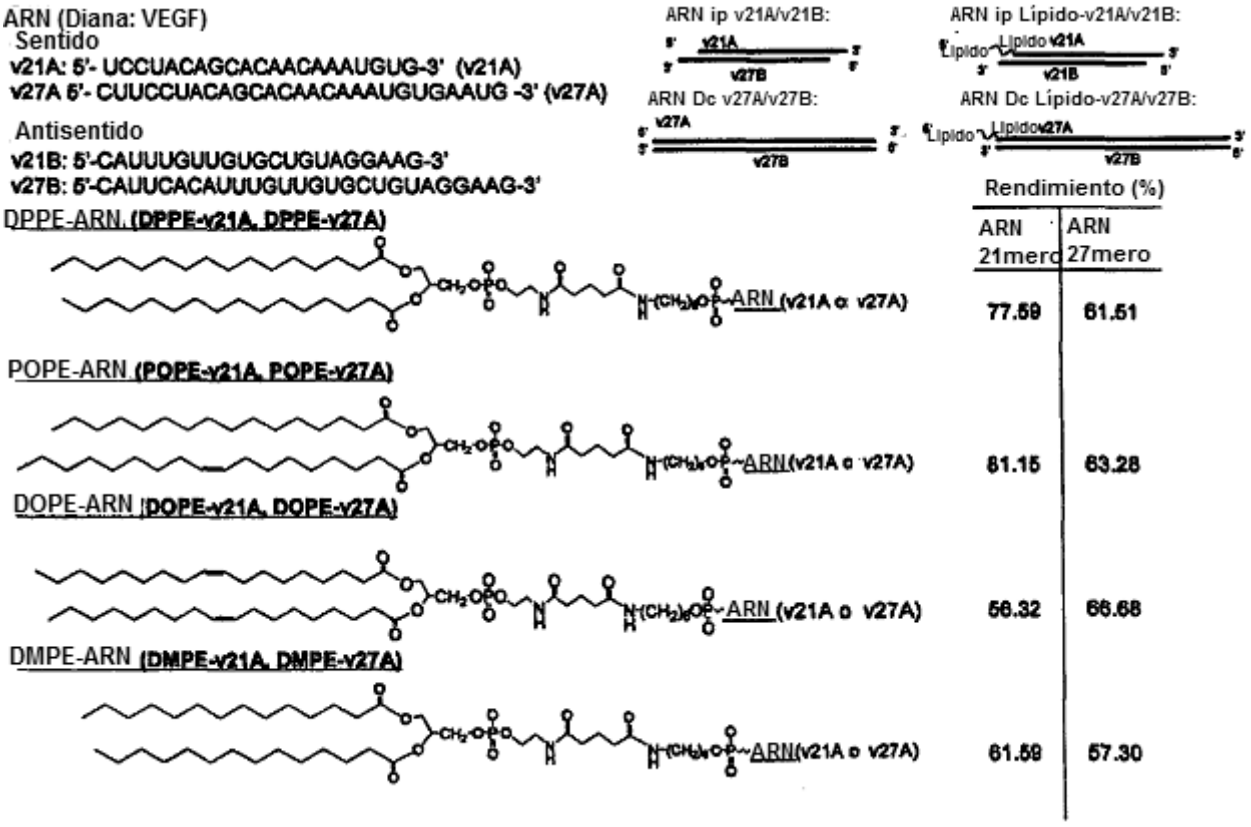
ARNdc de 27 nt
Cadena sentido v27A:
5'-CUUCCUACAGCACAACAAAUGUGAAUG-3' (SEQ ID NO: 5)
Cadena antisentido v27B:
3'-GAAGGAUGUCGUGUUGUUUACACUUAC-5' (SEQ ID NO: 6)
ARNip de 21 nt
Cadena sentido v21A:
5'-UCCUACAGCACAACAAAUGUG-3' (SEQ ID NO 7).
Cadena antisentido v21B:
3'-GAAGGAUGUCGUGUUGUUUAC-5' (SEQ ID NO 8).

Estas cadenas sentido y antisentido capítulos se reasociaron de la misma manera que en el Ejemplo 1 para formar dobles cadenas, produciendo de este modo los ARNs de doble cadena no modificados con lípidos. La formación de las dobles cadenas se confirmó por electroforesis en gel de acrilamida al 20% de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1.

1-2. Síntesis de ARNs de Doble Cadena Modificados con Lípidos que fijan como Objetivo el Gen VEGF

ARNs de doble cadena modificados con lípidos se sintetizaron enlazando los lípidos a los extremos 5' de las cadenas sentido de los ARNs de doble cadena arriba mencionados, capaces de suprimir la expresión del gen VEGF. En cada uno de los ARNs de doble cadena modificados con lípidos, un lípido de doble cadena se unió covalentemente a través de un grupo aminoalquilo (Amino Modifier C6; Glen Research) enlazado al extremo 5' de la cadena sentido. Los ARNs de doble cadena modificados con lípidos (cadenas sentido) se sintetizó de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1. La FIG. 6 muestra los resultados de la HPLC en las cadenas sentido modificadas con lípidos de doble cadena sintetizadas. Los tiempos de elución para las cadenas sentido modificadas con lípidos de doble cadena que fijan como objetivo el gen VEGF también fueron sustancialmente las mismos que en el Ejemplo 1.

Los modelos estructurales y los rendimientos de los ARNs de doble cadena modificados con lípido que fijan como objetivo el gen VEGF son los siguientes.



Las cadenas sentido de doble cadena modificadas con lípidos sintetizadas fueron emparejadas con cadenas antisentido para producir ARNs de doble cadena modificados con lípidos. La formación de los ARNs de doble cadena fue confirmada por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20% de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 (véase la FIG. 7).

2. Resistencia Enzimática Degradativa de ARNs de Doble Cadena Modificados con Lípidos

Se investigó la resistencia a nucleasas de ip v21A/v21B y Dc v27A/v27B de doble cadena modificados con lípidos. Como comparaciones, también se evaluó la resistencia a nucleasas de ip L21A/L21B y Dc L27A/L27B. Los experimentos se realizaron de acuerdo con el mismo método que en el Ejemplo 1. La FIG. 8 muestra los resultados de la electroforesis en gel.

De acuerdo con los resultados, el ip v21A/v21B no modificado fue digerido rápidamente en el medio que contiene suero, y la desaparición de la muestra de ARN se confirmó en aproximadamente 1 a 2 horas. En contraposición, el

ip v21A/v21B (ip DPPE-v21A/v21B) de doble cadena, modificado con lípidos exhibió una resistencia muy alta a las nucleasas en comparación con ip v21A/v21B, y el ARN sobrevivió incluso después de 48 horas. El Dc v27A/v27B no modificado también exhibió una alta resistencia a nucleasas, pero el Dc v27A/v27B de doble cadena, modificado con lípidos (Dc DPPE-v27A/v27B) exhibió incluso una mayor resistencia a las nucleasas. Además de ello, se encontró que la resistencia a la enzima degradativa de los ARNs de doble cadena modificados con lípidos ha mejorado debido a que se unieron a proteínas séricas.

Estos resultados también revelaron que los ARNs de doble cadena modificados con lípidos que poseían *in vivo* una estabilidad acusadamente superior que la de 21ARNsip que en general son de uso generalizado.

3. Procesamiento con Dicer de los ARNs de Doble Cadena Modificados con Lípidos que fijan como Objetivo el Gen VEGF

Se investigó el procesamiento de los ARNs de doble cadena modificados con lípidos sintetizados y los ARNs de doble cadena modificados con lípidos por Dicer recombinante. Los experimentos de escisión con Dicer se realizaron de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la FIG. 9.

Los resultados obtenidos demostraron que el Dc v27A/v27B no modificado se procesó en ARNs de doble cadena de 21 bases de longitud mediante la acción de Dicer; y que los ARNs de doble cadena modificados con lípidos de 27 bases de longitud (Dc Lípido-v27A/v27B) también se procesaron en ARNs de 21 bases de longitud y otros ARNs por la acción de Dicer. Estos resultados revelaron que los ARNs de 27 bases de longitud a los que están enlazados lípidos son reconocidos por Dicer, y se someten a procesamiento.

En contraposición, se encontró que el ip v21A/v21B no modificado no sufrió un procesamiento con Dicer, y que los ARNs de doble cadena en donde el ARN de doble cadena de 21 bases de longitud fue modificado con lípidos de doble cadena tampoco se sometieron a procesamiento con Dicer. Además de ello, el ip v21A/v21B de doble cadena, modificado con lípidos, cuando se coloca junto con la proteína Dicer, mostró un aumento en el peso molecular, lo que confirma la formación de un complejo entre el ip L21A/L21B de doble cadena, modificado con lípidos y la proteína Dicer.

4. Supresión de la Expresión del Gen VEGF por ARNs de Doble cadena, modificado con lípidos

Se realizó una evaluación de los efectos inhibidores sobre la expresión del gen VEGF, utilizando células HeLa (células de cáncer cervical humano; Institute of Development, Aging and Cancer de la Universidad de Tohoku), y células A549 (células de cáncer de pulmón humano; Institute of Development, Aging and Cancer de la Universidad de Tohoku) en ip v21A/v21B con extremos no modificados, Dc v27A/v27B con extremos no modificados, ip v21A/v21B (ip Lípido-v21A/v21B) modificado con lípidos de doble cadena en los extremos 5' de las cadenas sentido, y Dc v27A/v27B (Dc Lípido-v27A/v27B) modificada con lípidos de doble cadena en los extremos 5' de las cadenas sentido. La misma evaluación se llevó también a cabo en ARNs (AENdc 27nt (Random), ARNip 21nt (Random)) que no tienen una secuencia de genes homólogo al gen VEGF.

Los experimentos se realizaron de acuerdo con los siguientes procedimientos. Cada una de células HeLa y células A549 se ajustó a 1 x 10^5 células/ml antes de los experimentos, se sembraron en una placa de 24 pocillos a razón de 500 µl por pocillo, y se incubaron a 37°C durante la noche. Al día siguiente, se retiró el medio viejo en el pocillo, y se añadió un medio reciente, libre de antibióticos a razón de 450 µl por pocillo. Medio MEM se utilizó para las células HeLa, y medio PRMI-1640 se utilizó para las otras células. Se formó un complejo de la disolución de Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) (25 µl) con cada uno de los ARNs sin modificar o ARN de doble cadena, modificado con lípidos (25 µl) que contienen una secuencia antisentido homóloga a la secuencia génica de VEGF, y luego se añadieron 50 µl de la disolución de ARN resultante a 450 µl de las células antes mencionadas. El volumen final por pocillo era de 500 µl. La disolución de complejo de cada uno de ARN y Lipofectamine™ 2000 se preparó mezclando la disolución acuosa de ARN a razón de 25 µl por pocillo y una disolución OptiMem de Lipofectamine™ 2000 (2 µl) a razón de 25 µl por pocillo, e incubando la mezcla a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la introducción del ARN, las células se incubaron durante 48 horas a 37°C en presencia de 5% de CO_2. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS (-) tres veces, y el ARN total en las células se extrajo utilizando un kit RNeasy Mini Plus (Qiagen). Reacciones de RT-PCR se realizaron posteriormente para medir la cantidad de ARNm del VEGF. Un Kit Qiagen OneStep RT-PCR (Qiagen) se utilizó para la reacción de RT-PCR, y 5'-CCC TGA TGA GAT CGA CAT GTA CTT-3' (SEQ ID NO: 9) y 5'-ACC GCC TCG GCT TGT CAC-3' (SEQ ID NO: 10)

se utilizaron como cebadores de la PCT para VEGF. Como control, el gen de GAPDH se midió de acuerdo con el mismo procedimiento. 5'-GGAAAGCTGTGGCGTGATG-3' (SEQ ID NO: 11) y 5'-CTGTTGCTGTAGCCGTATTC-3' (SEQ ID NO: 12) se utilizaron como los cebadores para GAPDH. Las reacciones de RT-PCR se realizaron de la siguiente manera. La reacción RT (transcripción inversa) se realizó a 50°C durante 30 minutos, y se llevaron a cabo una reacción PCR, que implica 25 a 28 ciclos repetidos (dependiendo de las células utilizadas) de una reacción de separación de doble cadena a 92°C durante 30 segundos, una reacción de reasociación a 55°C durante 30 segundos, y una reacción de elongación a 68°C durante 45 segundos. Por último, la incubación se realizó a 68°C durante 10 minutos, la temperatura se redujo a 4°C, y se completó la reacción. Los reactivos, el ARN total, cebadores, y similares utilizados en la RT-PCR se prepararon de acuerdo con las condiciones de reacción del kit Qiagen OneStep RT-PCR (Qiagen). Después de las reacciones de RT-PCR, se añadieron 2 µl del colorante de carga, y los productos de RT-PCR derivados de los ARNms de VEGF y GAPDH se confirmaron utilizando gel de agarosa al 2%. Los efectos supresores sobre la expresión génica se evaluaron mediante la medición del nivel de expresión de VEGF en las células en las que se introdujeron los ARNs (tanto ARNs no modificados como ARNs de doble cadena modificados con lípidos), tomando como 100% el nivel de expresión del gen VEGF en células de control (las células en las que no se introdujeron los ARNs de doble cadena). El error en los niveles de expresión entre las células se corrigió en base al nivel de la expresión génica del gen de control (GAPDH).

La FIG. 10 muestra los resultados de los efectos de interferencia por ARN de los ARNs no modificados y los ARNs de doble cadena modificados con lípidos que fijan como objetivo VEGF a una concentración de ARN de 50 nM. Las Figs. 10A y 10B son gráficos que muestran los efectos supresores en la expresión del gen VEGF de los ARN no modificadas y los ARNs de doble cadena modificados con lípidos en células HeLa; y las Figs. 10C y 10D son gráficos que muestran los efectos supresores sobre la expresión génica de VEGF de los ARNs no modificadas y los ARNs de doble cadena modificados con lípidos en células A549. En los Gráficos A y C se utilizan ARNs de doble cadena de 21 bases de longitud; y en los Gráficos B y D se utilizan ARNs de doble cadena de 27 bases de longitud.

Como resultado de ello, la observación de las capacidades del ip v21A(v21B de doble cadena, modificado con lípidos para suprimir la expresión de genes en células HeLa (Gráfico A) demostró que todos los ARNs de doble cadena modificados con lípido tenían capacidades para suprimir la expresión de genes mayores que las del ARN no modificado. En particular, ip DPPE-v21A/v21B exhibía una muy alta capacidad de suprimir la expresión de genes. De manera similar, la observación de las capacidades del Dc v27A/V27 de doble cadena, modificado con lípidos para suprimir la expresión de genes en células HeLa (Gráfico B) demostró que todos los ARNs de doble cadena modificados con lípidos tenían capacidades para suprimir la expresión de genes más altas que las del ARN no modificado. En particular, Dc DPPE-v27A/v27B exhibía una muy alta capacidad de suprimir la expresión de genes.

La observación de las capacidades de ip v21A(v21B modificado con lípidos para suprimir la expresión de genes VEGF en células A549 (Gráfico C) demostró que todos los ARNs de doble cadena modificados con lípido tenían capacidades para suprimir la expresión de genes más alta que la del ARN no modificado. En particular, ip DPPE-v21A/v21B exhibía una muy alta capacidad de suprimir la expresión de genes. La observación de las capacidades del Dc v27A/V27 de doble cadena, modificado con lípidos para suprimir la expresión de genes en células A549 (Gráfico D) demostró que los ARNs a los que estaba enlazado DPPE o DMPE exhibían capacidades para suprimir la expresión de genes más altas que las del ARN no modificado.

Estos resultados revelaron que los ARNips y ARNs de 21 bases de longitud y de 27 bases de longitud, en donde los lípidos de doble cadena se ligaron covalentemente a los extremos 5' de las cadenas sentido de los ARNs de doble cadena exhibían capacidades para suprimir la expresión de genes más alta que la de cada uno de los ARNs de doble cadena no modificados. En particular, los ARNs de doble cadena a los que estaba enlazado DPPE exhibían una muy alta capacidad de suprimir la expresión de genes. Adicionalmente, los ARNs a los que estaban enlazados DMPE o DOPE también exhibían altas capacidades de suprimir la expresión de genes, en comparación con el ARN no modificado.

Los ARNs de doble cadena que fijan como objetivo VEGF utilizados en esta memoria demostraron suprimir la expresión del gen diana de una manera altamente específica para la secuencia. Además de ello, los resultados del ensayo sugirieron que los efectos secundarios sobre las células se redujeron mediante el enlace de los lípidos de doble cadena a los ARNs de doble cadena.

5. Investigación de las Eficiencias de Absorción Celular de ARNs de Doble Cadena Modificados con Lípidos

Cada una de las células HeLa (células de cáncer cervical humano; Institute of Development, Aging and Cancer de la Universidad de Tohoku), y células A549 (células de cáncer de pulmón humano; Institute of Development, Aging and Cancer de la Universidad de Tohoku), ajustadas a 1 x 10^5 células/ml antes de los experimentos, se sembraron en placas de 24 pocillos a razón de 1 ml por pocillo, y las células se incubaron en un medio que contiene suero bovino fetal al 10% (FBS; Sanko Junyaku, Inc.) y antibióticos a 37°C en presencia de 5% de CO_2. Como antibióticos y medios se utilizó medio MEM (Invitrogen) para las células HeLa, y se utilizó RPMI-1640 (Invitrogen) para las otras células. Antes de la introducción de ARNs de doble cadena modificados con lípidos marcados por fluorescencia, estos medios fueron reemplazados por un medio libre de antibiótico (450 µl). Los ARNs de doble cadena modificados con lípidos, marcados por fluorescencia, se obtuvieron mediante el uso de cadenas antisentido de 21nt y 27nt marcadas con 6-FAM en los extremos 5', y el emparejamiento de las cadenas antisentido de 21nt y 27nt así marcadas con cadenas sentido de 21nt y 27nt no modificadas, respectivamente, y con cadenas sentido de 21nt y 27nt modificadas con lípidos de doble cadena en los extremos 5', respectivamente, para formar dobles cadenas. Los experimentos de absorción celular se realizaron como sigue. Para formar un complejo de cada uno de los ARNs de doble cadena modificados con lípidos y marcados por fluorescencia y Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen), 25 µl de una disolución mixta de 10 µl de cada uno de una disolución de oligonucleótidos acuosa marcados por fluorescencia 10 µM y 15 µl de disolución OptiMem se combinaron con 25 µl de una disolución mixta de 2 µl de la disolución de Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) y 23 µl de la disolución OptiMem para formar una disolución mixta de 50 µl, y la disolución mixta se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los 50 µl resultantes del complejo de oligonucleótido marcado por fluorescencia se añadieron a 450 µl de las células preparadas anteriormente (concentración final de los ARNs de doble cadena: 200 nM), y se incubaron durante 4 horas a 37°C en presencia de 5% de CO_2. Las células se lavaron posteriormente tres veces con PBS (-) o el medio, y se evaluó la absorción celular de los ARNs de doble cadena utilizando un microscopio láser confocal de fluorescencia y citometría de flujo.

Se utilizó un sistema Radiance 2000 (Bio Rad) como un microscopio láser confocal de fluorescencia, y la fluorescencia se observó utilizando un láser de argón. La citometría de flujo se realizó utilizando un citómetro Coulter EPICS XL (Beckman Coulter) para medir la eficiencia de absorción celular por cada 10.000 células. El software XL EXPO32™ (Beckman Coulter) se utilizó en el análisis de citometría de flujo.

Los resultados se muestran en la FIG. 11. Las secciones A y B de la FIG. 11-1 muestran los resultados obtenidos mediante la medición de las eficiencias de absorción celular cuando ARNs de 21 bases de longitud y de 27 bases de longitud (ip v21A/v21B e ip v27A/v27B) marcados por fluorescencia se modificaron con lípidos de doble cadena en los extremos 5’ de las cadenas sentido, se introdujeron en células HeLa utilizando Lipofectamine™ 2000 como un reactivo de transfección. La sección C y D de la FIG. 11-2 muestran los resultados obtenidos mediante la medición de las eficiencias de absorción celular cuando ARNs de 21 bases de longitud y de 27 bases de longitud (ip v21A/v21B e ip v27A/v27B) marcados por fluorescencia y los ARN marcados por fluorescencia modificados con lípidos de doble cadena en los extremos 5’ de las cadenas sentido, se introdujeron en células A549 utilizando Lipofectamine™ 2000 como un reactivo de transfección.

Los resultados confirmaron la introducción de los ARNs no modificados y los ARNs de doble cadena modificados con lípido en ambas células (células HeLa y células A549) en presencia de Lipofectamine™ 2000. En particular, las observaciones por microscopía láser confocal de fluorescencia y citometría de flujo demostraron que los ARNs de 27 bases de longitud modificados con lípidos de doble cadena en los extremos 5' de las cadenas sentido exhibían muy altas eficiencias de absorción celular, en comparación con los ARNs no modificados. Además de ello, la observación por microscopía láser confocal de fluorescencia indicó que los ARNs de doble cadena modificados con lípidos estaban localizados activamente en el citoplasma. En particular, los ARNs de doble cadena de 27 bases de longitud a los que DPPE o DMPE se enlazaron como un lípido de doble cadena exhibían excelentes eficiencias de la absorción celular.

Los resultados también confirmaron que los ARNs de doble cadena modificados con lípidos, en donde los lípidos de doble cadena estaban enlazados al ARN de 21 bases de longitud exhibían altas eficiencias de absorción celular en presencia de Lipofectamine™ 2000. En particular, se confirmó que el ARN de 21 bases de longitud al que estaba enlazado DMPE como un lípido de doble cadena tenía una excelente eficiencia de absorción celular.

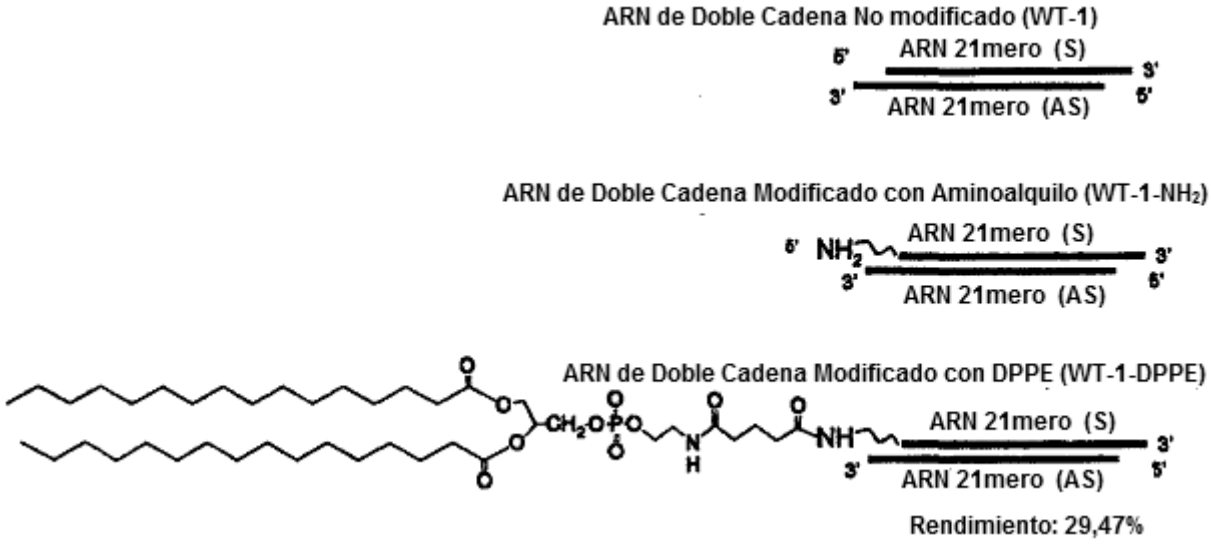
Estos resultados condujeron a un nuevo hallazgo que cuando un lípido se une covalentemente al extremo 5' de la cadena sentido de un ARN de doble cadena, el ARN de doble cadena puede mostrar una eficiencia de absorción celular drásticamente mejorada, y también puede estar localizado en el citoplasma de las células.

Ejemplo 3 Síntesis de ARNs de Doble cadena, modificado con lípidos que fijan como Objetivo el Gen WT1

Utilizando una técnica diferente a la de los Ejemplos 1 y 2, una cadena sentido de doble cadena modificada con lípidos se sintetizó mediante el enlace de un lípido de doble cadena con al extremo 5' de la cadena sentido de un ARN de doble cadena capaz de suprimir la expresión del gen WT1.

En primer lugar, una cadena sentido y una cadena antisentido se prepararon de acuerdo con un método conocido. Posteriormente, la aminoalquilación del extremo 5' de la cadena sentido se realizó de acuerdo con un procedimiento convencional (el proceso de síntesis de fosforamidita) utilizando 5'-Amino-Modifier C6 (Glen Research), sintetizando de esta manera una cadena sentido modificada con un grupo aminoalquilo en el extremo 5'. En la cadena sentido sintetizada, modificada con un grupo aminoalquilo en el extremo 5', $-(CH_2)_6-NH_2$ se enlazó a través de un átomo de oxígeno al residuo fosfato del primer nucleótido desde el extremo 5'. La cadena sentido sintetizada, modificada con un grupo aminoalquilo en el extremo 5' fue emparejada con una cadena antisentido para producir un ARN de doble cadena (denominado en lo sucesivo en esta memoria el "ARN de doble cadena modificado con aminoalquilo "). El ARN de doble cadena se formó de acuerdo con el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente. El ARN de doble cadena modificado con aminoalquilo obtenido de este modo se mezcló con un derivado de lípido de doble cadena que contiene éster activo (DPPE-NHS (N-(succinimidil-glutaril)-L-α-fosfatidiletanolamina, dipalmitoílo); de NOF Corporation) disuelto en cloroformo en condiciones de condensación, para sintetizar un ARN de doble cadena, modificado con lípidos (ARN de doble cadena modificado con DPPE). Después de la reacción, la mezcla de reacción se purificó por HPLC para separar el reactivo no deseado en la mezcla de reacción que contiene el ARN de doble cadena, modificado con lípidos. La purificación por HPLC se realizó con tampón A: 100% de TEAA 20 mM (pH 7,0) y tampón B: 80% de CH_3CN/TEAA 20 mM (pH 7,0) en un gradiente lineal de 10-100% de tampón B a lo largo de un período de 50 minutos. CAP CELL (4,6 x 150 mm, 5 µm; Shiseido) se utilizó como la columna de purificación. La FIG. 12 muestra los resultados analíticos de HPLC a modo de ejemplo. El ARN de doble cadena, modificado con lípidos, purificado por HPLC, se liofilizó y se disolvió en agua purificada, después de lo cual la concentración y el rendimiento sintético de la misma se determinaron por análisis espectral UV. El ARN de doble cadena, modificado con lípidos fue confirmado por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20% (FIG. 13).

La estructura y el rendimiento del ARN de doble cadena sintetizado se muestran a continuación.



LISTADO DE SECUENCIAS
<110> NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

<110> OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<110> HAYASHI KASEI CO., LTD.

<120> ARN modificado con lípidos de dos colas con elevado efecto interferencia por ARN

<130> 2009000475

<150> JP 2008-094154
<151> 31-3-2008

<160> 12

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 27
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> L27A, Cadena sentido de ARNdc de 27nt

<400> 1
cuggccuuuc acuacuccua cgagcac 27

<210> 2
<211> 27
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> L27B, Cadena antisentido de ARNdc de 27nt

<400> 2
gugcucguag gagugaugaa aggccag 27

<210> 3
<211> 21
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> L21A, Cadena sentido de ARNip de 21nt

<400> 3
ggccuuucac uacuccuacg a 21

<210> 4
<211> 21
<212> ARN
<213> Artificial

<220>

<223> L21B, Cadena antisentido de ARNip de 21nt

<400> 4
guaggaguag ugaaaggcca g 21

<210> 5
<211> 27
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> v27A, Cadena sentido de ARNdc de 27nt

<400> 5
cuuccuacag cacaacaaau gugaaug 27

<210> 6
<211> 27
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> v27B, Cadena antisentido de ARNdc de 27nt

<400> 6
cauucacauu uguugugcug uaggaag 27

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

<220>
<223> v21A, Cadena sentido de ARNip de 21nt

<400> 7
uccuacagca caacaaaugu g 21

<210> 8
<211> 21
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> v21B, Cadena antisentido de ARNip de 21nt

<400> 8
cauuuguugu gcuguaggaa g 21

<210> 9
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador para VEGF

<400> 9

ccctgatgag atcgagtaca tctt 24

<210> 10
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador para VEGF

<400> 10
accgcctcgg cttgtcac 18

<210> 11
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador para GAPDH

<400> 11
ggaaagctgt ggcgtgatg 19

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador para GAPDH

<400> 12
ctgttgctgt agccgtattc 20

REIVINDICACIONES

1. Un ARN de doble cadena, modificado con lípidos, que comprende una cadena sentido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia diana en un gen diana, y una cadena antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la cadena sentido, siendo capaz el ARN de doble cadena de suprimir la expresión del gen diana, y teniendo la cadena sentido un lípido de doble cadena unido directamente o a través de un enlazador a al menos uno de los primeros a sextos nucleótidos desde el extremo 5', en donde el lípido de doble cadena es fosfatidiletanolamina.

2. El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de acuerdo con la reivindicación 1, que es de extremos romos en el lado del extremo 5' de la cadena sentido, y es de extremos romos o tiene un extremo colgante en el lado extremo 3' de la cadena sentido.

3. El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene extremos colgantes en ambos lados extremos 3' y 5' de la cadena sentido.

4. El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de acuerdo con una cualquiera de las la reivindicaciones 1 a 3, en donde la cadena sentido consiste en 21 a 27 nucleótidos.

5. El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de acuerdo con la reivindicación 2, que es
a) de extremos romos en ambos lados extremos 5' y 3' de la cadena sentido, consistiendo cada una de las cadenas sentido y antisentido en 27 nucleótidos; o
b) de extremos romos en ambos lados extremos 5' y 3' de la cadena sentido, consistiendo cada una de las cadenas sentido y antisentido en 23 nucleótidos; o
c) de extremos romos en el lado extremo 5' de la cadena sentido consistiendo la cadena sentido en 25 nucleótidos y consistiendo la cadena antisentido en 23 nucleótidos.

6. El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de acuerdo con la reivindicación 3, en donde cada una de las cadenas sentido y antisentido consiste en 21 nucleótidos.

7. El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dos grupos hidrófobos del lípido de doble cadena son iguales o diferentes, y cada uno es un residuo de ácido graso saturado o insaturado que tiene de 6 a 50 átomos de carbono.

8. El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el lípido de cadena doble es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en dimiristoilfosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidiletanolamina, 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidiletanolamina y dioleoilfosfatidiletanolamina.

9. El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el lípido está unido a al menos uno del primero a sexto nucleótidos desde el extremo 5' de la cadena sentido mediante un enlazador representado por la fórmula (L-27)
[Quím. 1]

$$-CO-(CH_2)_{n3}-CO-NH-(CH_2)_{n4}- \qquad (L\text{-}27)$$

en donde n3 y n4 son iguales o diferentes, y cada uno representa un número entero de 1 a 20.

10. Una composición farmacéutica, que comprende el ARN de doble cadena, modificado con lípidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y un soporte farmacéuticamente aceptable.

11. Uso del ARN de doble cadena, modificado con lípidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para producir una composición farmacéutica para suprimir la expresión de un gen diana.

12. El ARN de doble cadena, modificado con lípidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en un método para suprimir la expresión de un gen diana, que comprende una etapa de introducir en una célula el ARN de doble cadena, modificado con lípidos.

Fig. 1

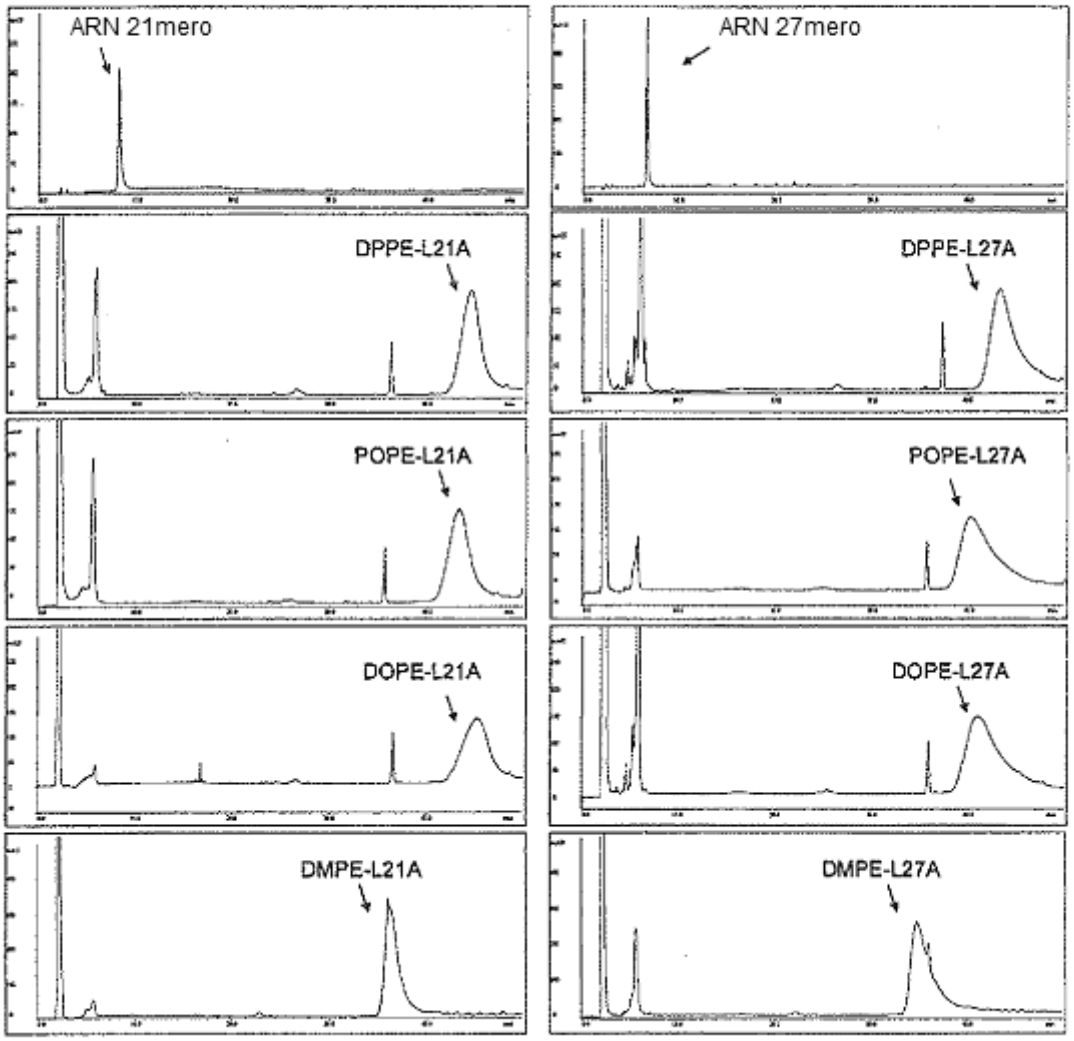
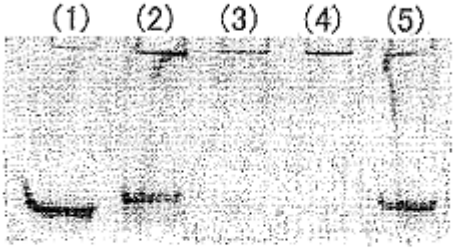

ARN 21mero
ARN 27mero
DPPE-L21A
DPPE-L27A
POPE-L21A
POPE-L27A
DOPE-L21A
DOPE-L27A
DMPE-L21A
DMPE-L27A

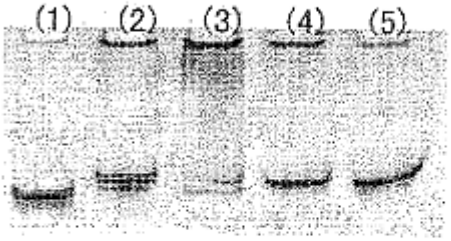
Fig. 2

A. ARNip de 21 nt Modificado con Lípidos



A
(1) ARNip de 21 nt
(2) DPPE L21A/L21B
(3) POPE L21A/L21B
(4) DOPE L21A/L21B
(5) DMPE L21A/L21B

B. ARNdc de 27 nt Modificado con Lípidos



B
(1) ARNdc de 27 nt
(2) DPPE L27A/L27B
(3) POPE L27A/L27B
(4) DOPE L27A/L27B
(5) DMPE L27A/L27B

Fig. 3

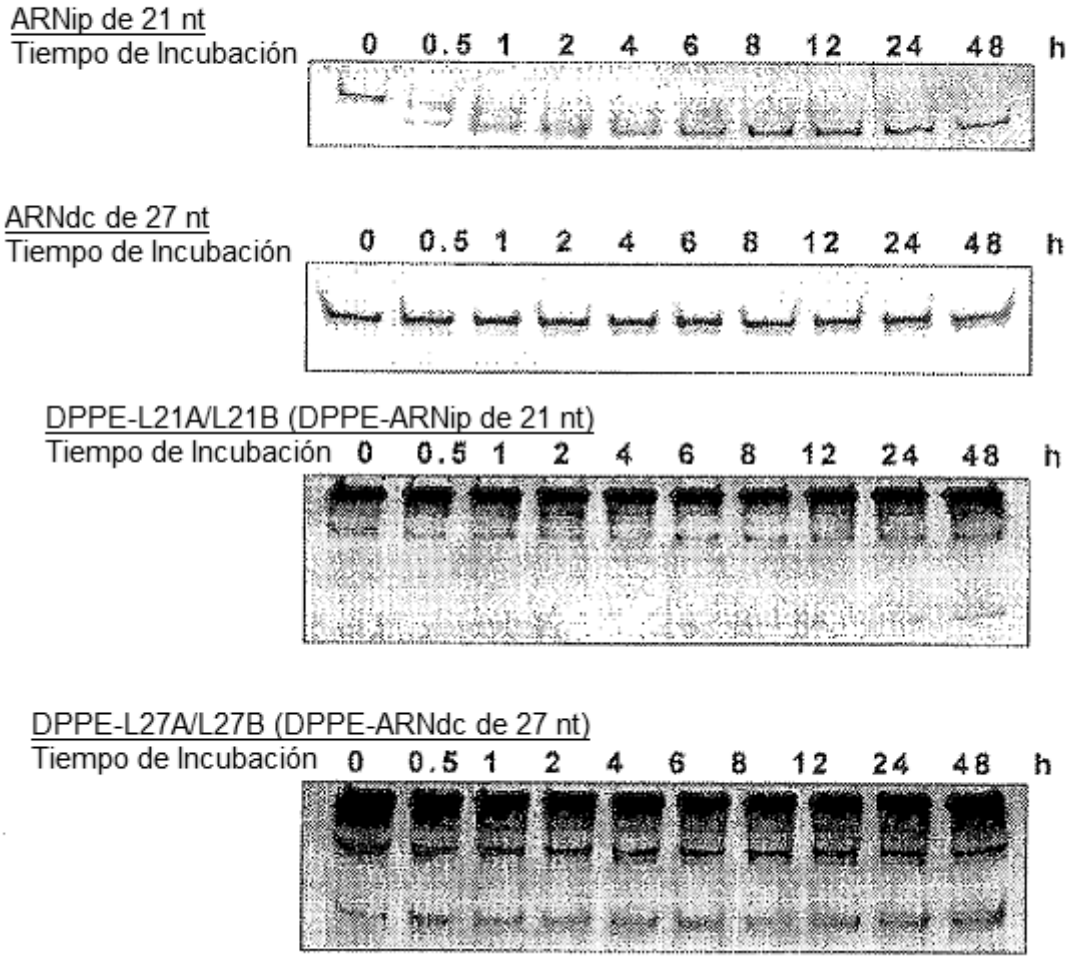

ARNip de 21 nt
Tiempo de Incubación
0 0.5 1 2 4 6 8 12 24 48 h
ARNdc de 27 nt
Tiempo de Incubación
0 0.5 1 2 4 6 8 12 24 48 h
DPPE-L21A/L21B (DPPE-ARNip de 21 nt)
Tiempo de Incubación 0 0.5 1 2 4 6 8 12 24 48 h
DPPE-L27A/L27B (DPPE-ARNdc de 27 nt)
Tiempo de Incubación 0 0.5 1 2 4 6 8 12 24 48 h

Fig. 4

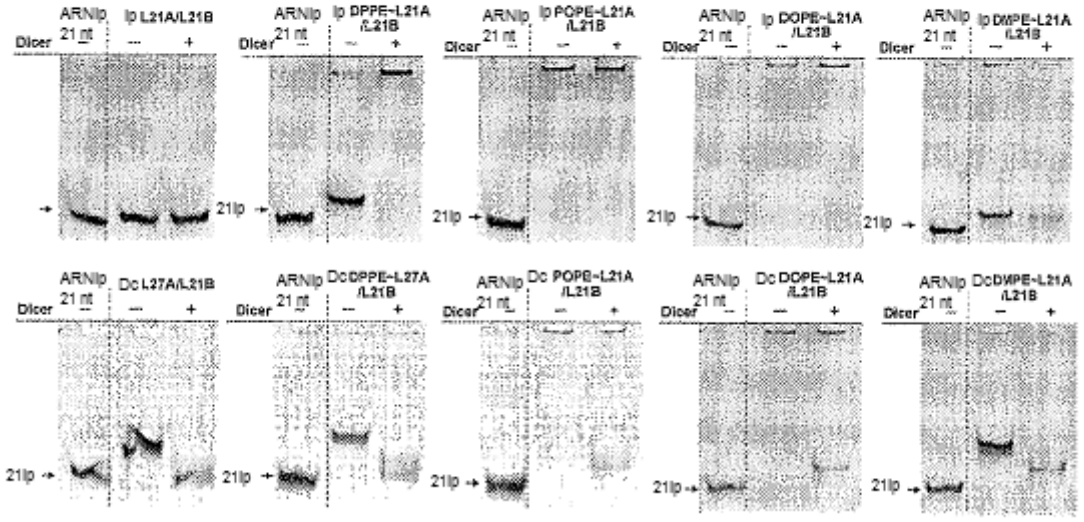

ARNIp 21 nt
Ip L21A/L21B
Ip DPPE-L21A /L21B
Ip POPE-L21A /L21B
Ip DOPE-L21A /L21B
Ip DMPE-L21A /L21B
Dc L27A/L21B
Dc DPPE-L27A /L21B
Dc POPE-L21A /L21B
Dc DOPE-L21A /L21B
Dc DMPE-L21A /L21B
Dicer
21Ip

Fig. 5

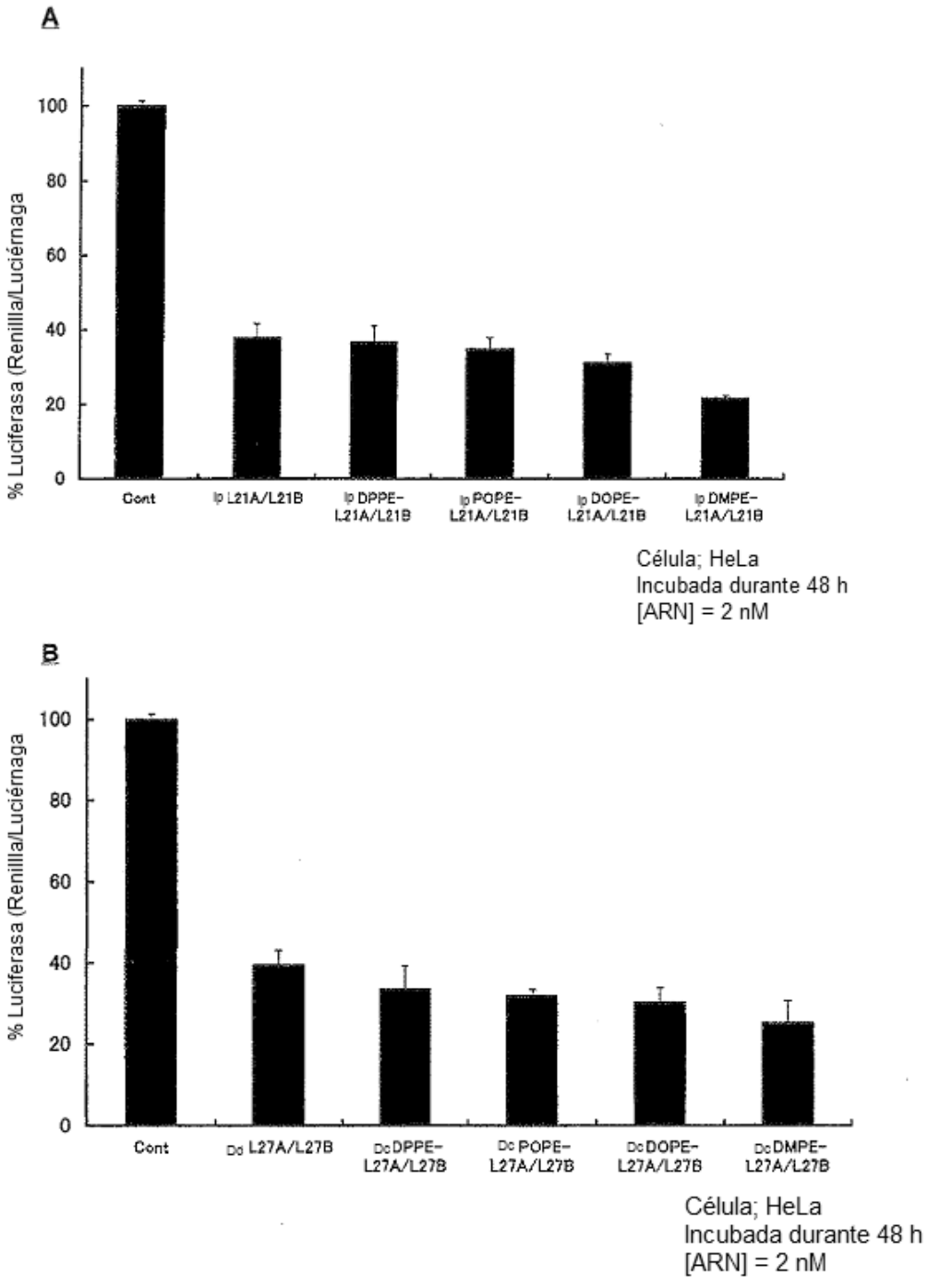

A
% Luciferasa (Renillla/Luciérnaga
100
80
60
40
20
0
Cont
lp L21A/L21B
lp DPPE-L21A/L21B
lp POPE-L21A/L21B
lp DOPE-L21A/L21B
lp DMPE-L21A/L21B
Célula; HeLa
Incubada durante 48 h
[ARN] = 2 nM
B
% Luciferasa (Renillla/Luciérnaga
100
80
60
40
20
0
Cont
Dc L27A/L27B
Dc DPPE-L27A/L27B
Dc POPE-L27A/L27B
Dc DOPE-L27A/L27B
Dc DMPE-L27A/L27B
Célula; HeLa
Incubada durante 48 h
[ARN] = 2 nM

Fig. 6

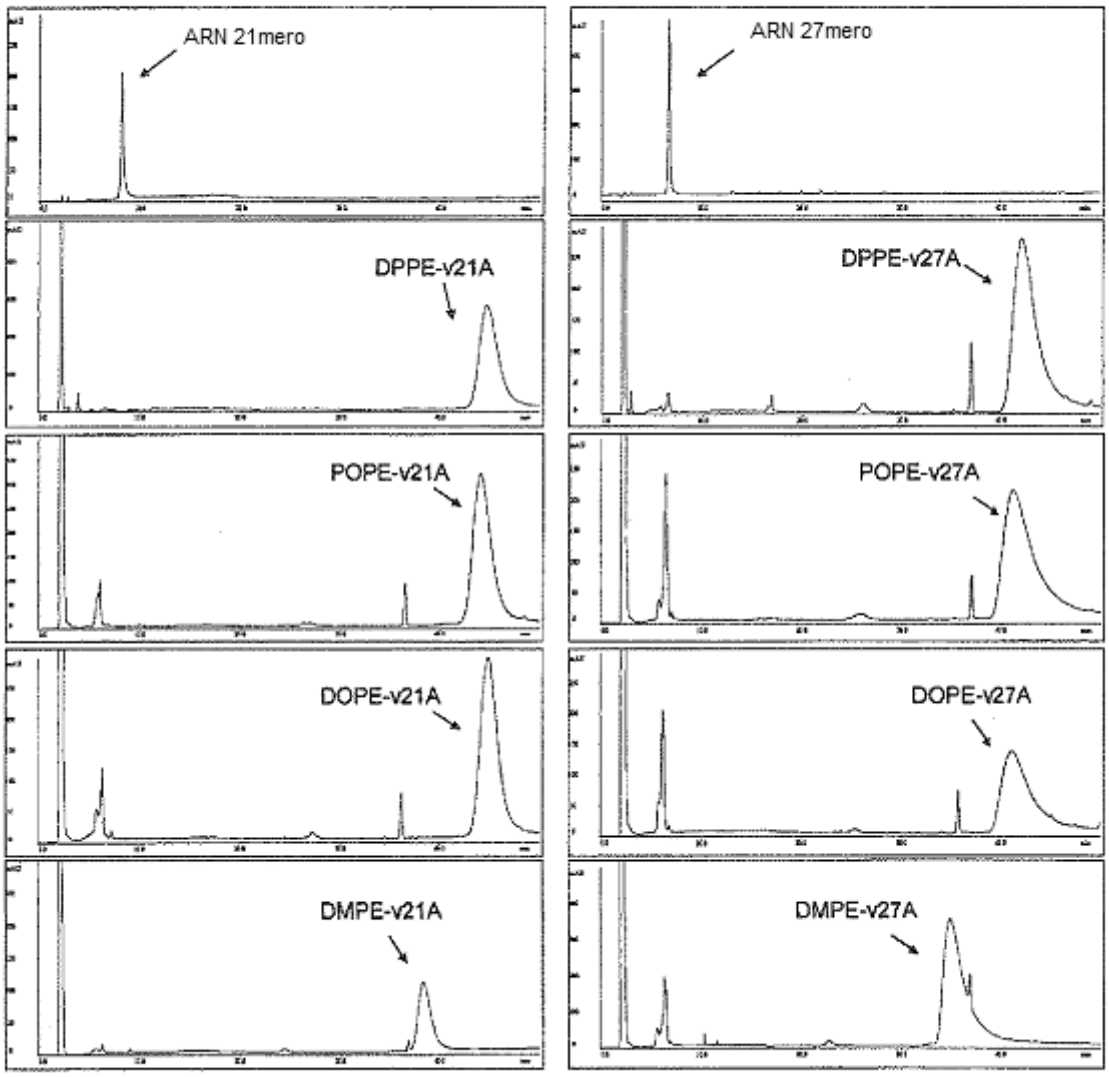
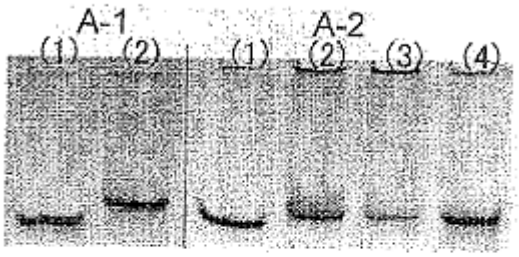

ARN 21mero
ARN 27mero
DPPE-v21A
DPPE-v27A
POPE-v21A
POPE-v27A
DOPE-v21A
DOPE-v27A
DMPE-v21A
DMPE-v27A

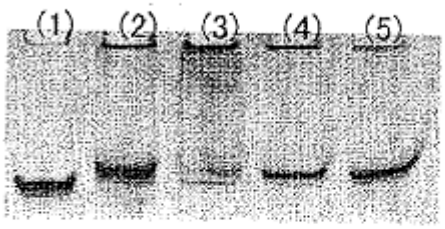
Fig. 7

A. ARNip de 21 nt Modificado con Lípidos



A-1
(1) ARNip de 21 nt
(2) DPPE v21A/v21B
A-2
(1) ARNip de 21 nt
(2) POPE v21A/v21B
(3) DOPE v21A/v21B
(4) DMPE v21A/v21B

B. ARNdc de 27 nt Modificado con Lípidos



B
(1) ARNdc de 27 nt
(2) DPPE v27A/v27B
(3) POPE v27A/v27B
(4) DOPE v27A/v27B
(5) DMPE v27A/v27B

Fig. 8

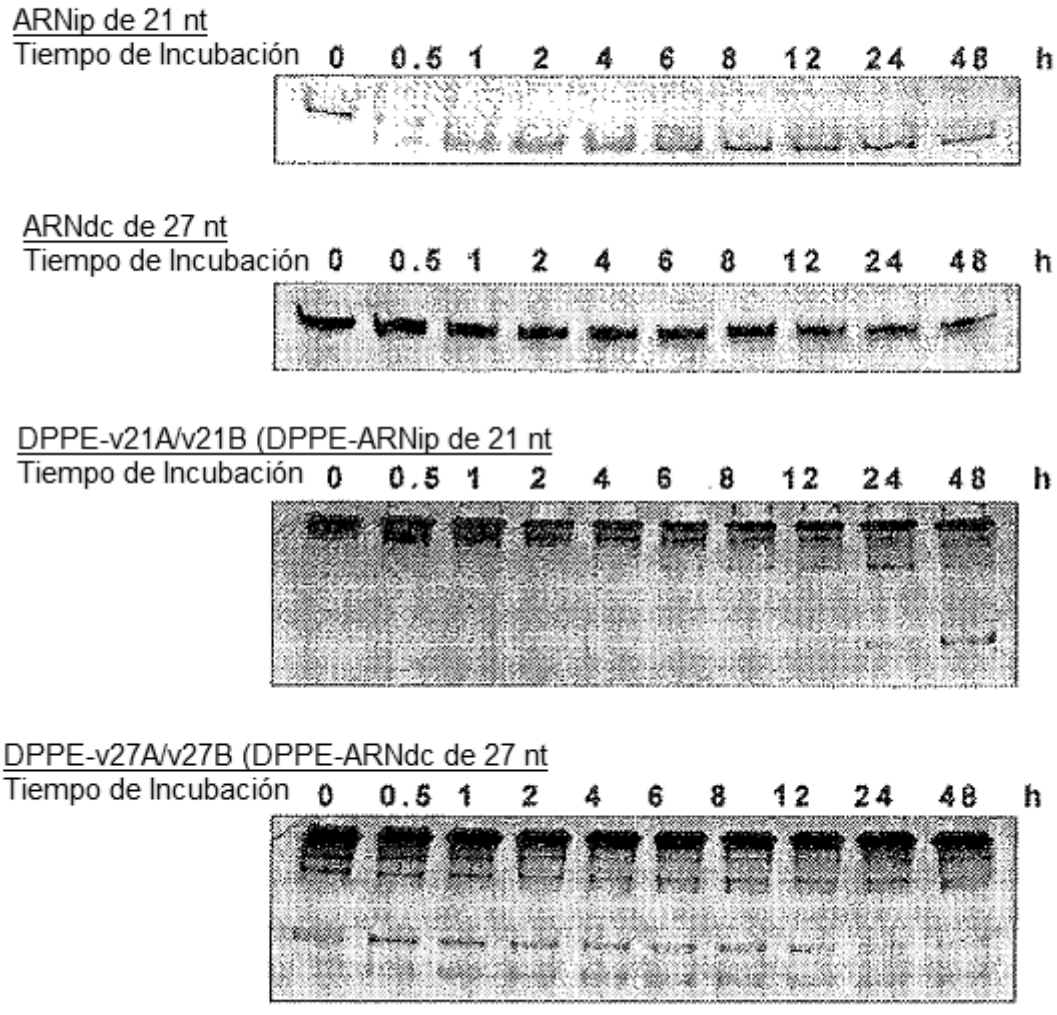

ARNip de 21 nt
Tiempo de Incubación 0 0.5 1 2 4 6 8 12 24 48 h
ARNdc de 27 nt
Tiempo de Incubación 0 0.5 1 2 4 6 8 12 24 48 h
DPPE-v21A/v21B (DPPE-ARNip de 21 nt
Tiempo de Incubación 0 0.5 1 2 4 6 8 12 24 48 h
DPPE-v27A/v27B (DPPE-ARNdc de 27 nt
Tiempo de Incubación 0 0.5 1 2 4 6 8 12 24 48 h

Fig. 9

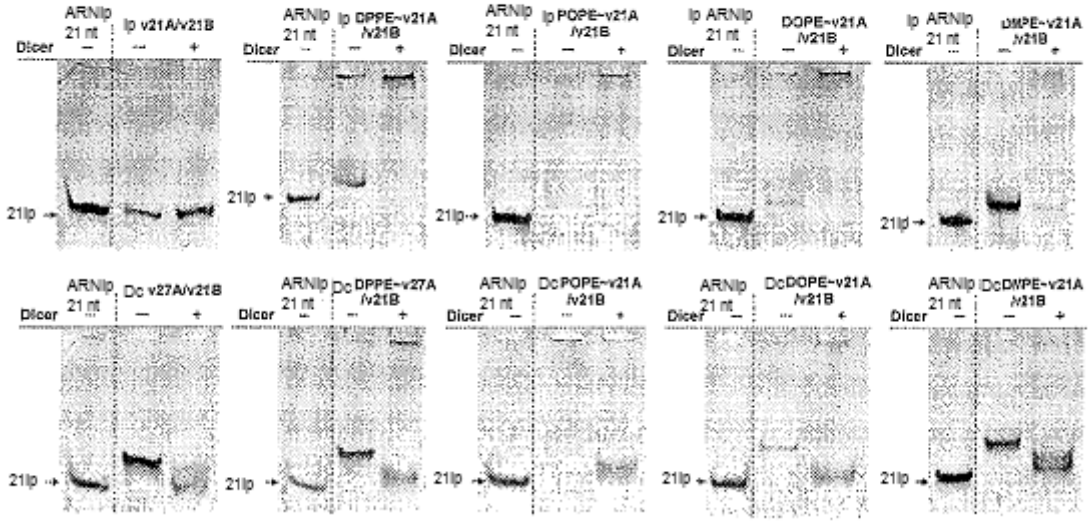

ARNlp 21 nt
lp v21A/v21B
Dicer
21lp
ARNlp 21 nt
lp DPPE-v21A /v21B
Dicer
21lp
ARNlp 21 nt
lp POPE-v21A /v21B
Dicer
21lp
lp ARNlp 21 nt
DOPE-v21A /v21B
Dicer
21lp
lp ARNlp 21 nt
DMPE-v21A /v21B
Dicer
21lp
ARNlp 21 nt
Dc v27A/v21B
Dicer
21lp
ARNlp 21 nt
Dc DPPE-v27A /v21B
Dicer
21lp
ARNlp 21 nt
Dc POPE-v21A /v21B
Dicer
21lp
ARNlp 21 nt
Dc DOPE-v21A /v21B
Dicer
21lp
ARNlp 21 nt
Dc DMPE-v21A /v21B
Dicer
21lp

Fig. 10

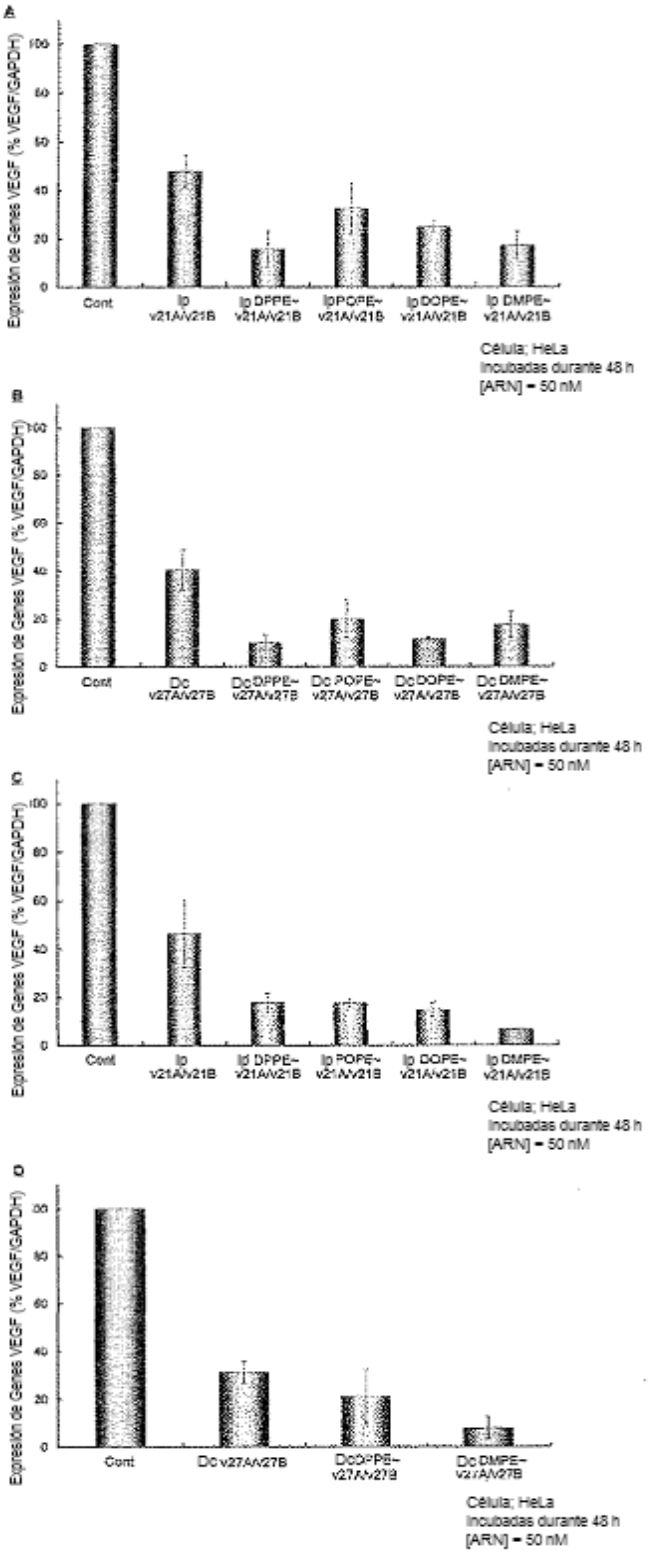

A
Expresión de Genes VEGF (% VEGF/GAPDH)
Cont
lp v21A/v21B
lp DPPE-v21A/v21B
lp POPE-v21A/v21B
lp DOPE-v21A/v21B
lp DMPE-v21A/v21B
Célula; HeLa
Incubadas durante 48 h
[ARN] = 50 nM
B
Expresión de Genes VEGF (% VEGF/GAPDH)
Cont
Dc v27A/v27B
Dc DPPE-v27A/v27B
Dc POPE-v27A/v27B
Dc DOPE-v27A/v27B
Dc DMPE-v27A/v27B
Célula; HeLa
Incubadas durante 48 h
[ARN] = 50 nM
C
Expresión de Genes VEGF (% VEGF/GAPDH)
Cont
lp v21A/v21B
lp DPPE-v21A/v21B
lp POPE-v21A/v21B
lp DOPE-v21A/v21B
lp DMPE-v21A/v21B
Célula; HeLa
Incubadas durante 48 h
[ARN] = 50 nM
D
Expresión de Genes VEGF (% VEGF/GAPDH)
Cont
Dc v27A/v27B
Dc DPPE-v27A/v27B
Dc DMPE-v27A/v27B
Célula; HeLa
Incubadas durante 48 h
[ARN] = 50 nM

Fig. 11-1

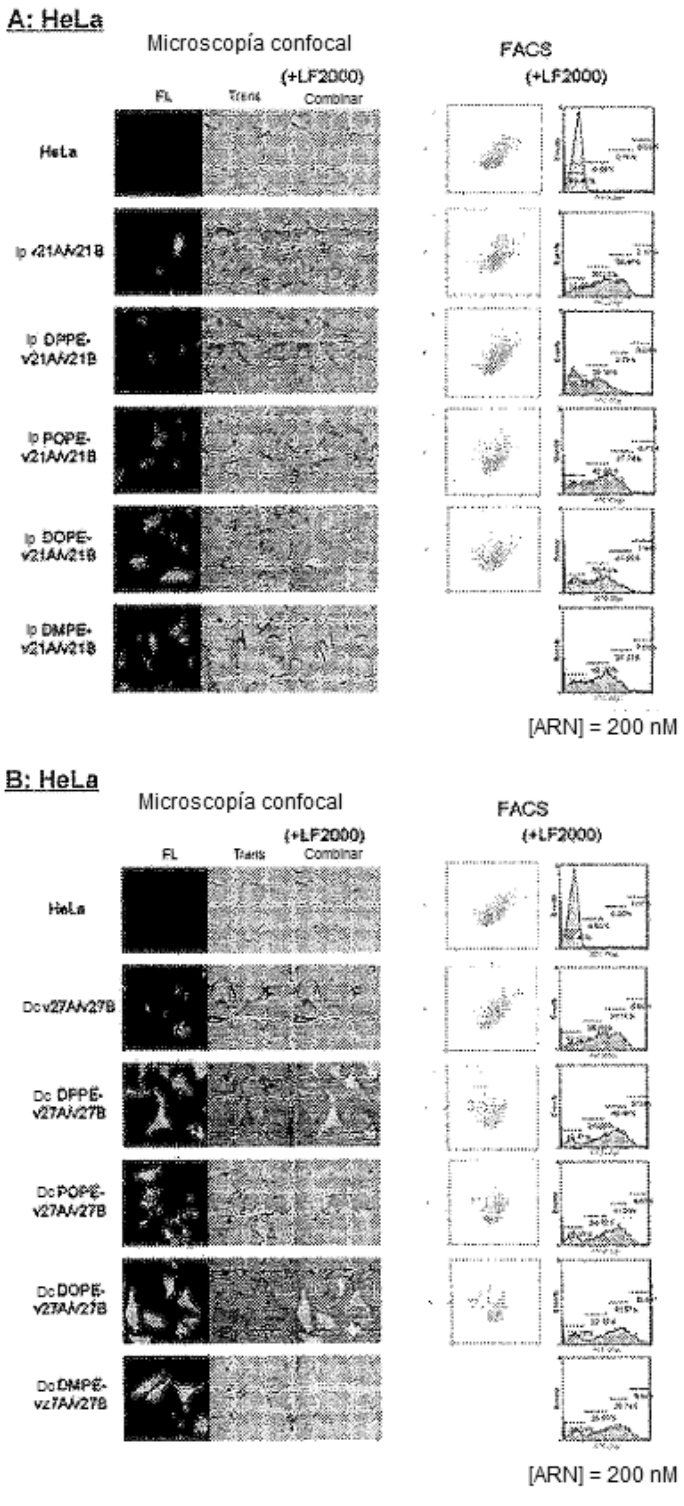

A: HeLa
Microscopía confocal
(+LF2000)
FL
Trans
Combinar
FACS
(+LF2000)
HeLa
lp v21AAv21B
lp DPPE-v21AAv21B
lp POPE-v21AAv21B
lp DOPE-v21AAv21B
lp DMPE-v21AAv21B
[ARN] = 200 nM
B: HeLa
Microscopía confocal
(+LF2000)
FL
Trans
Combinar
FACS
(+LF2000)
HeLa
Dc v27AAv27B
Dc DPPE-v27AAv27B
Dc POPE-v27AAv27B
Dc DOPE-v27AAv27B
Dc DMPE-v27AAv27B
[ARN] = 200 nM

Fig. 11-2

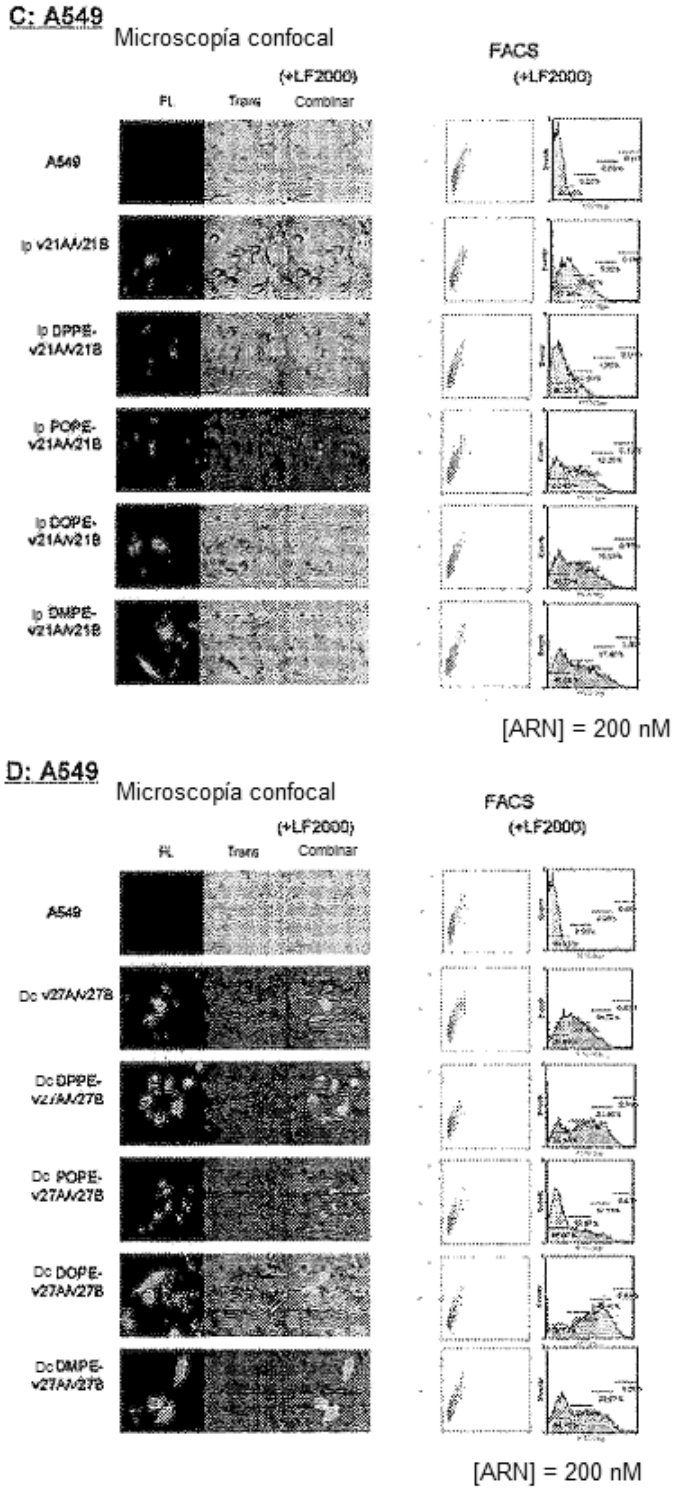

C: A549
Microscopía confocal
(+LF2000)
FL
Trans
Combinar
FACS
(+LF2000)
A549
lp v21AA/21B
lp DPPE-v21AA/21B
lp POPE-v21AA/21B
lp DOPE-v21AA/21B
lp DMPE-v21AA/21B
[ARN] = 200 nM
D: A549
Microscopía confocal
(+LF2000)
FL
Trans
Combinar
FACS
(+LF2000)
A549
Dc v27AA/27B
Dc DPPE-v27AA/27B
Dc POPE-v27AA/27B
Dc DOPE-v27AA/27B
Dc DMPE-v27AA/27B
[ARN] = 200 nM

Fig. 12

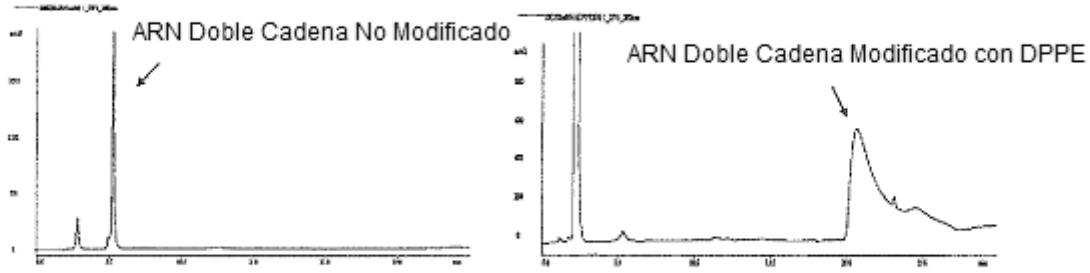
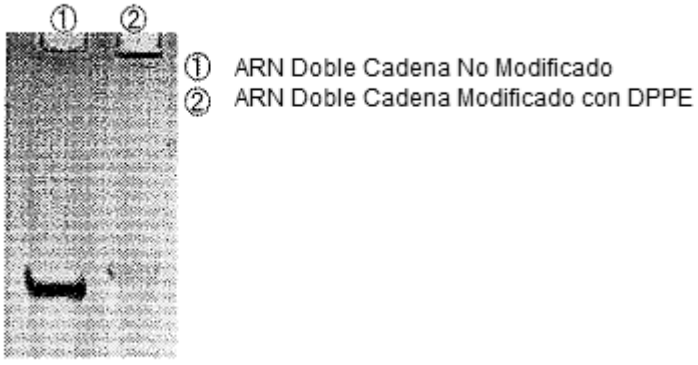

ARN Doble Cadena No Modificado
ARN Doble Cadena Modificado con DPPE

Fig. 13


①
②
① ARN Doble Cadena No Modificado
② ARN Doble Cadena Modificado con DPPE