

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 877**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.08.2008 PCT/US2008/074528**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2009 WO09029688**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2008 E 08828867 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2193140**

54 Título: **Composiciones de ARN interferente asimétrico y uso de las mismas**

30 Prioridad:

27.08.2007 US 968257 P
19.02.2008 US 29753 P
24.03.2008 US 38954 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.06.2017

73 Titular/es:

1GLOBE HEALTH INSTITUTE LLC (100.0%)
333 Providence Highway
Norwood, MA 02062, US

72 Inventor/es:

LI, CHIANG, JIA;
SUN, XIANGAO;
ROGOFF, HARRY y
LI, YOUZHI

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 617 877 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de ARN interferente asimétrico y uso de las mismas.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El silenciamiento génico a través de ARNi (ARN de interferencia) mediante el uso de ARN interferente pequeño o corto (siRNA) ha surgido como una poderosa herramienta para la biología molecular y tiene el potencial de ser utilizado con fines terapéuticos (de Fougerolles y col., 2007; Kim y Rossi, 2007).

10

El ARNi puede emplearse teóricamente para atenuar o silenciar cualquier gen de la enfermedad con especificidad y potencia. Las posibles aplicaciones del ARNi para fines terapéuticos son extensas e incluyen enfermedades genéticas, epigenéticas, e infecciosas, a condición de que se identifique un gen causante de la enfermedad.

15 Sin embargo, aparte del prominente problema de administración, el desarrollo de fármacos basados en ARNi se enfrenta a los desafíos de la limitada eficacia del siRNA, los efectos no específicos del siRNA, tal como respuestas tipo interferón y el silenciamiento génico no específico mediado por una cadena codificante, y el prohibitivo o alto coste asociado a la síntesis de siRNA. La eficacia del silenciamiento génico por siRNA se limita a aproximadamente el 50 % o menos para la mayoría de genes en células de mamíferos. La fabricación de estas moléculas es costosa (mucho más costosa que la fabricación de desoxinucleótidos no codificantes), ineficiente, y requiere modificación química. Finalmente, la observación de que la administración extracelular de siRNA sintéticos puede desencadenar respuestas tipo interferón ha añadido una barrera importante para la investigación basada en el ARNi y el desarrollo terapéutico basado en ARNi.

25 El ARNi puede activarse selectivamente por ARN interferente corto sintético (siRNA) o elementos genéticos que codifican ARN de horquilla cortos (shRNA) que posteriormente se escinden en siRNA por la enzima tipo ribonucleasa III, Dicer. El mecanismo bioquímico de silenciamiento génico, aún no entendido completamente, parece implicar un complejo de silenciamiento inducido por ARN multi-proteína (RISC). RISC se une, se desenrolla, e incorpora la cadena de siRNA no codificante, que después reconoce y dirige ARNm perfectamente complementarios para la escisión, reduciendo de ese modo la expresión génica. El potente silenciamiento génico (1-10 días) es atribuible a las propiedades catalíticas del complejo RISC. La potencia del ARNi se deriva de la exquisita especificidad que se puede lograr. Sin embargo, se sabe que ocurren efectos del ARNi no específicos. Otro efecto secundario importante es la activación de la respuesta tipo interferón por siRNA, que está mediada a través de los receptores de proteína cinasa dependiente de dsRNA (PKR) y los receptores de tipo Toll (TLR). La capacidad para inducir una respuesta de tipo interferón por siRNA se determina principalmente por su longitud. (*ibídem.*)

30 Para el silenciamiento génico en células de mamíferos, la técnica actual enseña que la estructura del siRNA es un ARN bicatenario simétrico con una longitud de 19-21 nucleótidos y salientes 3' en ambos extremos para ser eficaz en células de mamífero y para evitar respuestas celulares innatas "antivíricas". (*ibídem.*) Actualmente está bien establecido en el campo que esta estructura "óptima" todavía puede desencadenar respuestas de interferón, y plantean retos importantes para el desarrollo de la investigación basada en el ARNi y productos terapéuticos basados en ARNi (Sledz y col., 2003).

45 El documento WO 2005/079533 describe composiciones para mediar el silenciamiento génico. El siRNA descrito puede ser canónico o tener extremos no canónicos.

Leuschner Philipp J.F. y col. (2006, EMBO Reports vol. 7, n.º 3 págs. 314-320) describe la escisión de la cadena acompañante de siRNA durante el ensamblaje RISC en células humanas. Todos los dúplex de siRNA descritos contienen salientes 2 nt simétricos en el extremo 3'.

50

El documento WO 2009/078685 describe siRNA que comprende una cadena no codificante de 19 a 21 nt y una cadena codificante de 15-19 nt que tiene una secuencia complementaria a la secuencia no codificante, en el que el extremo 5' de la cadena no codificante tiene un extremo romo y el extremo 3' de la cadena no codificante tiene un saliente.

55

Existe la necesidad de desarrollar nuevos enfoques para ARNi eficaz en células de mamífero a través de un novedoso diseño de siRNA que tenga mejor eficacia y potencia, rápido inicio de acción, una mejor durabilidad, y una longitud más corta del dúplex de ARN para evitar una respuesta de tipo interferón no específica y reducir el coste de la síntesis para la investigación y el desarrollo farmacéutico de productos terapéuticos de ARNi.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención trata sobre un sorprendente descubrimiento de una nueva clase de ARN dúplex pequeño que puede inducir el silenciamiento génico potente en células de mamífero, que se denomina en el presente documento ARN interferentes asimétricos (aiRNA). El sello distintivo de esta nueva clase de inductores de ARNi es la asimetría de la longitud de las dos cadenas de ARN. Tal diseño estructural novedoso no sólo es funcionalmente potente en la realización del silenciamiento génico, sino que ofrece varias ventajas sobre los siRNA del estado de la técnica actual. Entre las ventajas, aiRNA puede tener una estructura dúplex de ARN de longitud mucho más corta que el siRNA actual, lo que debería reducir el coste de la síntesis y suprimir/reducir la activación dependiente de la longitud de las respuestas de tipo interferón no específicas. Además, la asimetría de la estructura de aiRNA suprime/reduce los efectos no específicos mediados por cadena codificante. Además, aiRNA es más eficaz, potente, de inicio rápido, y duradero que siRNA en la inducción del silenciamiento génico. Puede usarse aiRNA en todas las áreas en las que el siRNA o shRNA actual se están aplicando o se completa que se usen, incluyendo la investigación biológica, investigación de I + D en biotecnología y la industria farmacéutica, y las terapias basadas en el ARNi.

La presente invención proporciona una molécula dúplex de ARN interferente asimétrico que consiste en:

una cadena no codificante, que consiste en 19-23 nucleótidos, en la que la cadena no codificante contiene un saliente 3' y un saliente 5', y en la que el saliente 3' consiste en nucleótidos de ARN, y una cadena codificante, que consiste en 14-17 nucleótidos,

en la que la cadena codificante es al menos un 70 % complementaria a la cadena no codificante, en la que la cadena no codificante es al menos un 70 % complementaria a un ARNm diana; y en la que la cadena no codificante y la cadena codificante forman una región bicatenaria de 14, 15, 16 o 17 pares de bases nucleotídicas.

También se describe una molécula de ARN dúplex que comprende una primera cadena con una longitud de 18-23 nucleótidos y una segunda cadena con una longitud de 12-17 nucleótidos, en la que la segunda cadena es sustancialmente complementaria a la primera cadena, y forma una región bicatenaria con la primera cadena, en la que la primera cadena tiene un saliente 3' de 1-9 nucleótidos, y un saliente 5' de 0-8 nucleótidos, en la que dicha molécula de ARN dúplex es capaz de realizar el silenciamiento génico selectivo en una célula eucariota.

En una realización, la primera cadena comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria a una secuencia de ARNm diana. En una realización adicional, la primera cadena comprende una secuencia que es al menos un 70 por ciento complementaria a una secuencia de ARNm diana. En otra realización, la célula eucariota es una célula de mamífero o una célula de ave.

En una realización, al menos un nucleótido de la secuencia del saliente 5' se selecciona entre el grupo que consiste en A, U, y dT.

En una realización, el contenido de GC de la región bicatenaria es del 30 %-70 %.

En una realización, la primera cadena tiene una longitud de 19-22 nucleótidos.

En una realización, la primera cadena tiene una longitud de 21 nucleótidos. En una realización adicional, la segunda cadena tiene una longitud de 14-16 nucleótidos.

En una realización, la primera cadena tiene una longitud de 21 nucleótidos, y la segunda cadena tiene una longitud de 15 nucleótidos. En una realización adicional, la primera cadena tiene un saliente 3' de 2-4 nucleótidos. Aún en una realización adicional, la primera cadena tiene un saliente 3' de 3 nucleótidos.

En una realización, la molécula de ARN dúplex contiene al menos un nucleótido modificado o su análogo. En una realización adicional, el al menos un nucleótido modificado o su análogo es un ribonucleótido modificado en azúcar, estructura y/o base. Aún en una realización adicional, el ribonucleótido modificado en estructura tiene una modificación en un enlace fosfodiéster con otro ribonucleótido. En una realización, el enlace fosfodiéster está modificado para incluir al menos uno de un heteroátomo de nitrógeno o azufre. En otra realización, el análogo nucleotídico es un ribonucleótido modificado en estructura que contiene un grupo fosfotioato.

En una realización, el al menos un nucleótido modificado o su análogo es una base inusual o una base modificada. En otra realización, el al menos un nucleótido modificado o su análogo comprende inosina, o una base tritilada.

En una realización adicional, el análogo nucleotídico es un ribonucleótido modificado en azúcar, en el que el grupo
5 2'-OH se reemplaza por un grupo seleccionado entre H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, o CN, en el que cada R es independientemente alquilo, alquenilo o alquinilo C1-C6, y halo es F, Cl, Br o I.

En una realización, la primera cadena comprende al menos un desoxinucleótido. En una realización adicional, los al menos un desoxinucleótidos están en una o más regiones seleccionadas entre el grupo que consiste en un saliente
10 3', un saliente 5', y una región bicatenaria. En otra realización, la segunda cadena comprende al menos un desoxinucleótido.

La molécula de ARN dúplex de la reivindicación 1 puede servir para su uso en un método de modulación de la expresión génica en una célula o un organismo, que comprende las etapas de poner en contacto dicha célula u
15 organismo con la molécula de ARN dúplex de la reivindicación 1 en condiciones en las que puede producirse un silenciamiento génico selectivo, y mediar un silenciamiento génico selectivo realizado por la molécula de ARN dúplex hacia un gen diana o ácido nucleico que tiene una porción de secuencia sustancialmente correspondiente al ARN bicatenario. En una realización adicional, dicha etapa de contacto comprende la etapa de introducir dicha molécula de ARN dúplex en una célula diana en cultivo o en un organismo en el que puede producirse un silenciamiento
20 génico selectivo. Aún en una realización adicional, la etapa de introducción se selecciona entre el grupo que consiste en transfección, lipofección, electroporación, infección, inyección, administración oral, inhalación administración tópica y regional. En otra realización, la etapa de introducción comprende usar un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable seleccionado entre el grupo que consiste en un vehículo farmacéutico, un vehículo de carga positiva, un liposoma, un vehículo de proteína, un polímero, una nanopartícula, una nanoemulsión, un lípido y
25 un lipóide.

En una realización, el método de modulación se usa para determinar la función o utilidad de un gen en una célula o un organismo.

30 En una realización, el método de modulación se usa para tratar o prevenir una enfermedad o una afección no deseable.

En una realización, el gen diana está asociado a una enfermedad, una afección patológica, o una afección no deseable en un mamífero. En una realización adicional, el gen diana es un gen de un microorganismo patógeno.
35 Aún en una realización adicional, el gen diana es un gen vírico. En otra realización, el gen diana es un gen asociado a tumor. En otra realización más, el gen diana es un gen asociado a una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades degenerativas, enfermedades infecciosas, enfermedades proliferativas, enfermedades metabólicas, trastornos mediados por procesos inmunitarios, enfermedades alérgicas, enfermedades dermatológicas, enfermedades neoplásicas,
40 trastornos gastrointestinales, trastornos respiratorios, trastornos cardiovasculares, trastornos renales, trastornos reumatoides, trastornos neurológicos, trastornos endocrinos y envejecimiento.

La presente divulgación proporciona un reactivo de investigación. El reactivo comprende la molécula de ARN dúplex.

45 La presente divulgación proporciona adicionalmente un kit. El kit comprende una primera cadena de ARN con una longitud de 18-23 nucleótidos y una segunda cadena de ARN con una longitud de 12-17 nucleótidos, en el que la segunda cadena es sustancialmente complementaria a la primera cadena, y es capaz de formar una molécula de ARN dúplex con la primera cadena, en el que la molécula de ARN dúplex tiene un saliente 3' de 1-9 nucleótidos, y un saliente 5' de 0-8 nucleótidos, en el que dicha molécula de ARN dúplex es capaz de realizar un silenciamiento
50 génico específico de secuencia en una célula eucariota.

La presente divulgación también proporciona un método para preparar la molécula de ARN dúplex. El método comprende las etapas de sintetizar la primera cadena y la segunda cadena, y combinar las cadenas sintetizadas en condiciones, en las que la molécula de ARN dúplex se forma, que sea capaz de realizar un silenciamiento génico
55 específico de secuencia. El método puede comprender adicionalmente una etapa de introducir al menos un nucleótido modificado o su análogo en la molécula de ARN dúplex durante la etapa de sintetización, después de la etapa de sintetización y antes de la etapa de combinación, o después de la etapa de combinación. En otra realización, las cadenas de ARN se sintetizan químicamente, o se sintetizan biológicamente.

La presente divulgación proporciona un vector de expresión. El vector comprende un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican la molécula de ARN dúplex unida operativamente al menos a una secuencia de control de la expresión. El vector puede comprender un primer ácido nucleico que codifica la primera cadena unida operativamente a una primera secuencia de control de la expresión, y un segundo ácido nucleico que codifica la segunda cadena unida operativamente a una segunda secuencia de control de la expresión. El vector puede ser un vector de expresión vírica, eucariota o bacteriana.

La presente divulgación también proporciona una célula. La célula puede comprender el vector. La célula puede comprender la molécula de ARN dúplex. La célula puede ser una célula de mamífero, de ave o bacteriana.

La presente invención proporciona una molécula de ARN dúplex. La molécula de ARN dúplex comprende una primera cadena y una segunda cadena, en la que la primera cadena es mayor que la segunda cadena, en la que la segunda cadena es sustancialmente complementaria a la primera cadena, y forma una región bicatenaria con la primera cadena, en la que dicha molécula de ARN dúplex es capaz de realizar un silenciamiento génico selectivo en una célula eucariota. En aspectos de la divulgación, los dos extremos de la molécula de ARN dúplex se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en un saliente 3' de 1-10 nucleótidos, un saliente 5' de 0-10 nucleótidos, y un extremo romo. En una realización, la primera cadena es sustancialmente complementaria a una secuencia de ARNm diana. En un aspecto alternativo de esta divulgación, la segunda cadena es sustancialmente complementaria a una secuencia de ARNm diana. En una realización, la célula eucariota es una célula de mamífero o una célula de ave. En otra realización, la molécula de ARN dúplex es una molécula de ARN dúplex aislada.

En un aspecto, la primera cadena tiene un saliente 3' de 1-8 nucleótidos y un saliente 5' de 1-8 nucleótidos.

En otro aspecto, la primera cadena tiene un saliente 3' de 1-10 nucleótidos y un extremo romo.

Aún en otro aspecto más, la primera cadena tiene un saliente 5' de 1-10 nucleótidos y un extremo romo.

En un aspecto alternativo, el dúplex de ARN tiene dos salientes 5' de 1-8 nucleótidos, o dos salientes 3' de 1-10 nucleótidos.

En un aspecto, la primera cadena tiene una longitud de 12-100 nucleótidos, de 12-30 nucleótidos, de 18-23 nucleótidos, de 19-25 nucleótidos. En una realización, la primera cadena tiene una longitud de 21 nucleótidos.

En otro aspecto, la segunda cadena tiene una longitud de 5-30 nucleótidos, 12-22 nucleótidos, 12-17 nucleótidos. En una realización, la segunda cadena tiene una longitud de 15 nucleótidos.

En un aspecto, la primera cadena tiene una longitud de 12-30 nucleótidos, y la segunda cadena tiene una longitud de 10-29 nucleótidos, con la condición de que cuando la región bicatenaria sea de 27 pb, ambos extremos de la molécula de ARN sean independientemente un saliente 3' o un saliente 5'. En un aspecto adicional, la primera cadena tiene una longitud de 18-23 nucleótidos, y la segunda cadena tiene una longitud de 12-17 nucleótidos.

En otro aspecto, la primera cadena tiene una longitud de 19-25 nucleótidos, y la segunda cadena tiene una longitud de 12-17 nucleótidos.

En un aspecto alternativo, la primera cadena tiene una longitud de 19-25 nucleótidos, y la segunda cadena tiene una longitud de 18-24 nucleótidos,

con la condición de que cuando la primera cadena sea

5'-UJCGAAGUAUCCGCGUACGU

5'-UCGAAGUAUCCGCGUACGUG o

5'-CGAAGUAUCCGCGUACGUGA

la segunda cadena tenga una longitud de como mucho 17 nucleótidos, o contenga al menos una incompatibilidad con la primera cadena, o contenga al menos una modificación.

En un aspecto, la primera cadena tiene una longitud de 21 nucleótidos y la segunda cadena tiene una longitud de 12-17 nucleótidos, o 14-16 nucleótidos.

En un aspecto, la primera cadena es de 1-10 nucleótidos mayor que la segunda cadena.

En un aspecto, el saliente 3' tiene una longitud de 2-6 nucleótidos.

En otro aspecto, el saliente 5' tiene una longitud de 0-5 nucleótidos.

5

En un aspecto, el silenciamiento génico comprende uno o dos, o cada uno de ARN de interferencia, modulación de la traducción, y modulaciones epigenéticas de ADN.

En un aspecto, la molécula de ARN dúplex comprende adicionalmente una mella en al menos una de dicha primera y segunda cadenas.

10

En otro aspecto, la región bicatenaria comprende un hueco de uno o más nucleótidos.

En una realización, al menos un nucleótido del saliente 5' no es complementario a la secuencia de ARNm diana.

15

En otra realización, al menos un nucleótido del saliente 5' se selecciona entre el grupo que consiste en A, U, y dT.

En una realización, la molécula de ARN dúplex se conjuga con una entidad seleccionada entre el grupo que consiste en péptido, anticuerpo, polímero, lípido, oligonucleótido, colesterol y adaptámero.

20

En una realización, la molécula de ARN comprende adicionalmente al menos un nucleótido desajustado o desigual.

En otra realización, el contenido de GC de la región bicatenaria es del 20-70 %.

25 En una realización, el saliente 3' y/o el saliente 5' se estabilizan contra la degradación.

En una realización, la molécula de ARN dúplex contiene al menos un nucleótido modificado o su análogo. En una realización adicional, el al menos un nucleótido modificado o su análogo es un ribonucleótido modificado en azúcar, estructura y/o base. En una realización adicional, el ribonucleótido modificado en estructura tiene una modificación en un enlace fosfodiéster con otro ribonucleótido. En otra realización, el enlace fosfodiéster está modificado para incluir al menos uno de un heteroátomo de nitrógeno o azufre. En otra realización más, el análogo nucleotídico es un ribonucleótido modificado en estructura que contiene un grupo fosfotioato.

30

En una realización, el al menos un nucleótido modificado o su análogo comprende una base no natural o una base modificada. En otra realización, el al menos un nucleótido modificado o su análogo comprende inosina, o una base tritilada.

35

En una realización adicional, el análogo nucleotídico es un ribonucleótido modificado en azúcar, en el que el grupo 2'-OH se reemplaza por un grupo seleccionado entre H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NIIR, NR₂) o CN, en el que cada R es independientemente alquilo, alquenoilo o alquinilo C1-C6, y halo es F, Cl, Br o I.

40

En una realización, la primera cadena comprende al menos un desoxinucleótido. En una realización adicional, los al menos un desoxinucleótidos están en una o más regiones seleccionadas entre el grupo que consiste en un saliente 3', un saliente 5', y una región bicatenaria próxima al extremo 5' de la primera cadena. En otra realización, la segunda cadena comprende al menos un desoxinucleótido.

45

La presente invención se refiere también a la modulación de la expresión génica en una célula o un organismo. La molécula de ARN dúplex de la reivindicación 1 es para su uso en un método de modulación de la expresión génica en una célula o un organismo, comprendiendo el método poner en contacto la célula u organismo con la molécula de ARN dúplex en condiciones en las que puede producirse un silenciamiento génico selectivo, y mediar un silenciamiento génico selectivo realizado por el ARN bicatenario hacia un ácido nucleico diana que tiene una porción de secuencia sustancialmente correspondiente al ARN bicatenario. En una realización adicional, dicho contacto comprende la etapa de introducir dicha molécula de ARN dúplex en una célula diana en cultivo o en un organismo en el que puede producirse un silenciamiento génico selectivo. Aún en una realización adicional, la etapa de introducción se selecciona entre el grupo que consiste en transfección, lipofección, electroporación, infección, inyección, administración oral, inhalación administración tópica y regional. En otra realización, la etapa de introducción comprende usar un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable seleccionado entre el grupo que consiste en un vehículo farmacéutico, un vehículo de carga positiva, un liposoma, un vehículo de proteína, un polímero, una nanopartícula, una nanoemulsión, un lípido y un lipóide. En una realización, el método de

50

55

modulación se usa para modular la expresión de un gen en una célula o un organismo.

En otra realización, el método de modulación se usa para tratar o prevenir una enfermedad o una afección no deseable.

5

En una realización, el gen diana es un gen asociado a enfermedades humanas o animales. En una realización adicional, el gen es un gen de un microorganismo patógeno. Aún en una realización adicional, el gen diana es un gen vírico. En otra realización, el gen es un gen asociado a tumor.

- 10 En otra realización más, el gen diana es un gen asociado a una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades degenerativas, enfermedades infecciosas, enfermedades proliferativas, enfermedades metabólicas, trastornos mediados por procesos inmunitarios, enfermedades alérgicas, enfermedades dermatológicas, enfermedades neoplásicas, trastornos gastrointestinales, trastornos respiratorios, trastornos cardiovasculares, trastornos renales, trastornos reumatoides,
15 trastornos neurológicos, trastornos endocrinos y envejecimiento.

El método de modulación también puede usarse para estudiar la diana farmacológica *in vitro* o *in vivo*.

La presente divulgación proporciona un reactivo que comprende la molécula de ARN dúplex.

20

La presente divulgación proporciona adicionalmente un kit. El kit comprende una primera cadena de ARN y una segunda cadena de ARN, en el que la primera cadena es mayor que la segunda cadena, en el que la segunda cadena es sustancialmente complementaria a la primera cadena, y capaz de formar una molécula de ARN dúplex con la primera cadena, en el que dicha molécula de ARN dúplex es capaz de realizar un silenciamiento génico
25 específico de secuencia en una célula eucariota.

- La presente divulgación también proporciona un método para preparar la molécula de ARN dúplex de la reivindicación 1 que comprende las etapas de sintetizar la primera cadena y la segunda cadena, y combinar las cadenas sintetizadas en condiciones, en el que la molécula de ARN dúplex se forma, que es capaz de realizar un
30 silenciamiento génico específico de secuencia. En un aspecto, las cadenas de ARN se sintetizan químicamente, o se sintetizan biológicamente. En otro aspecto, la primera cadena y la segunda cadena se sintetizan por separado o simultáneamente.

- En un aspecto, el método comprende adicionalmente una etapa de introducir al menos un nucleótido modificado o
35 su análogo en la molécula de ARN dúplex durante la etapa de sintetización, después de la etapa de sintetización y antes de la etapa de combinación, o después de la etapa de combinación.

- La presente divulgación proporciona adicionalmente una composición farmacéutica. La composición farmacéutica comprende como un agente activo al menos una molécula de ARN dúplex y uno o más vehículos seleccionados
40 entre el grupo que consiste en un vehículo farmacéutico, un vehículo de carga positiva, un liposoma, un vehículo de proteína, un polímero, una nanopartícula, un colesterol, un lípido y un lipóide.

- La presente divulgación también proporciona un método de tratamiento. El método comprende administrar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica a un sujeto que lo necesita. En una realización, la composición
45 farmacéutica se administra a través de una ruta seleccionada entre el grupo que consiste en administración iv, sc, por inhalación, tópica, po y regional.

- En una realización, la primera cadena comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria a la secuencia de ARNm diana de un gen seleccionado entre el grupo que consiste en un gen de desarrollo, un oncogén,
50 un gen supresor de tumor, y un gen enzimático, y un gen para una molécula de adhesión, un inhibidor de ciclina cinasa, un miembro de la familia Wnt, un miembro de la familia Pax, un miembro de la familia de hélice alada, un miembro de la familia Hox, una citocina/linfocina o su receptor, un factor de crecimiento/diferenciación o su receptor, un neurotransmisor o su receptor, una cinasa, un transductor de señal, un gen vírico, un gen de una enfermedad infecciosa, ABLI, BCLI, BCL2, BCL6, CBFA2, CBL, CSFIR, ERBA, ERBB, EBRB2,ETS1, ETS1, ETV6, FGR, FOS,
55 FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MDM2, MLL, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, NRAS, PIM1, PML, RET, SRC, TAL1, TCL3 y YES, APC, BRCA1, BRCA2, MADH4, MCC, NF1, NF2, RB1, TP53, WT1, una ACP desaturasa o hidroxilasa, una ADP-glucosa piroforilasa, una ATPasa, una alcohol deshidrogenasa, una amilasa, una amiloglucosidasa, una catalasa, una celulasa, una ciclooxigenasa, una descarboxilasa, una dextrinasa, una ADN o ARN polimerasa, una galactosidasa, una glucanasa, una glucosa oxidasa, una GTPasa, una helicasa, una

hemicelulasa, una integrasa, una invertasa, una isomerasa, una cinasa, una lactasa, una lipasa, una lipoxigenasa, una lisozima, una pectinesterasa, una peroxidasa, una fosfatasa, una fosfolipasa, una fosforilasa, una poligalacturonasa, una proteinasa o peptidasas, una pulanasa, una recombinasa, una transcriptasa inversa, una topoisomerasa, una xilanasas, k-RAS, β -Catenina, Rsk1, PCNA, p70S6K, Survivina, mTOR, PTEN, Parp1, o p21.

5

Las moléculas de ARN dúplex pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en

aiNbs1	5' -AUGCUGUGUAAACUG UAGUACGACACAAUUGACGAA-5'
aiEF2	5' -CCUCUUAUGAUGUAAU CCGGGAGAAUACUACAUAUAA-5'
aiStat3-A	5' -AGCAAAGAAUCACAU CGGUCGUUUCUAGUGUACAA-5'
aiStat3-B	5' -GAAUCUCAACUUCAG CGUCUUAAGAGUUGAAGUCUAA-5'
aiPTEN	5' -UAAAGGUGAAGAUUU UCGAUUUCCACUUCUAUAUAA-5'
aip70S6K	5' -UGUUUGAUUUUGGAUU GGCACAAACUAAACCUAUAAAA-5'
aimTOR	5' -GAAUUGUCAAGGGAU CGUCUUAACAGUCCCUAUAA-5'
aiRsk1	5' -AAUUGGAACACAGUU CCUUUAACCUUGUGUCAAAAA-5'
aiPCNA	5' -AGAUGCUGUUGUAAU ACCUCUACGACAACAUAUAAAA-5'
aiParp1	5' -GCGAAGAAGAAAUCU CACCGCUUCUUCUUUAGAUAA-5'
aiSurvivina	5' -AGGAGAUCAACAUUU dTdTUUCUCUAGUUGUAAAAGU-5'
aiNQO1	5' -GCAGACCUUGUGAUA CGGCGUCUGGAACACUAUAAA-5'
aip21-A	5' -CCC GCUCUACAUCUU UCCGGGCGAGUUGAAGAA-5'
aip21-B	5' -GGCGGUUGAAUGAGA GAUCCGCCAACUUACUCUCAA-5'
aik-Ras	5' -GGAGCUGUUGGCGUA CAACCUCGACAACCGCAUCAA-5'
ai β -catenina-1	5' -GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
ai β -catenina-2	5' -GAUAUUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
ai β -catenina-4	5' -CUGAUUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
ai β -catenina-5	5' -AGCUGAUUUGAUGG CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
ai β -catenina-8	5' -UAGCUGAUUUGAUG CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
ai β -catenina-9	5' -UGAUUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
ai β -catenina-10	5' -GCUGAUUUGAUGGA UCAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
ai β -catenina-11	5' -GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAAA-5'
ai β -catenina-18	5' -GCUGAUUUGAUGGA AUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
ai β -catenina-34	5' -GCUGAUUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
ai β -catenina-35	5' -AGCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'

aiβ-catenina-36	5' -AGCUGAUUUGAUGGAC CAUCGACUUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-catenina-37	5' -AGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-catenina-38	5' -UAGCUGAUUUGAUGGAC CAUCGACUUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-catenina-39	5' -GCUGAUUUGAUGGACUU CAUCGACUUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-catenina-40	5' -AGCUGAUUUGAUGGACUU CAUCGACUUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-catenina-42	5' -UAGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-catenina-43	5' -UAGCUGAUUUGAUGGACUU CAUCGACUUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-catenina-44	5' -GUAGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-catenina-45	5' -GCUGAUUUGAAGGA CAUCGACUUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-catenina-46	5' -GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUUAACUACCUGUC - 5'
aiβ-catenina-47	5' -GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUUAACUACCUGaa - 5'
aiβ-catenina-46	5' -GCUGAUUUGAUGGA catCGACUUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-catenina-52	5' -gCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-catenina-53	5' -GCUGAUUUGAUGGa CAUCGACUUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-catenina-57	5' -gCUGAUUUGAUGGA catCGACUUAACUACCUGAA - 5'
aiβ-catenina-59	5' -GCUGAUUUGAUGGa catCGACUUAACUACCUGAA - 5'
	y
aiβ-catenina-62	5' -UAGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUUAACUACCUGaa - 5'

en las que A, U, G y C son nucleótidos, mientras que a, t, g y c son desoxinucleótidos.

5 La presente divulgación proporciona un método para modificar una primera de la molécula de ARN dúplex con una cadena no codificante y una cadena codificante que forman una región bicatenaria. El método comprende, acortar la longitud de la cadena codificante de manera que la cadena no codificante tenga un saliente 3' de 1-8 nucleótidos y un saliente 5' de 0-8 nucleótidos, y formar una segunda molécula de ARN dúplex; en el que se mejora al menos una propiedad de la primera molécula de ARN dúplex.

10 La propiedad se selecciona entre el grupo que consiste en tamaño, eficacia, potencia, la velocidad de aparición, durabilidad, coste de síntesis, efectos no específicos, respuesta a interferón, y administración.

15 El método puede comprender adicionalmente combinar la cadena no codificante y la cadena codificante corta en condiciones, en las que se forma la segunda molécula de ARN dúplex. La primera molécula de ARN dúplex puede ser un siRNA, o un siRNA de sustrato Dicer, o un precursor de siRNA.

20 La presente divulgación proporciona un vector de expresión. El vector comprende un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican una molécula de ARN dúplex tal como de la reivindicación 1 unida operativamente al menos a una secuencia de control de la expresión. El vector de expresión puede comprender un primer ácido nucleico que codifica la primera cadena unida operativamente a una primera secuencia de control de la expresión, y un segundo ácido nucleico que codifica la segunda cadena unida operativamente a una segunda secuencia de control de la expresión. El vector de expresión puede ser un vector de expresión vírica, eucariota, o un vector de expresión bacteriana.

La presente divulgación también proporciona una célula. La célula puede comprender el vector de expresión. La célula puede comprender la molécula de ARN dúplex. En otra realización más, la célula es una célula de mamífero, una célula de ave o una célula bacteriana.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1A muestra la estructura de una molécula de ARN dúplex que tiene tanto un saliente 3' como un saliente 5' en la primera cadena.

10 La figura 1B muestra la estructura de una molécula de ARN dúplex que tiene tanto un saliente 3' como un saliente 5' en la primera cadena, y una mella en el dúplex.

La figura 1C muestra la estructura de una molécula de ARN dúplex que tiene tanto un saliente 3' como un saliente 5' en la primera cadena, y un hueco en la segunda cadena.

La figura 2A muestra la estructura de una molécula de ARN dúplex que tiene un extremo romo, y un saliente 5' en la primera cadena.

15 La figura 2B muestra la estructura de una molécula de ARN dúplex que tiene un extremo romo, y un saliente 3' en la primera cadena.

La figura 2C muestra la estructura de una molécula de ARN dúplex que tiene salientes 3' en ambos extremos del dúplex y que la primera cadena es mayor que la segunda cadena.

20 La figura 2D muestra la estructura de una molécula de ARN dúplex que tiene salientes 5' en ambos extremos del dúplex y que la primera cadena es mayor que la segunda cadena.

La figura 3 muestra la inducción del silenciamiento génico de β -catenina por aiRNA (ARN interferentes asimétricos).

25 La figura 3A muestra la confirmación de los oligos. Después de la hibridación, los oligos se confirmaron en un 20 % de gel de poliacrilamida. Carril 1, 21 nt/21 nt; carril 2, 12 nt(a)/21 nt; carril 3, 12 nt(b)/21 nt; carril 4, 13 nt/13 nt; carril 5, 13 nt/21 nt; carril 6, 14 nt/14 nt; carril 7, 14 nt(a)/21 nt; carril 8, 14 nt(b)/21 nt; carril 9, 15 nt/15 nt; carril 10, 15 nt/21 nt.

30 La figura 3B muestra los efectos de los oligos en el silenciamiento génico. Las células HeLa se pusieron en placas a 200.000 células/pocillo en una placa de cultivo de 6 pocillos, 24 horas más tarde se transfectaron con siRNA desordenado (carril 1), E2F1 dirigido a siRNA de 21 pb (carril 2, como un control para especificidad) o beta-catenina dirigida a siRNA de 21 pb (carril 3, como control positivo), o la misma concentración de aiRNA de diferente mezcla de longitud: 12 nt(a)/21 nt (carril 4); 12 nt (b)/21 nt (carril 5); 13 nt/21 nt (carril 6); 14 nt (a)/21 nt (carril 7); 14 nt (b)/21 nt (carril 8); 15 nt/21 nt (carril 9). Las células se cosecharon 48 horas después de la transfección. La expresión de β -catenina se determinó por transferencia Western. E2F1 y actina se usan como controles.

35 Las figuras 4 y 5 muestran la relación estructura-actividad de los oligos de aiRNA, con o sin sustituciones de bases, en la medicación del silenciamiento génico. Las células Hela se transfectaron con el aiRNA indicado. Las células se cosecharon y los lisados se generaron 48 horas después de la transfección. Se realizaron transferencia de Western para detectar los niveles de β -catenina y actina. si se refiere a un oligonucleótido de siRNA de β -catenina. El marcado numérico por encima de cada carril corresponde a los oligos de aiRNA en la Tabla 3.

La figura 6 muestra los análisis del mecanismo del silenciamiento génico activado por aiRNA.

La figura 6a muestra el análisis de transferencia northern de los niveles de ARNm de β -catenina en las células transfectadas con aiRNA o siRNA para el número de días indicado.

45 La figura 6b muestra el esquema de PCR 5'-RACE para β -catenina que muestra la escisión de ARNm y el producto de PCR esperado.

La figura 6c muestra que los productos de escisión de β -catenina mediados por aiRNA se amplificaron por PCR 5'-RACE a partir de células transfectadas con aiRNA durante 4 o 8 horas.

La figura 6d muestra el esquema del sitio de escisión de ARNm de β -catenina confirmado por la secuenciación del fragmento de PCR 5'-RACE.

50 La figura 6e muestra la eficiencia de la carga de RISC diferencial de aiRNA y siRNA. Los dúplex de aiRNA o siRNA se transfectaron en células Hela 48 horas después de la transfección con pCMV-Ago2. Ago2 se inmunoprecipitó en los puntos temporales indicados tras la transfección de aiRNA o siRNA, y se realizó un análisis de transferencia northern para determinar los niveles de ARN pequeño asociado a Ago2/RISC. Los niveles de Ago2 (mostrados a continuación) se determinaron por transferencia western tras IP.

55 La figura 6f muestra los efectos de atenuar Ago2 o Dicer en la actividad de silenciamiento génico de aiRNA y siRNA. Las células se transfectaron con siRNA desordenado (siCon), o Ago2 dirigido a siRNA (siAgo2), o Dicer (siDicer) 24 horas antes de la transfección con aiRNA desordenado (Con) o Stat3 dirigido a aiRNA (ai). Las células se cosecharon y se realizó un análisis de transferencia western 48 horas tras la transfección de aiStat3.

La figura 7 muestra las ventajas de la incorporación de aiRNA en RISC en comparación con siRNA.

La figura 7A muestra que aiRNA se introduce en RISC con mejor eficiencia que siRNA. Las células transfectadas con un plásmido de expresión de Ago2 se transfectaron con aiRNA o siRNA durante los tiempos indicados. Tras la lisis celular, Ago2 se inmunoprecipitó, el ARN se extrajo del inmunoprecipitado, y se separó en un gel de acrilamida al 15 %. Tras la transferencia, la membrana se hibridó en una sonda para detectar la cadena no codificante 21 mer de los aiRNA o siRNA. El carril de control de IgG muestra la falta de señal en comparación con el inmunoprecipitado de Ago2.

La figura 7B muestra que la cadena codificante de aiRNA no permanece en RISC. La membrana de (A) se dividió y se sondó de nuevo para detectar la cadena codificante del oligo transfectado. Los dibujos en (A) y (B) ilustran la posición de la cadena codificante (cadena superior), la cadena no codificante (cadena inferior), o el dúplex en la membrana.

La figura 8 muestra el mecanismo de carga de RISC por aiRNA.

La figura 8A muestra los análisis de inmunoprecipitación de la interacción entre diferentes cadenas de aiRNA o siRNA y Ago2. El lisado S-10 de Hela que contenía Ago2 sobreexpresado se incubó con el dúplex de aiRNA o siRNA indicado que contenía cadenas codificantes y no codificantes marcadas en el extremo con ^{32}P . (*) marca la ubicación de la etiqueta. Tras la inmunoprecipitación de Ago2, el ARN se aisló y se separó en un gel de acrilamida al 15 % y se expuso a una película. Los ARN asociados a Ago2 se muestran en la fracción de sedimento, mientras que los ARN no unidos a Ago2 permanecen en el sobrenadante (Sup).

La figura 8B muestra la función de la escisión de la cadena codificante en la actividad de aiRNA. Las células se transfectaron con aiRNA o aiRNA con 2'-O-metilo de cadena codificante en la posición 8 (sitio de escisión de Ago2 predicho) o la posición 9 como control. El ARN se recogió 4 horas después de la transfección y la qRT-PCR se realizó para determinar los niveles relativos de ARNm de β -catenina restantes.

La figura 9 muestra los análisis de competición de aiRNA y siRNA.

La figura 9A ilustra el dúplex de siRNA y aiRNA que contiene cadenas no codificantes etiquetadas en el extremo con ^{32}P . (*) marca la ubicación de la etiqueta.

La figura 9B muestra que el aiRNA frío no compite con el siRNA marcado para Ago2. El lisado S-10 de Hela que contenía Ago2 sobreexpresado se incubó con el siRNA etiquetado en el extremo con ^{32}P y el dúplex frío de aiRNA o siRNA antes de la inmunoprecipitación de Ago2. Después, el ARN se aisló y se analizó en gel de acrilamida al 15 %.

La figura 9C muestra que el siRNA frío no compite con el aiRNA marcado para Ago2. El mismo lisado S-10 usado en B se incubó con el aiRNA etiquetado en el extremo con ^{32}P y dúplex frío de aiRNA o siRNA antes de la inmunoprecipitación de Ago2. Después, el ARN se aisló y se analizó en gel de acrilamida al 15 %.

La figura 10 ilustra el modelo de aiRNA y siRNA que muestra las diferencias observadas en la carga de RISC y la generación de RISC maduro.

La figura 11 muestra que los dúplex de ARN asimétrico de 14-15 pb con salientes no codificantes (aiRNA) indujeron un silenciamiento génico potente, eficaz, rápido y duradero.

La figura 11A muestra el diagrama que muestra la secuencia y el diseño de siRNA y aiRNA dirigidos a β -catenina.

La figura 11B muestra la inducción del silenciamiento génico por aiRNA de diversas longitudes. Los niveles de proteína de β -catenina se analizaron por transferencia western en células transfectadas con el aiRNA indicado durante 48 horas.

La figura 11C muestra que aiRNA es más potente y eficaz que siRNA en la inducción de agotamiento de la proteína de β -catenina. Las células Hela se transfectaron con aiRNA o siRNA dirigidos a β -catenina a las concentraciones indicadas. 48 horas después de la transfección, se hicieron lisados celulares y se hizo un análisis de transferencia western.

La figura 11D muestra que el aiRNA es más eficaz, rápido y duradero que siRNA en la reducción de los niveles de ARN de β -catenina. Las células se transfectaron con 10 nM de aiRNA de 15 pb o siRNA de 21 mer durante el número indicado de días antes del análisis de transferencia northern.

La figura 12 muestra que aiRNA media un silenciamiento rápido y potente.

La figura 12A muestra la secuencia y la estructura de aiRNA y siRNA usados para dirigirse a β -catenina.

La figura 12B muestra RT-PCR de los niveles de ARNm de β -catenina de las células transfectadas con aiRNA o aiRNA de control dirigidos a β -catenina. El ARN se recogió en los momentos indicados después de la transfección.

La figura 12C muestra la RT-PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de ARNm de β -catenina en células transfectadas con control, aiRNA, o siRNA durante el número indicado de horas.

La figura 12D muestra el análisis de transferencia western de los niveles de proteína de β -catenina en células transfectadas con control, aiRNA, o siRNA durante los tiempos indicados.

La figura 13 muestra la comparación de aiRNA con siRNA en la eficacia del silenciamiento génico y la durabilidad contra múltiples dianas. Las células Hela se transfectaron con siRNA desordenado (c), aiRNA (ai), o siRNA (si) dirigidos a (a) β -catenina a 10 nM, (b) *Stat3*, (c) *EF2*, o (d) *NQO1* a 20 nM. ARN y la proteína se purificaron en los puntos temporales indicados y se analizaron para determinar los niveles de ARNm mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) y los niveles de proteína por transferencia western. Los datos de qRT-PCR se normalizan con respecto a las células transfectadas siCon.

La figura 14 muestra que el silenciamiento génico mediado por aiRNA es eficaz contra diversos genes en múltiples líneas celulares.

La figura 14a muestra que un dúplex de aiRNA es más eficaz que siRNA en el direccionamiento a β -catenina en diferentes líneas de células de mamífero.

La figura 14b muestra el análisis de transferencia western de *Nbs1*, *Survivina*, *Parp1*, *p21* de células transfectadas con 20 nM del aiRNA o siRNA indicado durante 48 horas.

La figura 14c muestra el análisis de transferencia western de *Rsk1*, *PCNA*, *p70S6K*, *mTOR*, y *PTEN* de células transfectadas con 20 nM del aiRNA o siRNA indicado durante 48 horas.

La figura 14d muestra el silenciamiento génico específico de alelos de *k-Ras* por aiRNA. El aiRNA dirigido a *k-Ras* de tipo silvestre se ensayó para el silenciamiento de *k-Ras* tanto en líneas celulares de *k-Ras* de tipo silvestre (DLD1) como de *k-Ras* mutante (SW480) por análisis de transferencia western.

La figura 15 muestra la falta de silenciamiento génico no específico mediante la cadena codificante, inmunoestimulación y estabilidad en suero de los aiRNA.

La figura 15a muestra un análisis de RT-PCR de la expresión de genes inducibles de interferón en control PBMC tratados o incubados con dúplex de siRNA o aiRNA de β -catenina durante 16 horas.

La figura 15b muestra un análisis RT-PCR de la expresión de genes inducibles de interferón en células Hela transfectadas con control o transfectadas con aiRNA o siRNA de *EF2* o *Survivina* durante 24 horas.

La figura 15c muestra el análisis de micromatrices para determinar los cambios en la expresión de genes relacionados con la respuesta a interferón conocidos. El ARN total aislado de células Hela transfectadas con aiRNA y siRNA se analizó por micromatriz.

La figura 15d muestra que no se detecta ningún silenciamiento génico no específico mediado por cadena codificante para aiRNA. Las células se co-transfectaron con aiRNA o siRNA y un plásmido que expresaba *Stat3* (ARN codificante) o un plásmido que expresaba *Stat3* no codificante (ARN no codificante). Las células se cosecharon y el ARN se recogió 24 horas después de la transfección y los niveles relativos de ARN codificante o no codificante de *Stat3* se determinaron por PCR o RT-PCR cuantitativa en tiempo real (inserciones).

La figura 15e muestra la estabilidad de dúplex de aiRNA y siRNA en suero humano. Los dúplex de aiRNA y siRNA se incubaron en suero humano al 10 % a 37 °C durante la cantidad indicada de tiempo antes de la electroforesis en gel. Se indica el dúplex restante (% de control).

La figura 15f ilustra el modelo propuesto para el silenciamiento específico de genes mediado por el dúplex de aiRNA.

La figura 16 muestra la potente actividad antitumoral de aiRNA contra β -catenina en un modelo de ratón de xenoinjerto de colon humano SW480. A los ratones inmunosuprimidos con cáncer de colon humano SW480 subcutáneo establecido se les administró por vía intravenosa (iv) 0,6 mmol de siRNA de β -catenina complejados con PEI, aiRNA de β -catenina complejados con PEI o un siRNA no relacionado complejado con PEI como control negativo diario. El tamaño del tumor se evaluó periódicamente durante el tratamiento. Cada punto representa la media \pm SEM de seis tumores.

La figura 17 muestra la potente actividad antitumoral de aiRNA contra β -catenina en un modelo de ratón de xenoinjerto de colon humano HT29. A los ratones inmunosuprimidos con cáncer de colon humano HT29 subcutáneo establecido se les dio por vía intravenosa (iv) 0,6 nmol siRNA de β -catenina complejados con PEI, aiRNA de β -catenina complejados con PEI o un siRNA no relacionado complejado con PEI como control cada dos días. El tamaño del tumor se evaluó periódicamente durante el tratamiento. Cada punto representa la media \pm SEM de cinco tumores.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una molécula de ARN dúplex asimétrico que es capaz de realizar un silenciamiento génico selectivo en una célula eucariota. En una realización, la molécula de ARN dúplex comprende una primera cadena y una segunda cadena. La primera cadena es más larga que la segunda cadena. La segunda cadena es sustancialmente complementaria a la primera cadena, y forma una región bicatenaria con la primera cadena.

En una realización, la molécula de ARN dúplex tiene un saliente 3' de 1-8 nucleótidos y un saliente 5' de 1-8 nucleótidos, un saliente 3' de 1-10 nucleótidos y un extremo romo, o un saliente 5' de 1-10 nucleótidos y un extremo romo. En otra realización, la molécula de ARN dúplex tiene dos salientes 5' de 1-8 nucleótidos o dos salientes 3' de 1-10 nucleótidos. En una realización adicional, la primera cadena tiene un saliente 3' de 1-8 nucleótidos y un saliente 5' de 1-8 nucleótidos. Aún en una realización adicional, la molécula de ARN dúplex es una molécula de ARN dúplex aislada.

En una realización, la primera cadena tiene un saliente 3' de 1-10 nucleótidos, y un saliente 5' de 1-10 nucleótidos o un extremo romo 5'. En otra realización, la primera cadena tiene un saliente 3' de 1-10 nucleótidos, y un saliente 5' de 1-10 nucleótidos. En una realización alternativa, la primera cadena tiene un saliente 3' de 1-10 nucleótidos, y un extremo romo 5'.

En una realización, la primera cadena tiene una longitud de 5-100 nucleótidos, de 12-30 nucleótidos, de 15-28 nucleótidos, de 18-27 nucleótidos, de 19-23 nucleótidos, de 20-22 nucleótidos, o 21 nucleótidos.

En otra realización, la segunda cadena tiene una longitud de 3-30 nucleótidos, de 12-26 nucleótidos, de 13-20 nucleótidos, de 14-23 nucleótidos, 14 o 15 nucleótidos.

En una realización, la primera cadena tiene una longitud de 5-100 nucleótidos, y la segunda cadena tiene una longitud de 3-30 nucleótidos; o la primera cadena tiene una longitud de 10-30 nucleótidos, y la segunda cadena tiene una longitud de 3-29 nucleótidos; o la primera cadena tiene una longitud de 12-30 nucleótidos y la segunda cadena tiene una longitud de 10-26 nucleótidos; o la primera cadena tiene una longitud de 15-28 nucleótidos y la segunda cadena tiene una longitud de 12-26 nucleótidos; o la primera cadena tiene una longitud de 19-27 nucleótidos y la segunda cadena tiene una longitud de 14-23 nucleótidos; o la primera cadena tiene una longitud de 20-22 nucleótidos y la segunda cadena tiene una longitud de 14-15 nucleótidos. En una realización adicional, la primera cadena tiene una longitud de 21 nucleótidos y la segunda cadena tiene una longitud de 13-20 nucleótidos, 14-19 nucleótidos, 14-17 nucleótidos, 14 o 15 nucleótidos.

En una realización, la primera cadena es al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nucleótidos más larga que la segunda cadena.

En una realización, la molécula de ARN dúplex comprende adicionalmente 1-10 nucleótidos desajustados o desiguales. En una realización adicional, los nucleótidos desajustados o desiguales están en o cerca del extremo ranurado 3'. En una realización alternativa, los nucleótidos desajustados o desiguales están en o cerca del extremo ranurado 5'. En una realización alternativa, los nucleótidos desajustados o desiguales están en la región bicatenaria. En otra realización, la secuencia nucleotídica desajustada o desigual tiene una longitud de 1-5 nucleótidos. Aún en una realización adicional, los nucleótidos desajustados o desiguales forman una estructura de bucle.

En una realización, la primera cadena o la segunda cadena contienen al menos una mella, o se forman por dos fragmentos nucleotídicos.

En una realización, el silenciamiento génico se consigue a través de uno o dos, o cada uno de ARN de interferencia, modulación de la traducción, y modulaciones epigenéticas de ADN.

Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la forma singular "un", "una", y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión "una célula" incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas.

Como se usa en el presente documento, un "ARN bicatenario", un "ARN dúplex" o un "dúplex de ARN" se refiere a un ARN de dos cadenas y con al menos una región bicatenaria, e incluye moléculas de ARN que tienen al menos un hueco, mella, protuberancia, y/o burbuja en una región bicatenaria o entre dos regiones bicatenarias adyacentes. Si una cadena tiene un hueco o una región monocatenaria de nucleótidos no coincidentes entre dos regiones bicatenarias, se considera que esa cadena se considera tiene múltiples fragmentos. Un ARN bicatenario como se usa aquí puede tener salientes terminales en cualquier extremo o en ambos extremos. En algunas realizaciones, las dos cadenas del ARN dúplex se pueden unir a través de cierto enlazador químico.

Como se usa en el presente documento, una "cadena no codificante" se refiere a una cadena de ARN que tiene una complementariedad de secuencia sustancial contra un ARN mensajero diana. Una cadena no codificante puede ser parte de una molécula de siRNA, parte de un dúplex de miRNA/miRNA*, o un miRNA maduro monocatenario.

El término "aislado" o "purificado" como se usa en el presente documento, se refiere a un material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. La pureza y la homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas de química analítica tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento.

Como se usa en el presente documento, "modular" y sus equivalentes gramaticales se refieren a aumentar o disminuir (por ejemplo, silenciamiento), en otras palabras, regulación en sentido ascendente o descendente. Como se usa en el presente documento, "silenciamiento génico" se refiere a la reducción de la expresión génica, y puede referirse a una reducción de la expresión génica de aproximadamente el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o el 95 % del gen diana.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), incluyendo, pero sin limitación, seres humanos, primates no humanos, roedores, y similares, que ha de ser el receptor de un tratamiento particular. Típicamente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de forma intercambiable en el presente documento en referencia a un sujeto humano.

Los términos tales como "tratar" o "tratamiento" o "para tratar" o "aliviar" o "para aliviar" como se usan en el presente documento, se refieren tanto a (1) las medidas terapéuticas que curan, ralentizan, disminuyen los síntomas de, y/o detener el avance de una afección patológica diagnosticada o trastorno y (2) las medidas profilácticas o preventivas que impiden o retrasan el desarrollo de una afección o trastorno patológico diana. Por lo tanto, aquellos que necesitan tratamiento incluyen los que ya padecen el trastorno; aquellos propensos a padecer el trastorno; y aquellos en los que el trastorno se va a prevenir. Un sujeto se "trata" con éxito, de acuerdo con los métodos de la presente invención si el paciente muestra uno o más de los siguientes: una reducción en el número de o ausencia completa de células cancerosas; una reducción en el tamaño del tumor; inhibición de o una ausencia de infiltración de células cancerosas en órganos periféricos, incluyendo la propagación del cáncer en el tejido blando y el hueso; inhibición de o una ausencia de metástasis tumoral; inhibición o ausencia de crecimiento del tumor; el alivio de uno o más síntomas asociados al cáncer específico; reducción de la morbilidad y la mortalidad; y mejora en la calidad de vida.

Como se usa en el presente documento, los términos "inhibición", "para inhibir" y sus equivalentes gramaticales, al usarse en el contexto de una bioactividad, se refieren a la regulación descendente de la bioactividad, que puede reducir o eliminar la función, tal como la producción de una proteína o la fosforilación de una molécula. En realizaciones particulares, la inhibición puede referirse a una reducción de aproximadamente el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o el 95 % de la actividad diana. Al usarse en el contexto de un trastorno o enfermedad, los términos se refieren al éxito en la prevención de la aparición de los síntomas, alivio de los síntomas, o eliminación de la enfermedad, afección o trastorno.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sustancialmente complementaria" se refiere a la complementariedad de una región de bases apareadas, de doble cadena entre dos ácidos nucleicos y no cualquier región monocatenaria tal como un saliente terminal o una región hueco entre dos regiones bicatenarias. La complementariedad no necesita ser perfecta; puede haber cualquier número de desajustes de pares de bases, por ejemplo, entre los dos ácidos nucleicos. Sin embargo, si el número de desajustes es tan grande que no puede ocurrir hibridación ni siquiera bajo las condiciones de hibridación menos rigurosas, la secuencia no es una secuencia sustancialmente complementaria. Cuando dos secuencias se definen como "sustancialmente complementarias" en el presente documento, significa que las secuencias son suficientemente complementarias entre sí para hibridarse en las condiciones de reacción seleccionadas. La relación de complementariedad de ácido nucleico y la rigurosidad de la hibridación suficiente para lograr la especificidad se conoce bien en la técnica. Dos cadenas sustancialmente complementarias pueden ser, por ejemplo, perfectamente complementarias o pueden contener de 1 a muchos desajustes, siempre que las condiciones de hibridación sean suficientes para permitir, por ejemplo, la discriminación entre una secuencia de emparejamiento y una secuencia sin emparejamiento. Por consiguiente, las secuencias sustancialmente complementarias pueden hacer referencia a secuencias con complementariedad de pares de bases de 100, 95, 90, 80, 75, 70, 60, 50 por ciento o menos, o cualquier número entre medias, en una región bicatenaria.

Como se usa en el presente documento, los antagomirs son inhibidores de miRNA, y se pueden utilizar en el silenciamiento de miRNA endógenos. Como se usa en el presente documento, los miméticos o mímicos son agonistas de miRNA, y pueden usarse para reemplazar miRNA endógenos como equivalentes funcionales y, elevando así las rutas afectadas por dichos miRNA endógenos.

1. ARN de interferencia

El ARN de interferencia (abreviado como ARNi) es un proceso celular para la destrucción dirigida de ARN monocatenario (ssRNA) inducida por ARN bicatenario (dsRNA). El ssRNA es un transcrito génico, tal como un ARN mensajero (ARNm). ARNi es una forma de silenciamiento génico post-transcripcional en el que el dsRNA puede interferir específicamente con la expresión de genes con secuencias que son complementarias al dsRNA. La cadena de ARN no codificante del dsRNA se dirige a un transcrito génico complementario tal como un ARN mensajero (ARNm) para la escisión por una ribonucleasa.

10 En el proceso del ARNi, el dsRNA largo se procesa por una ribonucleasa proteína Dicer a formas cortas llamados ARN interferente pequeño (siRNA). El siRNA se separa en la cadena guía (o no codificante) y la cadena acompañante (o codificante). La cadena guía está integrada en un complejo de silenciamiento inducido por ribonucleasa (RISC), que es un complejo multi-proteína que contiene ribonucleasa. Después, el complejo se dirige específicamente a transcritos génicos complementarios para la destrucción.

15 Se ha demostrado que ARNi es un proceso celular común en muchos eucariotas. RISC, así como Dicer, se conserva a través del dominio eucariota. Se cree que ARNi tiene una función en la respuesta inmunológica al virus y otro material genético extraño.

20 Los ARN interferentes pequeños (siRNA) son una clase de moléculas de ARN bicatenario corto (dsRNA) que desempeñan una diversidad de funciones en la biología. En particular, está implicado en la ruta del ARN de interferencia (ARNi) donde el siRNA interfiere con la expresión de un gen específico. Además, los siRNA también juegan un papel en los procesos tales como un mecanismo antiviral o la conformación de la estructura de la cromatina de un genoma. En una realización, siRNA tiene una región de ARN bicatenario (dsRNA) corto (19 a 21 nt) con salientes 3' de 2-3 nucleótidos con 5' fosfato y extremos 3'-hidroxilo.

Los microARN (miRNA) son una clase de moléculas de ARN de aproximadamente 22 nucleótidos de largo endógeno, monocatenario o bicatenario que regulan tanto como el 30 % de los genes de mamífero (Czech, 2006; Eulalio y col., 2008; Mack, 2007). miRNA reprime la producción de proteínas mediante el bloqueo de la traducción o causando la degradación de la transcripción. Un miARN se puede dirigir a 250-500 ARNm diferentes. MiRNA es el producto de la digestión Dicer de pre-miARN, que es el producto del miRNA primario (pri-miARN).

30 Como se usa en el presente documento, los antagomirs son inhibidores de miRNA, y pueden usarse en el silenciamiento de miRNA endógenos. Como se usa en el presente documento, los miméticos son antonistas de miRNA, y pueden usarse para reemplazar los miRNA y regulan en descenso los ARNm.

Dicer es un miembro de la familia de ribonucleasa RNasa III. Dicer escinde el ARN bicatenario largo (dsRNA), pre-microRNA (miARN), y ARN corto de horquilla (shRNA) en fragmentos bicatenarios de ARN corto denominados ARN interferente pequeño (siRNA) de aproximadamente 20-25 nucleótidos de largo, por lo general con un saliente de dos bases en el extremo 3'. Dicer cataliza la primera etapa en la ruta del ARN interferente e inicia la formación del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), cuyo componente catalítico Argonaute es una endonucleasa capaz de degradar el ARN mensajero (ARNm) cuya secuencia es complementaria a la de la cadena guía de siRNA.

45 Como se usa en el presente documento, una secuencia de siRNA eficaz es un siRNA que es eficaz en la activación de ARNi para degradar los transcritos de un gen diana. No toda complementariedad de siRNA al gen diana es eficaz en la activación de ARNi para degradar los transcritos del gen. De hecho, normalmente es necesaria una larga detección para identificar una secuencia de siRNA eficaz. En una realización, la secuencia de siRNA eficaz es capaz de reducir la expresión del gen diana en más del 90 %, más del 80 %, más del 70 %, más del 60 %, más del 50 %, más del 40 %, o más del 30 %.

50 La presente invención proporciona un andamiaje estructural novedoso denominado ARN de interferencia asimétrico (aiRNA) que se puede utilizar para efectuar resultados de tipo siRNA, y también para modular las actividades de la ruta de miRNA (que se describen en detalle en PCT en co-propiedad y las solicitudes de Estados Unidos presentadas el mismo día que la presente solicitud con el título "Composition of Asymmetric RNA Duplex as MicroRNA Mimetic or Inhibitor", cuyo contenido se incorpora en su totalidad en el presente documento por referencia).

El diseño estructural novedoso de aiRNA no sólo es funcionalmente potente para efectuar la regulación génica, sino que también ofrece varias ventajas sobre los reguladores de ARNi del estado de la técnica actual (siRNA

principalmente no codificante). Entre las ventajas, el aiRNA puede tener una estructura dúplex de ARN de longitud mucho más corta que las construcciones de siRNA actuales, lo que debería reducir el coste de la síntesis y suprimir o reducir la activación dependiente de la longitud de las respuestas inmunológicas de tipo interferón no específicas de células huésped. La longitud más corta de la cadena acompañante en el aiRNA también debe eliminar o reducir la incorporación no intencionada de la cadena acompañante en FISC, y a su vez, reducir los efectos no específicos observados en el silenciamiento génico mediado por miRNA. Puede usarse el aiRNA en todas las áreas en las que las tecnologías basadas en miRNA actuales están siendo aplicadas o se prevé que se apliquen, incluyendo la investigación en biología, I + D en biotecnología y la industrias farmacéutica, y los diagnósticos y terapias basados en miRNA.

10

2. El andamiaje estructural del aiRNA

Elbashir, y col., probaron varias moléculas de ARN dúplex asimétrico, así como moléculas de siRNA simétrico (Elbashir y col., 2001c). Las moléculas de ARN dúplex asimétrico se enumeran en la Tabla 1 junto con las moléculas de siRNA correspondientes.

15

Tabla 1

B	C	D
5' -CGUACGGGAAUACUUCG UGCAUGCGCCUUUGAAGCUU- 5'	5' -CGUACGGGAAUACUUCG GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU- 5'	5' -CGUACGGGAAUACUUCG AGUGCAUGCGCCUUUGAAGC- 5'
5' -CGUACGGGAAUACUUCGA UGCAUGCGCCUUUGAAGCUU- 5'	5' -CGUACGGGAAUACUUCGA GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU- 5'	5' -CGUACGGGAAUACUUCGA AGUGCAUGCGCCUUUGAAGC- 5'
5' -CGUACGGGAAUACUUCGAA UGCAUGCGCCUUUGAAGCUU- 5'	5' -CGUACGGGAAUACUUCGAA GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU- 5'	5' -CGUACGGGAAUACUUCGAA AGUGCAUGCGCCUUUGAAGC- 5'
5' -CGUACGGGAAUACUUCGAAA UGCAUGCGCCUUUGAAGCUU- 5'	5' -CGUACGGGAAUACUUCGAAA GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU- 5'	5' -CGUACGGGAAUACUUCGAAA AGUGCAUGCGCCUUUGAAGC- 5'
5' -CGUACGGGAAUACUUCGAAA UGCAUGCGCCUUUGAAGCUU- 5'	5' -CGUACGGGAAUACUUCGAAA GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU- 5'	5' -CGUACGGGAAUACUUCGAAA AGUGCAUGCGCCUUUGAAGC- 5'
5' -CGUACGGGAAUACUUCGAAA UGCAUGCGCCUUUGAAGCUU- 5'	5' -CGUACGGGAAUACUUCGAAA GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU- 5'	5' -CGUACGGGAAUACUUCGAAA AGUGCAUGCGCCUUUGAAGC- 5'
5' -CGUACGGGAAUACUUCGAAA UGCAUGCGCCUUUGAAGCUU- 5'	5' -CGUACGGGAAUACUUCGAAA GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU- 5'	5' -CGUACGGGAAUACUUCGAAA AGUGCAUGCGCCUUUGAAGC- 5'
5' -CGUACGGGAAUACUUCGAAA UGCAUGCGCCUUUGAAGCUU- 5'	5' -CGUACGGGAAUACUUCGAAA GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU- 5'	5' -CGUACGGGAAUACUUCGAAA AGUGCAUGCGCCUUUGAAGC- 5'
5' -CGUACGGGAAUACUUCGAAA UGCAUGCGCCUUUGAAGCUU- 5'	5' -CGUACGGGAAUACUUCGAAA GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU- 5'	5' -CGUACGGGAAUACUUCGAAA AGUGCAUGCGCCUUUGAAGC- 5'
5' - CGUACGGGAAUACUUCGAAAUGUC UGCAUGCGCCUUUGAAGCUU- 5'	5' - CGUACGGGAAUACUUCGAAAUGUC GUGCAUGCGCCUUUGAAGCU- 5'	5' - CGUACGGGAAUACUUCGAAAUGUC AGUGCAUGCGCCUUUGAAGC- 5'

En comparación con las moléculas de siRNA simétrico correspondiente, sin embargo, las moléculas de ARN dúplex asimétrico son incapaces de realizar un silenciamiento génico selectivo (*ibidem*).

La presente invención es pertinente a las moléculas de ARN dúplex asimétricas que son capaces de realizar un
5 silenciamiento génico específico de secuencia. En una realización, una molécula de ARN de la presente invención comprende una primera cadena y una segunda cadena, en la que la segunda cadena es sustancialmente complementaria a la primera cadena, y forma una región bicatenaria con la primera cadena, en la que la primera cadena es mayor que la segunda cadena; excluir las moléculas de ARN dúplex asimétricas desveladas en Elbashir (Elbashir y col., 2001c), específicamente las moléculas de ARN dúplex asimétricas enumeradas en la Tabla 1. La
10 molécula de ARN comprende una región bicatenaria, y dos extremos independientemente seleccionados entre el grupo que consiste en un saliente 5', un saliente 3', y un extremo romo. La cadena de ARN puede tener nucleótidos desiguales o imperfectamente emparejados.

En una realización, la primera cadena es al menos 1 nt más larga que la segunda cadena. En una realización
15 adicional, la primera cadena es al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nt más larga que la segunda cadena. En otra realización, la primera cadena es 20-100 nt más larga que la segunda cadena. En una realización adicional, la primera cadena es 2-12 nt más larga que la segunda cadena. Aún en una realización adicional, la primera cadena es 3-10 nt mas larga que la segunda cadena.

20 En una realización, la región bicatenaria tiene una longitud de 3-98 pb. En una realización adicional, la región bicatenaria tiene una longitud de 5-28 pb. Aún en una realización adicional, la región bicatenaria tiene una longitud de 10-19 pb. La longitud de la región bicatenaria puede ser de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 pb.

25 En una realización, la región bicatenaria de la molécula de ARN no contiene ninguna incompatibilidad o abultamiento. En otra realización, la región bicatenaria de la molécula de ARN contiene una incompatibilidad y/o abultamiento.

En una realización, cuando la primera cadena es
30 5'-UUCGAAGUAUCCGCGUACGU
5'-UCGAAGUAUCCGCGUACGUG o
5'-CGAAGUAUCCGCGUACGUGA,
la segunda cadena tiene una longitud de como mucho 17 nucleótidos, o contiene al menos una incompatibilidad con la primera cadena, o contiene al menos una modificación.

35 En una realización alternativa, la primera cadena no es
5'-UUCGAAGUAUCCGCGUACGU
5'-UCGAAGUAUCCGCGUACGUG o
40 5'-CGAAGUAUCCGCGUACGUGA.

En una realización, la primera cadena comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria a una
secuencia de ARNm diana. En otra realización, la segunda cadena comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria a una secuencia de ARNm diana.

45 La presente invención es pertinente para las moléculas de ARN bicatenario asimétrico que son capaces de realizar un silenciamiento génico. En una realización, una molécula de ARN de la presente invención comprende una primera cadena y una segunda cadena, en la que la segunda cadena es sustancialmente complementaria, o parcialmente complementaria a la primera cadena, y la primera cadena y la segunda cadena forman al menos una
50 región bicatenaria, en la que la primera cadena es más larga que la segunda cadena (longitud asimétrica). La molécula de ARN de la presente invención tiene al menos una región bicatenaria, y dos extremos independientemente seleccionados entre el grupo que consiste en un saliente 5', un saliente 3', y un extremo romo (por ejemplo, véanse las figuras 1A, 2A-2D).

En el campo de la fabricación de reguladores de ARN pequeño donde los cambios, adiciones y deleciones de un
55 único nucleótido pueden afectar críticamente a la funcionalidad de la molécula (Elbashir y col., 2001c), el andamiaje de aiRNA proporciona una plataforma estructural distinta de la estructura de siRNA clásica de ARN bicatenario de 21 nt que es simétrica en cada cadena y sus salientes 3' respectivos. Además, el aiRNA de la presente invención proporciona un nuevo enfoque muy necesario en el diseño de una nueva clase de reguladores de molécula pequeña que, como se muestra por los datos incluidos en los ejemplos a continuación, puede superar los obstáculos

encontrados actualmente en las investigaciones basadas en ARNi y el desarrollo de fármacos. Por ejemplo, los datos de aiRNA que imitan estructuralmente los siRNA muestran que los aiRA son más eficaces, potentes, de rápida aparición, duraderos, y específicos que los siRNA en la inducción del silenciamiento génico.

5 Cualquier región monocatenaria de la molécula de ARN de la invención, incluyendo cualquier saliente terminal y huecos entre dos regiones bicatenarias, se puede estabilizar contra la degradación, ya sea a través de modificación química o una estructura secundaria. Las cadenas de ARN pueden tener nucleótidos desiguales o imperfectamente emparejados. Cada cadena puede tener una o más mellas (un corte en la estructura del ácido nucleico, por ejemplo, véase la figura 1B), huecos (una cadena fragmentada con uno o más nucleótidos faltantes, por ejemplo, véase la

10 figura 1 C), y nucleótidos modificados o análogos nucleotídicos. No sólo pueden modificarse químicamente todos y cada uno de los nucleótidos en la molécula de ARN, cada cadena puede configurarse con uno o más restos para mejorar su funcionalidad, por ejemplo, con restos tales como uno o más péptidos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, aptámeros, polímeros, etc.

15 En una realización, la primera cadena es al menos 1 nt más larga que la segunda cadena. En una realización adicional, la primera cadena es al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nt más larga que la segunda cadena. En otra realización, la primera cadena es 20-100 nt más larga que la segunda cadena. En una realización adicional, la primera cadena es 2-12 nt más larga que la segunda cadena. Aún en una realización

20 adicional, la primera cadena es 3-10 nt mas larga que la segunda cadena.

En una realización, la primera cadena, o la cadena larga, tiene una longitud de 5-100 nt, o preferiblemente 10-30 o 12-30 nt, o más preferiblemente 15-28 nt. En una realización, la primera cadena es de 21 nucleótidos de longitud. En una realización, la segunda cadena, o la cadena corta, tiene una longitud de 3-30 nt, o preferiblemente 3-29 nt o 10-26 nt, o más preferiblemente 12-26 nt. En una realización, la segunda cadena tiene una longitud de 15 nucleótidos.

25 En una realización, la región bicatenaria tiene una longitud de 3-98 pb. En una realización adicional, la región bicatenaria tiene una longitud de 5-28 pb. Aún en una realización adicional, la región bicatenaria tiene una longitud de 10-19 pb. La longitud de la región bicatenaria puede ser de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 pb.

30 En una realización, la región bicatenaria de la molécula de ARN no contiene ninguna incompatibilidad o abultamiento, y las dos cadenas son perfectamente complementarias entre sí en la región bicatenaria. En otra realización, la región bicatenaria de la molécula de ARN contiene incompatibilidad y/o abultamiento.

35 En una realización, el saliente terminal es de 1-10 nucleótidos. En una realización adicional, el saliente terminal es de 1-8 nucleótidos. En otra realización, el saliente terminal es de 3 nt.

2.1. La molécula de ARN dúplex tanto con un saliente 5' como un saliente 3' en la primera cadena

40 Haciendo referencia a la figura 1A, en una realización de la presente invención, la molécula de ARN bicatenaria tiene tanto un saliente 5' y un saliente 3' en la primera cadena. La molécula de ARN comprende una primera cadena y una segunda cadena; la primera cadena y la segunda cadena forman al menos una región bicatenaria con secuencias sustancialmente complementarias, en la que la primera cadena es mayor que la segunda cadena. En la primera cadena, flanqueando la región bicatenaria, hay un saliente incompatible en los extremos tanto 5' como 3'.

45 En una realización, la primera cadena es al menos 2 nt más larga que la segunda cadena. En una realización adicional, la primera cadena es al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nt más larga que la segunda cadena. En otra realización, la primera cadena es 20-100 nt más larga que la segunda cadena. En una realización adicional, la primera cadena es 2-12 nt más larga que la segunda cadena. Aún en una realización

50 adicional, la primera cadena es 3-10 nt mas larga que la segunda cadena.

En una realización, la primera cadena tiene una longitud de 5-100 nt. En una realización adicional, la primera cadena tiene una longitud de 5-100 nt, y la segunda cadena tiene una longitud de 3-30 nucleótidos. Aún en una realización adicional, la primera cadena tiene una longitud de 5-100 nt, y la segunda cadena tiene una longitud de 3-18

55 nucleótidos.

En una realización, la primera cadena tiene una longitud de 10-30 nucleótidos. En una realización adicional, la primera cadena tiene una longitud de 10-30 nucleótidos, y la segunda cadena tiene una longitud de 3-28 nucleótidos. Aún en una realización adicional, la primera cadena tiene una longitud de 10-30 nucleótidos, y la segunda cadena

tiene una longitud de 3-19 nucleótidos.

En una realización, la primera cadena tiene una longitud de 12-26 nucleótidos. En una realización adicional, la primera cadena tiene una longitud de 12-26 nucleótidos, y la segunda cadena tiene una longitud de 10-24 nucleótidos. Aún en una realización adicional, la primera cadena tiene una longitud de 12-26 nucleótidos, y la segunda cadena tiene una longitud de 10-19 nucleótidos.

En una realización, la primera cadena tiene una longitud de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nt. En otra realización, la segunda cadena tiene una longitud de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, o 28 nt.

En una realización, la primera cadena tiene una longitud de 21 nt, y la segunda cadena tiene una longitud de 15 nt.

En una realización, el saliente 3' tiene una longitud de 1-10 nt. En una realización adicional, el saliente 3' tiene una longitud de 1-8 nt. Aún en una realización adicional, el saliente 3' tiene una longitud de 2-6 nt. En una realización, el saliente 3' tiene una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nt.

En una realización, el saliente 5' tiene una longitud de 1-10 nt. En una realización adicional, el saliente 5' tiene una longitud de 1-6 nt. Aún en una realización adicional, el saliente 5' tiene una longitud de 2-4 nt. En una realización, el saliente 5' tiene una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nt.

En una realización, la longitud del saliente 3' es igual a la del saliente 5'. En otra realización, el saliente 3' es más largo que el saliente 5'. En una realización alternativa, el saliente 3' es más corto que el saliente 5'.

En una realización, la molécula de ARN dúplex comprende una región bicatenaria de secuencias sustancialmente complementarias de aproximadamente 15 nt, un saliente 3' de 3 nt, y un saliente 5' de 3 nt. La primera cadena es de 21 nt y la segunda cadena es de 15 nt. En una característica, la región bicatenaria de diversas realizaciones consiste en secuencias perfectamente complementarias. En una característica alternativa, la región bicatenaria incluye al menos una mella (figura 1B), un hueco (figura 1C), o una incompatibilidad (abultamiento o bucle).

En una realización, la región bicatenaria tiene una longitud de 3-98 pb. En una realización adicional, la región bicatenaria tiene una longitud de 5-28 pb. Aún en una realización adicional, la región bicatenaria tiene una longitud de 10-19 pb. La longitud de la región bicatenaria puede ser de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 pb. Puede haber más de una región bicatenaria.

En una realización, la primera cadena es la cadena no codificante, que es capaz de dirigirse a un transcrito génico sustancialmente complementario, tal como un ARN mensajero (ARNm) para el silenciamiento génico por escisión o por represión de la traducción.

La presente invención también proporciona una molécula de ARN dúplex que comprende una primera cadena con una longitud de 18-23 nucleótidos y una segunda cadena con una longitud de 12-17 nucleótidos, en la que la segunda cadena es sustancialmente complementaria a la primera cadena, y forma una región bicatenaria con la primera cadena, en la que la primera cadena tiene un saliente 3' de 1-9 nucleótidos, y un saliente 5' de 1-8 nucleótidos, en la que dicha molécula de ARN dúplex es capaz de realizar un silenciamiento génico selectivo en una célula eucariota. En una realización, la primera cadena comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria a una secuencia de ARNm diana.

En una realización, la primera cadena tiene una longitud de 20, 21, o 22 nucleótidos. En otra realización, la segunda cadena tiene una longitud de 14, 15, o 16 nucleótidos.

En una realización, la primera cadena tiene una longitud de 21 nucleótidos, y la segunda cadena tiene una longitud de 15 nucleótidos. En una realización adicional, la primera cadena tiene un saliente 3' de 1, 2, 3, 4, 5, o 6 nucleótidos. Aún en una realización adicional, la primera cadena tiene un saliente 3' de 3 nucleótidos.

2.2. La molécula de ARN dúplex con un extremo romo y un saliente 5' o un saliente 3' en la primera cadena

En una realización, la molécula de ARN dúplex comprende una región bicatenaria, un extremo romo, y un saliente 5' o un saliente 3' (véanse, por ejemplo, las figuras 2A y 2B). La molécula de ARN comprende una primera cadena y una segunda cadena, en la que la primera cadena y la segunda cadena forman una región bicatenaria, en la que la

primera cadena es mayor que la segunda cadena.

5 En una realización, la región bicatenaria tiene una longitud de 3-98 pb. En una realización adicional, la región bicatenaria tiene una longitud de 5-28 pb. Aún en una realización adicional, la región bicatenaria tiene una longitud de 10-18 pb. La longitud de la región bicatenaria puede ser de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 pb. La región bicatenaria puede tener características similares a las descritas con respecto a otras realizaciones y no se repiten necesariamente aquí. Por ejemplo, la región bicatenaria puede consistir en secuencias perfectamente complementarias o incluir al menos una mella, hueco, o incompatibilidad (abultamiento o bucle).

10

En una realización, la primera cadena es al menos 1 nt más larga que la segunda cadena. En una realización adicional, la primera cadena es al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nt más larga que la segunda cadena. En otra realización, la primera cadena es 20-100 nt más larga que la segunda cadena. En una realización adicional, la primera cadena es 2-12 nt más larga que la segunda cadena. Aún en una realización adicional, la primera cadena es 4-10 nt más larga que la segunda cadena.

15

20 En una realización, la primera cadena tiene una longitud de 5-100 nt. En una realización adicional, la primera cadena tiene una longitud de 5-100 nt, y la segunda cadena tiene una longitud de 3-30 nucleótidos. Aún en una realización adicional, la primera cadena tiene una longitud de 10-30 nt, y la segunda cadena tiene una longitud de 3-19 nucleótidos. En otra realización, la primera cadena tiene una longitud de 12-26 nucleótidos, y la segunda cadena tiene una longitud de 10-19 nucleótidos.

25 En una realización, la molécula de ARN dúplex comprende una región bicatenaria, un extremo romo, y un saliente 3' (véase, por ejemplo, la figura 2B).

25

En una realización, el saliente 3' tiene una longitud de 1-10 nt. En una realización adicional, el saliente 3' tiene una longitud de 1-8 nt. Aún en una realización adicional, el saliente 3' tiene una longitud de 2-6 nt. En una realización, el saliente 3' tiene una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nt.

30 En una realización alternativa, la molécula de ARN dúplex comprende una región bicatenaria, un extremo romo, y un saliente 5' (véase, por ejemplo, la figura 2A).

35 En una realización, el saliente 5' tiene una longitud de 1-10 nt. En una realización adicional, el saliente 5' tiene una longitud de 1-6 nt. Aún en una realización adicional, el saliente 5' tiene una longitud de 2-4 nt. En una realización, el saliente 5' tiene una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nt.

2.3. La molécula de ARN dúplex con dos salientes 5' o dos 3'

40 En una realización, la molécula de ARN dúplex comprende una región bicatenaria, y dos salientes 3' o dos salientes 5' (véanse, por ejemplo, las figuras 2C y 2D). La molécula de ARN comprende una primera cadena y una segunda cadena, en la que la primera cadena y la segunda cadena forman una región bicatenaria, en la que la primera cadena es mayor que la segunda cadena.

45 En una realización, la región bicatenaria tiene una longitud de 3-98 pb. En una realización adicional, la región bicatenaria tiene una longitud de 5-28 pb. Aún en una realización adicional, la región bicatenaria tiene una longitud de 10-18 pb. La longitud de la región bicatenaria puede ser de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 pb.

50 En una realización, la primera cadena es al menos 1 nt más larga que la segunda cadena. En una realización adicional, la primera cadena es al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nt más larga que la segunda cadena. En otra realización, la primera cadena es 20-100 nt más larga que la segunda cadena. En una realización adicional, la primera cadena es 2-12 nt más larga que la segunda cadena. Aún en una realización adicional, la primera cadena es 4-10 nt más larga que la segunda cadena.

55 En una realización, la primera cadena tiene una longitud de 5-100 nt. En una realización adicional, la primera cadena tiene una longitud de 5-100 nt, y la segunda cadena tiene una longitud de 3-30 nucleótidos. Aún en una realización adicional, la primera cadena tiene una longitud de 10-30 nt, y la segunda cadena tiene una longitud de 3-18 nucleótidos. En otra realización, la primera cadena tiene una longitud de 12-26 nucleótidos, y la segunda cadena tiene una longitud de 10-16 nucleótidos.

En una realización alternativa, la molécula de ARN dúplex comprende una región bicatenaria, y dos salientes 3' (véase, por ejemplo, la figura 2C). La región bicatenaria comparte características similares como se describe con respecto a otras realizaciones.

5

En una realización, el saliente 3' tiene una longitud de 1-10 nt. En una realización adicional, el saliente 3' tiene una longitud de 1-6 nt. Aún en una realización adicional, el saliente 3' tiene una longitud de 2-4 nt. En una realización, el saliente 3' tiene una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nt.

10 En una realización, la molécula de ARN dúplex comprende una región bicatenaria, y dos salientes 5' (véase, por ejemplo, la figura 2D).

0157] En una realización, el saliente 5' tiene una longitud de 1-10 nt. En una realización adicional, el saliente 5' tiene una longitud de 1-6 nt. Aún en una realización adicional, el saliente 5' tiene una longitud de 2-4 nt. En una

15 realización, el saliente 3' tiene una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nt.

3. El diseño de los aiRNA

Se usan ampliamente siRNA y miRNA como herramientas de investigación, y se desarrollan como fármacos candidatos (véase, por ejemplo, Dykxhoorn, Novina & Sharp. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4: 457-467 (2003); Kim & Rossi, Nature Rev. Genet. 8: 173-184 (2007); de Fougères, y col. Nature Rev. Drug Discov. 6: 443-453 (2007); Czech, NEJM 354: 1194-1195 (2006); y Mack, Nature Biotech. 25: 631-638 (2007)). Las moléculas de ARN dúplex de la presente invención, es decir, los aiRNA, pueden obtenerse de siRNA y miRNA conocidos en el campo.

25 La presente invención proporciona un método para convertir un siRNA o un miRNA en el aiRNA. La conversión da como resultado una nueva molécula de ARN dúplex que tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con la molécula original. La propiedad puede ser el tamaño, la eficacia, la potencia, la velocidad de aparición, la durabilidad, el coste de la síntesis, los efectos no específicos, la respuesta a interferón, o la administración.

30 En una realización, la molécula original es una molécula de ARN dúplex, tal como un siRNA. La molécula de ARN dúplex comprende una cadena no codificante (por ejemplo, una cadena guía) y una cadena codificante (por ejemplo, una cadena acompañante) que forman al menos una región bicatenaria. El método comprende cambiar la longitud de una o ambas cadenas de manera que la cadena no codificante sea más larga que la cadena codificante. En una realización, la cadena acompañante codificante se acorta. En otra realización, la cadena no codificante se alarga.

35 Aún en una realización adicional, la cadena codificante se acorta y la cadena no codificante se alarga. Las cadenas de ARN no codificantes y codificantes, intactas o con el tamaño cambiado, pueden sintetizarse, y después combinarse en condiciones, en las que se forma una molécula de aiRNA.

En una realización adicional, el método comprende cambiar la longitud de la cadena no codificante y/o codificante de manera que se forme la molécula de ARN dúplex que tenga al menos uno de un saliente 3' de 1-6 nucleótidos y un saliente 5' de 1-6 nucleótidos.

Como alternativa, las moléculas de ARN dúplex de la presente invención pueden diseñarse *de novo*. Una molécula de ARN dúplex de la presente invención puede diseñarse aprovechando los métodos de diseño para los siRNA y miRNA, tal como el método de desplazamiento génico.

Una molécula de ARN de la presente invención puede estar diseñada con enfoques bioinformáticos, y después se ensaya *in vitro* e *in vivo* para determinar su eficacia de modulación contra el gen diana y la existencia de cualquier efecto no específico. En base a estos estudios, las secuencias de las moléculas de ARN pueden seleccionarse entonces y modificarse para mejorar la eficacia de modulación contra el gen diana, y para minimizar los efectos no específicos. (véase, por ejemplo, Patzel, Drug Discovery Today 12: 139-148 (2007)).

3.1. Región desajustada o desigual en la molécula de ARN dúplex

55 Las dos cadenas sencillas del dúplex de aiRNA pueden tener al menos una región desajustada o imperfectamente correspondiente que contiene, por ejemplo, una o más incompatibilidades. En una realización, la región desajustada o imperfectamente correspondiente es al menos una región final de la molécula de ARN, incluyendo una región final con un extremo romo, una región final con una ranura 3' o un saliente 5', y una región final con una ranura 5' o un saliente 3'. Como se usa en el presente documento, la región final es una región de la molécula de ARN que incluye

un extremo y el área adyacente.

En una realización, la región desajustada o imperfectamente correspondiente está en una región bicatenaria de la molécula de siRNA. En una realización adicional, el dúplex de ARN asimétrico tiene una estructura de abultamiento 5 o bucle no correspondiente.

3.2. Motivos de secuencia en la molécula de ARN dúplex

En el diseño de una molécula de siRNA de la invención, el contenido de CG global puede variar. En una realización, el contenido de GC de la región bicatenaria es del 20-70 %. En una realización adicional, el contenido de GC de la región bicatenaria es menor del 50 %, o preferiblemente del 30-50 %, para facilitar la separación catenaria dado que el emparejamiento G-C es más fuerte que el emparejamiento A-U.

La secuencia nucleotídica en un saliente terminal, en algunas realizaciones, por ejemplo, el terminal 5', puede diseñarse de forma independiente a partir de cualquier secuencia plantilla (por ejemplo, una secuencia de ARNm diana), es decir, no tiene que ser sustancialmente complementaria a un ARNm diana (en el caso de un mimético de siRNA o miRNA) o un miRNA diana (en el caso de un inhibidor de miRNA). En una realización, el saliente, por ejemplo, en 5' o 3', de la cadena más larga o no codificante, es un motivo "AA", "UU" o "dTdT", que han mostrado un aumento de la eficacia en comparación con algunos otros motivos. En una realización, el saliente 5' de la cadena más larga o no codificante tiene un motivo "AA". En otra realización, el saliente 3' de la cadena más larga o no codificante tiene un motivo "UU".

3.3. Sustitución nucleotídica

Uno o más de los nucleótidos en la molécula de ARN de la invención pueden sustituirse con desoxinucleótidos o nucleótidos modificados o análogos nucleotídicos. La sustitución puede tener lugar en cualquier parte en la molécula de ARN, por ejemplo, una o ambas de las regiones de saliente, y/o una región bicatenaria. En algunos casos, la sustitución mejora una propiedad física de la molécula de ARN, tal como la afinidad de cadena, la solubilidad y la resistencia a la degradación de RNasa o la estabilidad mejorada de otro modo.

En una realización, el nucleótido modificado o análogo es un ribonucleótido modificado en azúcar, estructura y/o base. El ribonucleótido modificado en estructura puede tener una modificación en un enlace fosfodiéster con otro ribonucleótido. En una realización, el enlace fosfodiéster en la molécula de ARN se modifica para incluir al menos un heteroátomo de nitrógeno y/o azufre. En una realización, el nucleótido modificado o análogo es una base inusual o una base modificada. En una realización, el nucleótido modificado o análogo es inosina, o una base tritilada.

En una realización adicional, el análogo nucleotídico es un ribonucleótido modificado en azúcar en el que el grupo 2'-OH se reemplaza por un grupo seleccionado entre el grupo que consiste en H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, y CN, en el que cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alquilo, alqueno y alquino C1-C6, y halo se selecciona entre el grupo que consiste en F, Cl, Br e I.

En una realización, el análogo nucleotídico es un ribonucleótido modificado en estructura que contiene un grupo fosfotioato.

45 4. Las utilidades

La presente invención también proporciona un método de modulación de la expresión génica en una célula o un organismo (método de silenciamiento). El método comprende las etapas de poner en contacto dicha célula u organismo con la molécula de ARN dúplex en condiciones en las que puede producirse un silenciamiento génico selectivo, y mediar un silenciamiento génico selectivo realizado por dicha molécula de ARN dúplex hacia un ácido nucleico diana que tiene una porción de secuencia sustancialmente correspondiente al ARN bicatenario.

En una realización, la etapa de contacto comprende la etapa de introducir dicha molécula de ARN dúplex en una célula diana en cultivo o en un organismo en el que puede producirse un silenciamiento génico selectivo. En una realización adicional, la etapa de introducción comprende transfección, lipofección, infección, electroporación, u otras tecnologías de administración.

En una realización, el método de silenciamiento se usa para determinar la función o utilidad de un gen en una célula o un organismo.

El método de silenciamiento puede usarse para modular la expresión de un gen en una célula o un organismo. En una realización, el gen se asocia a una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad humana o una enfermedad animal, una afección patológica, o una afección no deseable. En una realización adicional, el gen es un gen de un microorganismo patógeno. Aún en una realización adicional, el gen es un gen vírico. En otra realización, el gen es un gen asociado a tumor.

En una realización alternativa, el gen es un gen asociado a enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades degenerativas, enfermedades infecciosas, enfermedades proliferativas, enfermedades metabólicas, trastornos mediados por procesos inmunitarios, enfermedades alérgicas, enfermedades dermatológicas, enfermedades neoplásicas, trastornos gastrointestinales, trastornos respiratorios, trastornos cardiovasculares, trastornos renales, trastornos reumatoides, trastornos neurológicos, trastornos endocrinos y envejecimiento.

15 4. 1. Herramientas de investigación

Las moléculas de ARN de la presente invención pueden usarse para crear "atenuación" génica en modelos animales en oposición a modelos desactivados modificados genéticamente para descubrir funciones génicas. Los métodos también pueden usarse para silenciar genes *in vitro*. Por ejemplo, el aiRNA puede transfectarse en las células. El aiRNA puede usarse con respecto a 1 como una herramienta de investigación en la identificación y validación de la diana farmacológica/ruta, y otra investigación biomédica en investigación y desarrolló de fármacos.

4.2 Usos terapéuticos

25 Las moléculas de ARN de la presente invención pueden usarse para el tratamiento y/o prevención de diversas enfermedades o afecciones indeseables, incluyendo las enfermedades resumidas (Czech, 2006; de Fougerolles y col., 2007; Dykxhoorn y col., 2003; Kim y Rossi, 2007; Mack, 2007).

En una realización, la presente invención puede usarse como una terapia contra el cáncer o para impedir el cáncer. 30 Las moléculas de ARN de la presente invención pueden usarse para silenciar o atenuar los genes implicados en la proliferación celular u otros fenotipos de cáncer. Los ejemplos de estos genes son *k-Ras*, *β-catenina*, *Nbs1*, *EF2*, *Stat3*, *PTEN*, *p70S6K*, *mTOR*, *Rsk1*, *PCNA*, *Parp1*, *Survivina*, *NQO1* y *p21*. Específicamente, *k-Ras* y *β-catenina* son genes terapéuticos de cáncer de colon. Estos oncogenes son activos y relevantes en la mayor parte de los casos clínicos.

35 Estas moléculas de ARN también pueden usarse para silenciar o atenuar dianas génicas no cancerosas. Las moléculas de ARN de la invención pueden usarse para tratar o prevenir enfermedades oculares, (por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y retinopatía diabética (DR)); enfermedades infecciosas (por ejemplo, VIH/SIDA, virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus del papiloma humano (VPH), 40 virus del herpes simple (VHS), RCV, citomegalovirus (CMV), fiebre del Dengue, virus del Nilo occidental); enfermedades respiratorias (por ejemplo, virus sincitial respiratorio (VSR), asma, fibrosis quística); enfermedades neurológicas (por ejemplo, enfermedad de Huntington (HD), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), lesión de la médula espinal, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, dolor); enfermedades cardiovasculares; trastornos metabólicos (por ejemplo, diabetes); trastornos genéticos; y enfermedades inflamatorias (por ejemplo, enfermedad 45 inflamatoria intestinal (IBD), artritis, enfermedad reumatoide, trastornos autoinmunes), enfermedades dermatológicas.

Diversos genes pueden silenciarse usando la molécula de ARN dúplex asimétrico de la presente invención. En una realización, la primera cadena comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria a la secuencia de 50 ARNm diana de un gen seleccionado entre el grupo que consiste en un gen de desarrollo, un oncogén, un gen supresor de tumor, y un gen enzimático, y un gen para una molécula de adhesión, un inhibidor de ciclina cinasa, un miembro de la familia Wnt, un miembro de la familia Pax, un miembro de la familia de hélice alada, un miembro de la familia Hox, una citocina/linfocina o su receptor, un factor de crecimiento/diferenciación o su receptor, un neurotransmisor o su receptor, ABL1, BCL1, BCL2, BCL6, CBFA2, CBL, CSFIR, ERBA, ERBB, EBRB2,ETS1, ETS1, 55 ETV6, FGR, FOS, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MDM2, MLL, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, NRAS, PIM1, PML, RET, SRC, TAL1, TCL3 y YES) (por ejemplo, APC, BRCA1, BRCA2, MADH4, MCC, NF1, NF2, RB1, TP53, WT1, una ACP desaturasa o hidroxilasa, una ADP-glucosa piroforilasa, una ATPasa, una alcohol deshidrogenasa, una amilasa, una amiloglucosidasa, una catalasa, una celulasa, una ciclooxigenasa, una descarboxilasa, una dextrinasa, una ADN o ARN polimerasa, una galactosidasa, una glucanasa, una glucosa

oxidasa, una GTPasa, una helicasa, una hemicelulasa, una integrasa, una invertasa, una isomerasa, una cinasa, una lactasa, una lipasa, una lipoxigenasa, una lisozima, una pectinesterasa, una peroxidasa, una fosfatasa, una fosfolipasa, una fosforilasa, una poligalacturonasa, una proteinasa o peptidasas, una pulanasa, una recombinasa, una transcriptasa inversa, una topoisomerasa, una xilanasa, k-RAS, β -Catenina, Rsk1, PCNA, p70S6K, Survivina, mTOR, PTEN, Parp1, o p21.

La presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad o afección no deseable. El método comprende usar la molécula de ARN dúplex asimétrico para realizar el silenciamiento génico de un gen asociado a la enfermedad o afección no deseable.

10

4.3. Conversión de las moléculas de ARN (aiRNA) en fármacos

4.3.1. Modificaciones de las moléculas de ARN

15 Las moléculas de ARN desnudo son relativamente inestables y pueden degradarse *in vivo* relativamente rápido. Pueden introducirse modificaciones químicas en las moléculas de ARN de la presente invención para mejorar su semivida y reducir aún más el riesgo de efectos no específicos del direccionamiento génico, sin reducir sus actividades biológicas.

20 Las modificaciones de las moléculas de ARN se han investigado para mejorar la estabilidad de diversas moléculas de ARN, incluyendo ARN no codificante, ribozima, aptámero y ARNi (Chiu y Rana, 2003; Czauderna y col., 2003; de Fougerolles y col., 2007; Kim y Rossi, 2007; Mack, 2007; Zhang y col., 2006; y Schmidt, Nature Biotech. 25: 273-275 (2007))

25 Puede usarse cualquier modificación de estabilización conocida por un experto en la técnica para mejorar la estabilidad de las moléculas de ARN de la presente invención. En las moléculas de ARN de la presente invención, se pueden introducir modificaciones químicas en la estructura del fosfato (por ejemplo, enlaces fosforotioato), la ribosa (por ejemplo, ácidos nucleicos bloqueados, 2'-desoxi-2'-fluorouridina, 2'-O-metilo), y/o la base (por ejemplo, 2'-fluoropirimidinas). A continuación se resumen varios ejemplos de dichas modificaciones químicas.

30

Se pueden adoptar modificaciones químicas en la posición 2' de la ribosa, tales como 2'-O-metilpurinas y 2'-fluoropirimidinas, que aumentan la resistencia a la actividad endonucleasa en suero, para estabilizar las moléculas de ARN de la presente invención. La posición para la introducción de la modificación debe seleccionarse cuidadosamente para evitar reducir significativamente la potencia de silenciamiento de la molécula de ARN. Por ejemplo, las modificaciones en el extremo 5' de la cadena guía pueden reducir la actividad silenciadora. Por otro lado, las modificaciones de 2'-O-metilo pueden escalonarse entre las dos cadenas de ARN en la región bicatenaria para mejorar la estabilidad mientras se reserva la potencia del silenciamiento génico. Las modificaciones de 2'-O-metilo también pueden eliminar o reducir la inducción del interferón.

35

40 Otra modificación estabilizante es el enlace fosforotioato (P=S). La introducción del enlace fosforotioato (P=S) en las moléculas de ARN, por ejemplo, en el saliente 3', puede proporcionar protección contra la exonucleasa.

La introducción de desoxirribonucleótidos en las moléculas de ARN también puede reducir el coste de fabricación y aumentar la estabilidad.

45

En una realización, el saliente 3', el saliente 5', o ambos, se estabilizan contra la degradación.

En una realización, la molécula de ARN contiene al menos un nucleótido modificado o su análogo. En una realización adicional, el ribonucleótido modificado se modifica en su azúcar, estructura, base, o cualquier combinación de los tres.

50

En una realización, el análogo nucleotídico es un ribonucleótido modificado en azúcar. En una realización adicional, el grupo 2'-OH del análogo nucleotídico se reemplaza por un grupo seleccionado entre H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, o CN, en el que cada R es independientemente alquilo, alquenilo o alquinilo C1-C6, y halo es F, Cl, Br o

55

l. En una realización alternativa, el análogo nucleotídico es un ribonucleótido modificado en estructura que contiene un grupo fosfotioato.

En una realización, la molécula de ARN dúplex contiene al menos un desoxinucleótido. En una realización adicional, la primera cadena comprende 1-6 desoxinucleótidos. Aún en una realización adicional, la primera cadena comprende 1-3 desoxinucleótidos. En otra realización, el saliente 3' comprende 1-3 desoxinucleótidos. En una realización adicional, el saliente 5' comprende 1-3 desoxinucleótidos. En una realización alternativa, la segunda cadena comprende 1-5 desoxinucleótidos.

En una realización, la molécula de ARN dúplex comprende un saliente 3' o un saliente 5' que contiene al menos un desoxinucleótido. En otra realización, el ARN, el saliente 3' y/o el saliente 5' consisten en desoxinucleótidos.

10 En una realización, la molécula de ARN dúplex se conjuga con una entidad. En una realización adicional, la entidad se selecciona entre el grupo que consiste en péptido, anticuerpo, polímero, lípido, oligonucleótido y aptámero.

En otra realización, la primera cadena y la segunda cadena se unen por un enlazador químico.

15 4.4. Administración *in vivo* de las moléculas de ARN

Un obstáculo importante para el uso terapéutico de ARNi es la administración de siRNA a la célula diana (Zamore y Aronin, 2003). Se han desarrollado diversos enfoques para la administración de moléculas de ARN, especialmente moléculas de siRNA (de Fougerolles y col., 2007; Dykxhoorn y col., 2003; Kim y Rossi, 2007). Cualquier método de administración conocido por un experto en la técnica puede usarse para la administración de las moléculas de ARN de la presente invención.

Los problemas principales en la administración incluyen la inestabilidad en suero, la distribución no específica, las barreras tisulares y la respuesta no específica al interferón (Lu & Woodle, *Methods in Mol Biology* 437: 93-107 (2008)). En comparación con sus homólogos de siRNA y miARN, las moléculas de aiRNA poseen varias ventajas que deberían hacer disponibles una gama más amplia de métodos para el fin de administración. En primer lugar, los aiRNA pueden diseñarse para ser más pequeños que sus homólogos de siRNA y miARN, por lo tanto, reduciendo o eliminando cualquier respuesta a interferón. En segundo lugar, los aiRNA son más potentes, aparecen más rápido, son más eficaces y tienen mayor duración, por lo tanto, se requiere menos cantidad/dosificación de aiRNA para lograr una meta terapéutica. En tercer lugar, el aiRNA es bicatenario y más estable que los oligos y los miRNA no codificantes monocatenarios, y pueden modificarse adicionalmente químicamente para mejorar la estabilidad. Por lo tanto, las moléculas de ARN de la invención pueden administrarse a un sujeto a través de una diversidad de rutas de administración sistémica o local. En algunas realizaciones, las moléculas de la invención se administran a través de rutas de administración sistémica e incluyen intravenosa (I.V.) e intraperitoneal (ip). En otras realizaciones, las moléculas de la invención se administran a través de vías de administración local, por ejemplo intranasal, intravítrea, intratraqueal, intracerebral, intramuscular, intraarticular e intra-tumoral.

Los ejemplos de las tecnologías de administración incluyen inyección directa de moléculas de ARN desnudo, conjugación de las moléculas de ARN con un ligando natural tal como colesterol, o un aptámero, administración formulada en liposomas, y una unión no covalente a proteínas de fusión de anticuerpo-protamina. Otras opciones de portadores incluyen portadores cargados positivamente (por ejemplo, lípidos y polímeros catiónicos) y diversos portadores de proteínas. En una realización, la administración de las moléculas de la invención utiliza un sistema de administración dirigido a ligando basado en los sistemas de complejo de liposomas catiónicos o complejos poliméricos (Woodle, y col. *J Control Release* 74: 309-311; Song, y col. *Nat Biotechnol.* 23(6): 709-717 (2005); Morrissey y col. *Nat Biotechnol.* 23(8): 1002-1007 (2005)).

En una realización, las moléculas de la invención se formulan con un vehículo de colágeno, por ejemplo, atelocolágeno, para una administración *in vivo*. Se ha indicado que el atelocolágeno protege al siRNA de la digestión por RNasa y permite una liberación sostenida (Minakuchi, y col. *Nucleic Acids Res.* 32: e109 (2004); Takei y col. *Cancer Res.* 64: 3365-3370 (2004)). En otra realización, las moléculas de la invención se formulan con nanopartículas o forman una nanoemulsión, por ejemplo, nanopartículas dirigidas a ligando de péptido RGD. Se ha demostrado que se pueden combinar diferentes oligos de siRNA en la misma nanopartícula dirigida a ligando de RGD para el direccionamiento a varios genes al mismo tiempo (Woodle y col. *Materials Today* 8 (compl. 1): 34-41 (2005)).

55 También pueden utilizarse vectores virales para la administración de las moléculas de ARN de la presente invención. En una realización, los vectores lentivirales se utilizan para administrar los transgenes de moléculas de ARN que se integran en el genoma para una expresión estable. En otra realización, se usan adenovirus y virus adeno-asociados (AAV) para administrar los transgenes de moléculas de ARN que no se integran en el genoma y tienen expresión

episomal.

Además, pueden usarse bacterias para la administración de las moléculas de ARN de la presente invención (Xiang y col., 2006).

5

5. Las composiciones farmacéuticas y formulaciones

La presente invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica. El producto farmacéutico comprende como un agente activo al menos una molécula de ARN dúplex asimétrico y uno o más portadores seleccionados entre el grupo que consiste en un vehículo farmacéutico, un vehículo de carga positiva, un liposoma, un vehículo de proteína, un polímero, una nanopartícula, una nanoemulsión, un lípido y un lípido. En una realización, la composición sirva para aplicaciones de diagnóstico, o para aplicaciones terapéuticas.

Las composiciones farmacéuticas y formulaciones de la presente invención pueden ser iguales o similares a las composiciones farmacéuticas y formulaciones desarrolladas para siRNA, miRNA, y ARN no codificante (de Fougereolles y col., 2007; Kim y Rossi, 2007), excepto para el ingrediente de ARN. El siRNA, miRNA, y el ARN no codificante en las composiciones farmacéuticas y formulaciones pueden reemplazarse por las moléculas de ARN dúplex de la presente información. Las composiciones farmacéuticas y formulaciones también pueden modificarse adicionalmente para alojar las moléculas de ARN dúplex de la presente información.

20

Una "sal farmacéuticamente aceptable" o "sal" de la molécula de ARN dúplex desvelada es un producto de la molécula de ARN dúplex desvelada que contiene un enlace iónico, y se produce típicamente haciendo reaccionar la molécula de ARN dúplex desvelada con un ácido o una base, adecuada para la administración a un sujeto. La sal farmacéuticamente aceptable puede incluir, pero sin limitación, sales de adición de ácidos, incluyendo clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos, sulfatos de hidrógeno, alquilsulfonatos, arilsulfonatos, acetatos, benzoatos, citratos, maleatos, fumaratos, succinatos, lactatos y tartratos; cationes de metales alcalinos tales como Na, K, Li, sales de metales alcalinotérreos, tales como Mg o Ca, o sales de aminas orgánicas.

Una "composición farmacéutica" es una formulación que contiene las moléculas de ARN dúplex desveladas en una forma adecuada para la administración a un sujeto. En una realización, la composición farmacéutica está a granel o en forma de dosificación unitaria. La forma de dosificación unitaria es cualquiera de una diversidad de formas, incluyendo, por ejemplo, una cápsula, una bolsa IV, un comprimido, una bomba individual en un inhalador de aerosol o un vial. La cantidad de principio activo (por ejemplo, una formulación de la molécula de ARN dúplex desvelada o sales de la misma) en una dosis unitaria de composición es una cantidad eficaz y varía de acuerdo con el tratamiento particular implicado. Un experto en la técnica apreciará que a veces es necesario realizar variaciones rutinarias de la dosificación dependiendo de la edad y condición del paciente. La dosificación también dependerá de la vía de administración. Se contempla una diversidad de vías, incluyendo las vías oral, pulmonar, rectal, parenteral, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal y similares. Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de una molécula de ARN dúplex de esta invención incluyen polvos, aerosoles, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. En una realización, la molécula activa de ARN dúplex se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón o propulsor que se requiera.

La presente invención proporciona un método de tratamiento que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica a un sujeto que lo necesite. En una realización, la composición farmacéutica se administra a través de una ruta seleccionada entre el grupo que consiste en iv, sc, tópica, po e ip. En otra realización, la cantidad eficaz es de 1 ng a 1 g por día, de 100 ng a 1 g por día, o de 1 µg a 1 mg por día.

La presente invención también proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden una molécula de ARN dúplex de la presente invención en combinación con al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, "excipiente farmacéuticamente aceptable" o "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimiento, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los vehículos adecuados se describen en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Twentieth Edition," Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA., que se incorpora en el presente documento por referencia. Los ejemplos de tales vehículos o diluyentes incluyen, pero sin limitación, agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y albúmina sérica humana al 5%. También se pueden utilizar liposomas y vehículos no acuosos, tales como aceites fijos. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente

convencional sea incompatible con la molécula de ARN dúplex activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. También se pueden incorporar moléculas de ARN dúplex activas complementarias en las composiciones.

- 5 Los métodos para la formulación se desvelan en la Solicitud Internacional PCT PCT/US02/24262 (documento WO03/011224, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2003/0091639 y Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2004/0071775, cada una de las cuales se incorpora por referencia en el presente documento.
- 10 Se administra una molécula de ARN dúplex de la presente invención en una forma de dosificación adecuada preparada combinando una cantidad terapéuticamente eficaz (por ejemplo, un nivel eficaz suficiente para conseguir el efecto terapéutico deseado a través de la inhibición del crecimiento tumoral, la muerte de células tumorales, el tratamiento o la prevención de trastornos proliferativos celulares, etc.) de una molécula de ARN dúplex de la presente invención (como un principio activo) con vehículos o diluyentes farmacéuticos estándar de acuerdo con
- 15 procedimientos convencionales (es decir, produciendo una composición farmacéutica de la invención). Estos procedimientos pueden implicar mezclar, granular y comprimir o disolver los ingredientes según sea apropiado para lograr la preparación deseada. En otra realización, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de ARN dúplex de la presente invención en una forma de dosificación adecuada sin vehículos o diluyentes farmacéuticos estándar.
- 20 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen vehículos sólidos tales como lactosa, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. Los ejemplos de vehículos líquidos incluyen jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, agua y similares. De manera similar, el vehículo o diluyente puede incluir un material de retardo conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o
- 25 diestearato de glicerilo, en solitario o con una cera, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metacrilato de metilo o similares. Otras cargas, excipientes, saporíferos, y otros aditivos, tales como se conocen en la técnica, también se pueden incluir en una composición farmacéutica de acuerdo con esta invención.
- Las composiciones farmacéuticas que contienen moléculas de RNA dúplex activas de la presente invención pueden
- 30 fabricarse de una manera que se conoce generalmente, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, formación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de una manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y/o auxiliares que facilitan el procesamiento de las moléculas de ARN dúplex activo en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. Por supuesto, la
- 35 formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

Una molécula de ARN dúplex o composición farmacéutica de la invención se puede administrar a un sujeto en muchos de los métodos bien conocidos usados actualmente para tratamiento quimioterapéutico. Por ejemplo, para el tratamiento de cánceres, una molécula de ARN dúplex de la invención puede ser inyectada directamente en los

40 tumores, inyectada en el torrente sanguíneo o cavidades corporales o puede tomarse por vía oral o aplicarse a través de la piel con parches. Para el tratamiento de afecciones psoriásicas, las vías de administración preferidas son la administración sistémica (por ejemplo, administración oral) o la administración tópica en áreas afectadas de la piel. La dosis elegida debe ser suficiente para constituir un tratamiento eficaz pero no tan alta como para causar efectos secundarios inaceptables. El estado de la afección de la enfermedad (por ejemplo, cáncer, psoriasis y

45 similares) y la salud del paciente deben controlarse estrechamente durante un período razonable después del tratamiento.

Ejemplos

50 A continuación se proporcionan ejemplos para ilustrar adicionalmente diferentes características de la presente invención. Los ejemplos ilustran también una metodología útil para la práctica de la invención. Estos ejemplos no limitan la invención reivindicada.

El ARN de interferencia (ARNi) es un mecanismo catalítico de silenciamiento específico de genes en organismos

55 eucariotas con profundas implicaciones para la biología y la medicina (Fire y col., 1998), 12. El ARNi está mediado por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) (Hammond y col., 2000; Martínez y Tuschl, 2004; Rana, 2007) tras la incorporación con ARN interferentes pequeños (siRNA) de 19-21 pares de bases (pb) con salientes 3', el dúplex de ARN más pequeño conocido a introducir en RISC y mediar el ARNi (Elbashir y col., 2001a; Elbashir y col., 2001b; Elbashir y col., 2001c; Fire y col., 1998; Zamore y col., 2000). Como el sustrato natural del complejo

enzimático RISC, el siRNA puede sintetizarse químicamente o generarse a través del procesamiento catalizado por Dicer de sus diversos precursores (Donze y Picard, 2002; Hammond y col., 2000; Kim y col., 2005; Paddison y col., 2002). Aunque se utiliza ampliamente para el silenciamiento génico, el siRNA tiene una eficiencia limitada en el silenciamiento génico con baja eficacia de silenciamiento para numerosos genes en las células de mamíferos (de Fougierolles y col., 2007; Iorns y col., 2007). Aquí se investigan los requisitos estructurales para un mediador de ARNi eficiente en células de mamíferos. Sorprendentemente, se descubrió que dúplex de ARN asimétrico de 14-15 pb con salientes no codificantes duales median el silenciamiento génico potente y eficaz en las células de mamíferos. El ARN interferente asimétrico (aiRNA), estructuralmente caracterizado por ARN dúplex de 14-15 pb con los salientes no codificantes 3' y 5', se incorporó a RISC con mayor eficacia que siRNA. El aiRNA causó una escisión específica de secuencia del ARNm y el silenciamiento génico dirigido en células de mamíferos. Cuando se dirigió la secuencia idéntica de ARNm de *β-catenina*, el aiRNA fue más eficaz (casi del 100 %), potente (picoM), de inicio rápido (menos de 24 h) y duradero (hasta 1 semana) que el siRNA en la mediación del silenciamiento génico *in vitro*. Estos resultados sugieren aiRNA como la estructura de dúplex de ARN más pequeño incorporado en RISC y el tipo no siRNA de mediadores de ARNi que silencian los genes con una mejor eficiencia que siRNA en células de mamíferos. Por lo tanto, aiRNA pueden tener un potencial significativo para la amplia aplicación de ARNi.

Métodos y materiales

Cultivo celular y reactivos

Se obtuvieron células Hela, SW480, DLD1, HT29 y H1299 de ATCC, y se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero fetal bovino al 10 % (FBS), 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y L-glutamina 2 mM (Invitrogen). Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica fresca (PBMC) de AllCells LLC y se mantuvieron en medio RPMI-1640 que contenía FBS al 10 % y pen./estrep. (Invitrogen). Se sintetizaron ARN pequeños descritos en este estudio por Dharmacon, Qiagen, o tecnologías de ADN integrado (Tabla 2) y se hibridaron siguiendo las instrucciones del fabricante (figura 3a). Se usaron Ago2 humano dirigido a siRNA, y *Dicer* (Ambion) a 100 nM. Las transfecciones de los ARN se realizaron usando DharmaFECT1 (Dharmacon) a las concentraciones indicadas. Se transfectó un vector de expresión Argonaute2 (Ago2) humano (OriGene) usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). La estabilidad en suero se determinó por la incubación de dúplex de aiRNA o siRNA con suero humano al 10 % (Sigma) para la cantidad indicada de tiempo seguido de electroforesis en gel de TBE-acrilamida no desnaturizante y tinción de bromuro de etidio.

Análisis de transferencia Northern.

Para determinar los niveles de *β-catenina*, se extrajo el ARN total con TRIZOL (Invitrogen) de células Hela transfectadas con siRNA o aiRNA en diversos puntos temporales. Se cargaron 20 µg de ARN celular total en cada carril de un gel de agarosa desnaturizante. Después de la electroforesis, el ARN se transfirió a una membrana Hybond-XL Nylon (Amersham Biosciences), se entrecruzó por UV, y se horneó a 80 °C durante 30 min. Las sondas que detectan ARNm de *β-catenina* y *actina* se preparan usando el kit de etiquetado de cebador aleatorio Prime-It II (Stratagene) del fragmento de ADNc de *β-catenina* (1-568 nt) y el fragmento de ADNc de *actina* (1-500 nt). Para analizar la carga de RISC de ARN pequeño, se transfectaron siRNA o aiRNA en células Hela 48 horas después de la transfección con pCMV-Ago2. Las células se lisaron en los puntos temporales indicados y se inmunoprecipitaron con anticuerpo Ago2. Los inmunoprecipitados se lavaron, el ARN se aisló del complejo por extracción de TRIZOL, y se cargaron en un gel PAGE de TBE-Urea al 15 % (Bio-Rad). Tras la electroforesis, el ARN se transfirió a una membrana Hybond-XL Nylon. Se usó un kit de sonda de miRNA mirVana (Ambion) para generar sondas de ARN marcadas con ³²P 5'. Sonda no codificante (5'-GUAGCUGAUUAUUGAUGGACUU-3'). Sonda codificante (5'-UCCAUCAUAUCAGC-3')

Carga de Ago2-RISC *in vitro*.

Las cadenas codificantes y no codificantes de aiRNA o siRNA se marcaron en el extremo con ³²P usando T4 cinasa (Promega). Los ARN marcados en el extremo se purificaron mediante fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, se precipitaron con EtOH, y se resuspendieron en agua. Después, los ARN marcados se hibridaron en cadenas no codificantes de siRNA o aiRNA como se describe. Para lisados *in vitro*, las células Hela se transfectaron durante 24 horas con un vector de expresión Ago2 humano, y los lisados S10 se generaron básicamente como se describe (Dignam y col., 1983). Después, se añadió aiRNA o siRNA dúplex marcados con cadena codificante o no codificante 5' al lisado Ago2-S10. Después de una incubación de 5 min a 37 °C, Ago2 se inmunoprecipitó como se describe, y las fracciones asociadas a Ago2 (sedimento) y no asociadas a Ago2 (sobrenadante) se separaron en un gel de TBE-acrilamida al 20 % y el gel se expuso a una película para detectar la asociación de Ago2 de una cadena codificante.

Para los experimentos de competición de aiRNA y siRNA, se usaron aiRNA y siRNA fríos de hasta 100 pliegues para competir con aiRNA o siRNA marcados con ^{32}P para cargar al RISC. En resumen, se generaron los lisados S10 a partir de células Hela transfectadas con el vector de expresión Ago2 como se describe. Después, se añadió aiRNA o siRNA etiquetado a los lisados S10 seguido inmediatamente de adición de aiRNA o siRNA no etiquetado. La reacción se incubó durante 5 min a 37 °C y se procesó como se ha descrito anteriormente.

qRT-PCR.

Las células transfectadas con el aiRNA o siRNA indicado se cosecharon en los puntos de tiempo indicados después de la transfección. El ARN se aisló con TRIZOL, y la qRT-PCR se realizó usando reactivos de RT-PCR de una etapa TaqMan y conjuntos de cebador y sonda para el ARNm indicado (Applied Biosystems). Los datos se presentan con respecto a las células transfectadas de control y cada muestra se normaliza a los niveles de ARNm de activa. Para el experimento en la figura 14d, las construcciones Stat3 se crearon clonando ADNc Stat3 (Origene) en pcDNA3.1⁺ o pcDNA3.1⁻ en los sitios HindIII-XhoI. Después, los vectores de expresión directos e inversos de Stat3 se co-transfectaron en células Hela con aiStat3 o siStat3 durante 24 horas. Después, las células se cosecharon, el ARN se aisló por TRIZOL, y la qRT-PCR se realizó usando reactivos de RT-PCR de una etapa TaqMan y conjuntos de cebador y sonda para *Stat3* o *actina* (Applied Biosystems). La RT-PCR se realizó en las mismas muestras de ARN usando el kit de RT-PCR de una etapa Superscript (Invitrogen) y los cebadores de Stat3 directo (5'-GGATCTAGAATCAGCTACAGCAGC-3') y de Stat3 inverso (5'-TCCTCTAGAGGGCAATCTCCATTG-3') y los cebadores de actina directo (5'-CCATGGATGATGATATCGCC-3') y de activa inverso (5'-TAGAAGCATTGCGGTGGAC-3').

RT-PCR.

Se preparó ARN total usando el TRIZOL, y el ADNc se sintetizó usando cebadores aleatorios con el sistema de RT-PCR ThermoScript (Invitrogen). La PCR se realizó durante 20 ciclos usando Pfx polimerasa. Cebadores: *ACTINA-1*, 5' CCATGGATGATGATATCGCC-3'; *ACTINA-2*, 5'-TAGAAGCATTGCGGTGGAC-3'; *β -catenina -1*, 5'-GACAATGGCTACTCAAGCTG-3'; *β -catenina -2*, 5'-CAGGTCAGTATCAAACCAGG-3'.

30 Transferencia de Western.

Las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato enfriada con hielo y se lisaron en tampón de lisis (HEPES 50 mM, pH 7,5, Nonidet P-40 al 0,5 %, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ortovanadato sódico 1 mM, ditiotreitil 1 mM, NaF 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 2 mM, y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cada uno de pepstatina, leupeptina y aprotinina). Se separaron 20 μg de proteína soluble por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Se usaron en este estudio anticuerpos primarios contra β -catenina, Nbs1, Survivina, p21, Rsk1, k-Ras, Stat3, PCNA, NQO1, Actina (Santa Cruz), EF2, p70S6K, mTOR, PTEN (tecnología de señalización celular), Ago2 (Wako), Dicer (Novus), y Parp1 (EMD Biosciences). Los complejos de antígeno-anticuerpo se visualizaron por quimioluminiscencia mejorada (GE Biosciences).

40 Análisis de 5'-RACE

El ARN total RNA (5 μg) de células Hela tratadas con aiRNA o siRNA sin silenciamiento se ligó al adaptador de ARN GeneRacerTM (Invitrogen, 5'-CGACUGGAGCAGGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA-3') sin ningún procesamiento anterior. El ARN ligado se transcribió de forma inversa en ADNc usando un cebador aleatorio. Para detectar el producto de escisión, la PCR se realizó usando cebadores complementarios al adaptador de ARN (GeneRacerTM Cebador anidado 5': 5'-GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3') y cebador específico de *β -catenina* (GSP: 5'-CGCATGATAGCGTGTCTGGAAGCTT-3'). Los fragmentos de amplificación se resolvieron en gel de agarosa al 1,4 % y se dimensionaron usando una escalera Plus DNA de 1 kb (Invitrogen). El sitio de escisión específico se confirmó adicionalmente por secuenciación de ADN.

Detección de la respuesta a interferón.

Para el experimento en la figura 15a, se incubaron PBMC directamente con siRNA o aiRNA de β -catenina 100 nM. El ARN total se purificó en 16 horas usando TRIZOL, y los niveles de expresión génica sensibles a interferón se determinaron por RT-PCR como se describe por el fabricante (System Biosciences). Para el experimento en la figura 15b, las células Hela se transfectaron con control o se transfectaron con 100 nM del aiRNA o siRNA indicado durante 24 horas. El ARN total se purificó usando TRIZOL y los niveles de expresión génica sensibles a interferón se determinaron por RT-PCR. Para el análisis de micromatrices, las células Hela se transfectaron con aiRNA o siRNA

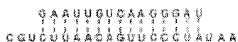
100 nM. El ARN total se purificó en 24 horas usando TRIZOL, y el ARN se usó para la hibridación en Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChip (Affymetrix) de acuerdo con el protocolo del fabricante (ExpressionAnalysis, Inc.). El ARN de células tratadas con DharmaFECT 1 se usó como control. Para calcular los valores de expresión del transcrito, se usó Microarray Suite 5.0 con normalización cuantil, y se usaron en este estudio los transcritos con 5 suficientes señales de hibridación que se denominarán como presentes (P).

Secuencias de aiRNA y siRNA

La secuencia y la estructura de los dúplex de aiRNA y siRNA se enumeraron en la Tabla 2. La ubicación de la 10 mutación puntual se enmarca en el aiRNA k-Ras.

Tabla 2

siβ-catenina	G V A G G U G G A U A U U G A U G G A C U U U U C A U G G A C U A U A A C U A C C U G A	siRsk1	G G A A A U U G G A A C A C A U U U U U U U C C U U A A C C U U G U S U C A A A
aiβ-catenina	G C U G A U A U U G A U G G A G A U C G A C U A U A A C U A C C U G A A	aiRsk1	A A U U G G A A C A C A U U U C C U U C A A C C U U G U S U C A A A A
siNbs1	A U C A U G C U G U U U A A C U U C U U U U A G U A C G A C A C A A A U G A C G	siPCNA	U G G A G A U F C U G U U G Y A A U U U U U A C C U C U A C G A C A A C A U A A
aiNbs1	A U G C U U G U U A C U U G U A G U A C G A C A C A A U G A C G A A	aiPCNA	A G A U G C U U U U A A U A C C U C U A C G A C A A C A U A A A
siEF2	G G C C U C U A U G A U U A U A U U U U C C G G A G A A A C U A C A S A G	siParp1	G U G G C A A G A A G A A A V C Y A U U U U C A C C G U U C U C U U U A G A U
aiEF2	G C U C U A U A U G A U U A U C C G G A G A A A C U A C A S A G A A	aiParp1	G C G A A G A A G A A A U U U G A C C G C U C U C U U G A G A U A A
siStat3	G C C A G C A A A G A A U C A C A U U U U U C G G U C G G U S U U A G U G U A C	siSurvivina	A A G G A G A U C A C A U U U U C A dTdT dTdT U U C U U A G U U G U A A A G U
aiStat3	A G C A A A G A A U C A C A U C G G U C G U U U C U A A G U G U A C A A	aiSurvivina	A G G A G A U C A C A U U U dTdT U U C C U U A G U U G U A A A A G U
siPTEN	A G C U A A A G G U G A A G A U A U A U U U U C C A U U U C C A C U C U A U A U	siNQO1	G C G C A G A C C U U C U F A U A U dTdT dTdT C G G C G U C U G A A C A C U A U A
aiPTEN	U A A A G G U G A A G A U A U U C G A U U U C C A C U C U A U A U A A	aiNQO1	G C A F A C C U U G U G A U A C S G C G U C U G A A C A C U A G A A
siP70S6K	C C U U G U U G A U U U G G A U U U U U U U G G A C A A A C G U A A A C C U A A A	siP21	A G G G C G G C U C A C A U C U U C U U U U U C G G C C A G A U U U A G A A G
aiP70S6K	U G U U G A U U U G G A U U G G C A C A A A C U A A A C C U A A A A	aiP21	G C G G C U C A C A U U U U U C C G G C C A G A U U G U A A A G A A
siTOR	G C A G A A U U C U A A G G A U A U U U U G G U C U U A C A C A U U C C U A U	aiK-Ras	G C A G C U U U G G C U A C A A C C U G A A A A A G C A A A
aiTOR			



Evaluaciones en vida

También se realizaron exámenes diarios sobre el estado de salud de cada animal. Los pesos corporales se revisaron cada tres días. Los alimentos y el agua se suministran diariamente de acuerdo con los procedimientos de cría de animales de la instalación. Los tratamientos que producía >20 % de letalidad y/o >20 % de pérdida neta de peso corporal se consideraron tóxicos. Los resultados se expresan como volumen tumoral medio (mm³) ± SE. Los valores de p <0,05 se consideran estadísticamente relevantes.

10 Cría de los animales

Ratones sin tratar atímicos machos o hembras de 4-5 semanas (Charles River Laboratories, Wilmington, MA), se aclimataron a la instalación de alojamiento de los animales durante al menos una semana antes de la iniciación del estudio. Todos los procedimientos experimentales utilizados fueron coherentes con las directrices descritas por la American Physiology Society and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals y también se aprobaron por el Institutional Animal Care and Use Committee of Boston Biomedical Inc. Los animales se alojados en grupos de cuatro en jaulas con astillas de madera en una sala que tenía una temperatura controlada (68 °F-72 °F), luz (ciclo de luz-oscuridad de 12 horas) y humedad (45-55 %). Los animales tuvieron acceso libre al agua y al alimento durante el experimento.

20 Ejemplo 1. La interferencia asimétrica (aiRNA) causa un silenciamiento específico de genes en células de mamífero

El andamiaje estructural del siRNA se considera la configuración esencial para la incorporación en RISC y ARNi de mediación (Elbashir y col., 2001a; Elbashir y col., 2001b; Elbashir y col., 2001c; Rana, 2007; Zamore y col., 2000). Sin embargo, se conoce muy poco sobre los requisitos del andamiaje del dúplex de ARN para la incorporación en RISC y el silenciamiento génico. Para investigar el requisitos del andamiaje estructural para un mediador de ARNi eficiente y un sustrato RISC, primero se determinó si los dúplex de ARN más cortos que los siRNA podría mediar el silenciamiento génico. La longitud del ARN bicatenario (ds) es un determinante importante de su propensión en la activación de las respuestas al interferón no específicas mediadas por la proteína cinasa R (PKR), el aumento del coste de la síntesis y los desafíos de administración (Elbashir y col., 2001b; Sledz y col., 2003). Se diseñó una serie de dsRNA cortos que varían de 12 a 21 pb con salientes de 2 nucleótidos 3' o extremos romos dirigidos a diferentes genes de mamíferos. No se detectó silenciamiento génico después de que la longitud se redujera por debajo de 19 pb (datos no presentados), lo cual es consistente con los informes anteriores en lisado de células de *Drosophila Melanogaster* (Elbashir y col., 2001b) y la noción de que 19-21 pb es el dúplex de siRNA más corto que media ARNi (Elbashir y col., 2001a; Elbashir y col., 2001b; Elbashir y col., 2001c; Rana, 2007; Zamore y col., 2000).

A continuación se probó si los dúplex de ARN de andamiaje sin siRNA con una configuración asimétrica de salientes podían mediar el silenciamiento génico. El dúplex de siRNA contiene una cadena codificante simétrica y una cadena no codificante. Aunque la estructura del ARNip dúplex que contiene un saliente 3' se requiere para la incorporación en el complejo RISC, después de la escisión mediada por Argonaute (Ago) de la cadena codificante, la cadena no codificante dirige la escisión del ARNm diana (Hammond y col., 2001; Matranga y col., 2005; Tabara y col., 1999). Se buscó hacer dúplex de ARN asimétrico de varias longitudes con salientes en los extremos 3' y 5' de la cadena no codificante.

45 Los oligos con secuencias mostradas en la Tabla 3 se confirmaron por gel de poliacrilamida al 20 % después de la hibridación. Como se muestra en la figura 3A, cada carril se carga como se indica a continuación: carril 1, 21 nt/21 nt; carril 2, 12 nt (a)/21 nt; carril 3, 12 nt (b)/21 nt; carril 4, 13 nt/13 nt; carril 5, 13 nt/21 nt; carril 6, 14 nt/14 nt; carril 7, 14 nt(a)/21 nt; carril 8, 14 nt(b)/21 nt; carril 9, 15 nt/15 nt; carril 10, 15 nt/21 nt.

50

Tabla 3

Oligos	Secuencias	SEQ ID NO:
21 nt/21 nt	5'-GUAGCUGAUUUGAUGGACTT-3' 3'-TTCAUCGACUAUAACUACCUG-5'	1 2
12 nt/21 nt (a)	5'-UGAUUUGAUGG-3' 3'-CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'	3 4
12 nt/21 nt (b)	5'-CUGAUUUGAUG-3'	5

	3'-CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'	4
13 nt/21 nt	5'-CUGAUUUGAUGG-3' 3'-CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'	6 4
14 nt/21 nt (a)	5'-GCUGAUUUGAUGG-3' 3'-CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'	7 4
14 nt/21 nt (b)	5'-CUGAUUUGAUGGA-3' 3'-CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'	8 4
15 nt/21 nt	5'-GCUGAUUUGAUGGA-3' 3'-CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'	9 4

Las células HeLa se pusieron en placas a 200.000 células/pocillo en una placa de cultivo de 6 pocillos. Como se muestra en la figura 3B, 24 horas más tarde se transfectaron con siRNA desordenado (carril 1), E2F1 dirigido a siRNA de 21 pb (carril 2, como un control para especificidad) o beta-catenina dirigida a siRNA de 21 pb (carril 3, como control positivo), o la misma concentración de siRNA de diferente mezcla de longitud: 12 nt(a)/21 nt (carril 4); 12 nt (b)/21 nt (carril 5); 13 nt/21 nt (carril 6); 14 nt (a)/21 nt (carril 7); 14 nt (b)/21 nt (carril 8); 15 nt/21 nt (carril 9). Las células se cosecharon 48 horas después de la transfección. La expresión de *β-catenina* se determinó por transferencia Western. E2F1 y actina se usan como controles. Los resultados demuestran que el ARN interferente asimétrico (aiRNA) causa un silenciamiento específico de genes en células de mamífero.

Con el fin de determinar las características estructurales del aiRNA importante en la función del aiRNA, se generaron múltiples oligonucleótidos de aiRNA basados en la modificación de la estructura de saliente no codificante dual 15/21 central (Tabla 4). Los aiRNA, resumidos en la Tabla 4, contenían modificaciones, incluyendo, pero sin limitación, la longitud de las cadenas codificantes y no codificantes, el grado de salientes codificantes y no codificantes, y oligonucleótidos híbridos ARN-ADN.

La modificación en la estructura de aiRNA 15/21 parental se hizo alterando la cadena codificante, la cadena no codificante, o ambas (Tabla 4). Los dúplex de aiRNA modificados se transfectaron en células Hela a 50 nM durante 48 horas. Las transferencias Western para *β-catenina* y *actina* se usaron para examinar el grado de silenciamiento génico en comparación con el aiRNA 15/21 parental y con la estructura de siRNA tradicional. También se ensayaron modificaciones de aiRNA que contenían salientes de cadena codificante duales. Estos oligonucleótidos contienen una cadena codificante de 21 bases emparejada con cadenas no codificantes de longitud diferente. Además, también se examinó la actividad de los oligonucleótidos de aiRNA que se habían modificado con bases de ADN. Las sustituciones de ADN se hicieron tanto en las cadenas no codificantes como en las cadenas codificantes (Tabla 3). Los oligonucleótidos híbridos ARN-ADN ensayados contenían 1 o más sustituciones de ADN en la cadena codificante o la cadena no codificante, o contenían ARN no codificante de 21 bases emparejado con la longitud indicada de cadena codificante de ADN. Los resultados del silenciamiento génico de estos diversos aiRNA se mostraron en las figuras 4 y 5.

Tomados en conjunto, estos datos proporcionan pistas estructurales con respecto a la función del aiRNA.

En cuanto a la cadena codificante, estos datos indican que la longitud de 15 bases funciona bien, mientras que las longitudes entre 14 y 19 bases permanecen funcionales. La cadena codificante puede corresponder a cualquier parte de la cadena no codificante, siempre que se cumplan las reglas del saliente no codificante. El reemplazo de una única base de ARN con ADN en el extremo 5' o 3' de la cadena codificante se tolera e incluso puede proporcionar una mayor actividad.

Con respecto a la longitud de la cadena no codificante, la longitud de 21 bases funciona bien, 19-22 bases conservan la actividad, y la actividad disminuye cuando la longitud desciende por debajo de 19 bases o aumenta por encima de 22 bases. El extremo 3' de la cadena no codificante requiere un saliente de 1-5 bases prefiriéndose un saliente de 2-3 bases, y el extremo como muestra una disminución en la actividad. Se prefiere el emparejamiento de bases con la secuencia de ARN diana, y el reemplazo de bases de ADN de hasta 3 bases se tolera sin el reemplazo de bases de ADN 5' concurrente. El extremo 5' de la cadena no codificante prefiere un saliente de 0-4 bases, y no requiere un saliente para permanecer activo. El extremo 5' de la cadena no codificante puede tolerar 2 bases que con correspondan con la secuencia de ARN diana, y puede tolerar el reemplazo de bases de ADN de hasta 3 bases sin el reemplazo de bases de ADN 3' concurrente.

Con respecto a las bases desajustadas o químicamente modificadas, se ha descubierto que tanto los desajustes como una o más bases químicamente modificadas en la cadena codificante o no codificante se toleran por la estructura del aiRNA.

Tabla 4: Secuencias de aiRNA usadas para las figuras 4-5

aiRNA #	Estructura genérica	Secuencia
1	15-21 (NNN---NNN)	5' -GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
2	15-21a (NNNNNN---romo)	5' -GAUUAUUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
3	15-21b (romo---NNNNNN)	5' -GUAGCUGAUUUGAU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
4	15-21c (NNNN---NN)	5' -CUGAUUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
5	15-21d (NN---NNNN)	5' -AGCUGAUUUGAUGG CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
7	15-18b (corte romo 3'---NNN)	5' -GCUGAUUUGAUGGA CGACUAUAACUACCUGAA-5'
8	15-21d (N---NNNNN)	5' -UAGCUGAUUUGAUG CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
9	15-21e (NNNNN---N)	5' -UGAUUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
10	15-22a (NNNN---NNN)	5' -GCUGAUUUGAUGGA UCAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
11	15-22b (NNN---NNNN)	5' -GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAAA-5'
13	15-24a (NNNNN---NNNN)	5' -GCUGAUUUGAUGGA UUCAUCGACUAUAACUACCUGUAA-5'
14	15-24b (NNNN---NNNNN)	5' -GCUGAUUUGAUGGA UCAUCGACUAUAACUACCUGUCA-5'
15	15-27 (NNNNNN---NNNNNN)	5' -GCUGAUUUGAUGGA GUUCAUCGACUAUAACUACCUGUCAUA-5'
16	15-20a (NNN---NN)	

ES 2 617 877 T3

		5'-GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGA-5'
17	15-20b (NNNN---N)	5'-GCUGAUUUGAUGGA UCAUCGACUAUAACUACCUG- 5'
18	15-20c (NN---NNN)	5'-GCUGAUUUGAUGGA AUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
21	15-19c (NNNN-romo)	5'-GCUGAUUUGAUGGA UCAUCGACUAUAACUACCU-5'
22	15-18a (NN---N)	5'-GCUGAUUUGAUGGA AUCGACUAUAACUACCUG-5'
23	15-18b (NNN-romo)	5'-GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCU-5'
24	15-18c (romo---NNN)	5'-GCUGAUUUGAUGGA CGACUAUAACUACCUGAA-5'
25	15-17a (NN---romo)	5'-GCUGAUUUGAUGGA AUCGACUAUAACUACCU-5'
26	15-17b (romo---NN)	5'-GCUGAUUUGAUGGA CGACUAUAACUACCUGA-5'
29	14-20 (NNN---NNN)	5'-GCUGAUUUGAUGG CAUCGACUAUAACUACCUGA-5'
30	14-19a (NNN---NN)	5'-GCUGAUUUGAUGG CAUCGACUAUAACUACCUG-5'
31	14-19b (NN---NNN)	5'-GCUGAUUUGAUGG AUCGACUAUAACUACCUGA- 5'
33	14-18b (NNN---N)	5'-GCUGAUUUGAUGG CAUCGACUAUAACUACCU-5'
34	16-21a (NNN---NN)	5'-GCUGAUUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
35	16-21b (NN---NNN)	5'-AGCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
36	17-21 (NN---NN)	

		5' -AGCUGAUUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
37	18-21a (NN---N)	5' -AGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
38	18-21b (N---NN)	5' -UAGCUGAUUUGAUGGAC CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
39	18-21c (NNN---romo)	5' -GCUGAUUUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
40	19-21a (NN---romo)	5' -AGCUGAUUUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
41	18-21b (romo---NNN)	5' -GUAGCUGAUUUGAUGGA CAUCGUCUAUAACUACCUGAA-5'
42	19-21c (N---N)	5' -UAGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
43	20-21a (N---romo)	5' -UAGCUGAUUUGAUGGACUU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
44	20-21b (romo---N)	5' -GUAGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
45	Incompatibilidad y miRNA	5' -GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
46	Extremo 5' homólogo a diana	5' -GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGUC-5'
47	NNNNNNNNNNNNNNN 3'NNNNNNNNNNNNNNNNNDDD- 5'	5' -GCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGaa-5'
48	NNNNNNNNNNNNNNN 3'DDDNNNNNNNNNNNNNNNNN- 5'	5' -GCUGAUUUGAUGGA catCGACUAUAACUACCUGAA-5'
49	NNNNNNNNNNNNNNN 3'DDDNNNNNNNNNNNNNNNDDD- 5'	5' -GCUGAUUUGAUGGA catCGACUAUAACUACCUGaa-5'
51	DNDNNNNNNNDNDND 3'NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN- 5'	5' -gCtGAUUGaUgGa CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
52	NNNNNNNNNNNNNNN 3'NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-	

	5'	5'-gCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
53	NNNNNNNNNNNNNNNN 3'NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN- 5'	5'-GCUGAUUUGAUGGa CAUCGACUAUAACUACCUGAA-5'
54		5'-UAGCUGAUUUGAUG UUCAUCGACUAUAACUACCUG-5'
55		5'-GUAGCUGAUUUGAUGGA UUCAUCGACUAUAACUACCUG-5'
56		5'-AGCUGAUUUGAUGGA UUCAUCGACUAUAACUACCUG-5'
57	DNNNNNNNNNNNNNNN 3'DDDNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN- 5'	5'-gCUGAUUUGAUGGA catCGACUAUAACUACCUGAA-5'
58	DNNNNNNNNNNNNNNN 3'NNNNNNNNNNNNNNNNNNNDDD- 5'	5'-gCUGAUUUGAUGGA CAUCGACUAUAACUACCUGaa-5'
59	NNNNNNNNNNNNNNND 3'DDDNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN- 5'	5'-GCUGAUUUGAUGGa catCGACUAUAACUACCUGAA-5'
60	NNNNNNNNNNNNNNND 3'NNNNNNNNNNNNNNNNNNNDDD- 5'	5'-GCUGAUUUGAUGGa CAUCGACUAUAACUACCUGaa- 5'
61	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 3'DDDNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5	5'-UAGCUGAUUUGAUGGACU catCGACUAUAACUACCUGAA-5'
62	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 3'NNNNNNNNNNNNNNNNNNNDDD-5'	5'-UAGCUGAUUUGAUGGACU CAUCGACUAUAACUACCUGaa-5'

En la tabla 4, A, U, G, C representan nucleótidos, mientras que a, t, g, c representan desoxinucleótidos.

Ejemplo 2. Mecanismo de silenciamiento génico activado por aiRNA

5 Para investigar el mecanismo de atenuación génica inducida por aiRNA, primero determinó si el silenciamiento génico por aiRNA se produce a nivel de traducción o de ARNm. El análisis de transferencia Northern de β -catenina en células transfectadas con 10 nM del aiRNA de 15 pb mostró que el aiRNA redujo los niveles de ARNm en más de un 95 % en 24 horas y la disminución duró más de 4 días (figura 6a), lo que sugiere que aiRNA media el
10 silenciamiento génico al nivel del ARNm. La reducción del ARNm de β -catenina inducida por aiRNA fue sustancialmente más rápida, eficaz y duradera que por siRNA (figura 6a). Además, se determinó si el aiRNA de 15 pb catalizó la escisión específica de sitio del ARNm de β -catenina. El ARN total aislado de células transfectadas con el aiRNA de 15 pb se examinó mediante amplificación rápida de extremos de ADNc (5'-RACE) y PCR para
15 determinar la presencia de los fragmentos de escisión de ARNm de β -catenina (figura 6b). Se detectaron fragmentos de escisión de β -catenina 4 y 8 horas después de la transfección de aiRNA (figura 6c). El análisis de secuencia mostró que la escisión tenía lugar en la secuencia diana de aiRNA entre las bases 10 y 11 con respecto al extremo

5' de la cadena no codificante de aiRNA (figura 6d). No se observó ninguno de dichos fragmentos de escisión tras la transfección con un aiRNA desorganizado (figura 6c). Estos resultados demuestran que aiRNA indujeron un silenciamiento génico potente y eficaz a través de la escisión específica de secuencia del ARNm diana.

5 A continuación se determinó si el nuevo andamiaje asimétrico de aiRNA puede incorporarse en el RISC. El ARNi se cataliza por el complejo enzimático RISC con una proteína Argonaute (Ago) como la unidad catalítica del complejo (Liu y col., 2004; Matranga y col., 2005). Para determinar si se incorpora aiRNA en el complejo Ago/RISC, se inmunoprecipitó Ago1 humano etiquetado con myc de células que expresaban Ago1 marcado con myc (Siolas y col., 2005) después de que las células se transfectasen con aiRNA. Los ARN pequeños asociados al complejo RISC se
10 detectaron por transferencia Northern de inmunoprecipitados Ago. El análisis de transferencia Northern reveló que el aiRNA entró en el complejo RISC con alta eficiencia (figura 6e). Estos datos sugieren que el andamiaje asimétrico de aiRNA puede ser eficientemente incorporado en RISC.

Dado que aiRNA indujo un silenciamiento génico más eficiente que siRNA, se ensayó si aiRNA puede dar lugar a un
15 complejo RISC más eficientemente que siRNA. Como se muestra en la figura 6e, los complejos aiRNA-Ago2/RISC se formaron más rápido y más eficiente que los complejos siRNA-Ago2/RISC, con más aiRNA contenido en el complejo RISC que el siRNA correspondiente (figura 6e y figura 7A). Ha de apreciarse que, siRNA mostró un patrón típico (21) que es coherente con la formación de estructuras secundarias por siRNA (figura 6e y figura 7). Por el contrario, aiRNA mostró una única banda, lo que sugiere que la menor longitud de aiRNA puede reducir o eliminar la
20 formación de la estructura secundaria como ocurrió con el siRNA.

Además, la configuración asimétrica de aiRNA puede facilitar la formación de RISC activo con cadena no codificante y reducir el RISC ineficaz formado con la cadena codificante (Ref. 16). Los datos demostraron que esto es cierto, como se muestra en la figura 7B, no se puede detectar cadena codificante en el complejo RISC. La figura 8A
25 también demuestra que mientras que la cadena no codificante del aiRNA se asocia fuertemente a Ago 2, la cadena codificante no lo hace. Por el contrario, tanto la cadena no codificante como la cadena codificante del siRNA se asocian a Ago 2. Estos datos sugieren que aiRNA tiene una mayor eficiencia en la formación de RISC que siRNA en las células, lo que puede fundamentar la eficiencia superior del silenciamiento génico de aiRNA.

30 Además, se ha demostrado que se requiere la cadena codificante de siRNA para escindirse con el fin de ser funcional. Por lo tanto, se ensayó si el mismo requisito es cierto para aiRNA. Para ello, el nucleótido en la posición 8 o 9 de la cadena codificante de aiRNA se modificó con 2'-O-metilo para hacerla no escindible. Estos resultados muestran que los aiRNA con la cadena codificante no escindible siguen siendo funcionales (figura 8B), demostrando que el aiRNA es muy diferente a siRNA en cuando a su mecanismo.

35 Además, se cuestionó si hay algún compartimento de carga diferente para el aiRNA y el siRNA. Se usó aiRNA frío o siRNA para competir con el siRNA o aiRNA radiactivamente marcado para el complejo RISC (figura 9). Sorprendentemente, los resultados muestran que el siRNA no compite con el siRNA para el complejo RISC (figura 9B) y el siRNA frío no compite con el siRNA para el complejo RISC (figura 9C). Estos datos indican que aiRNA y
40 siRNA pueden cargarse en diferentes compartimentos del complejo RISC.

En conjunto, los datos anteriores sugieren que el aiRNA representa el primer andamiaje no siRNA que se incorpora a RISC, proporcionando un nuevo andamiaje estructural que interactúa con RISC. La diferencia de la carga RISC de aiRNA y siRNA se ilustra en el modelo que se muestra en la figura 10. En resumen, debido a la propiedad
45 asimétrica, sólo se selecciona la cadena no codificante para permanecer en el complejo RISC y da como resultado una eficiencia del 100 % en la selección de cadena. Por el contrario, siRNA es estructuralmente simétrico. Tanto la cadena no codificante como la cadena codificante del siRNA tienen la oportunidad de seleccionarse para permanecer en el complejo RISC y, por lo tanto, el siRNA tiene una selección de cadena ineficiente y al mismo tiempo puede causar un silenciamiento génico no específico debido al complejo RISC de cadena codificante.

50 Ejemplo 3. aiRNA media un silenciamiento génico más rápido, potente, eficaz y duradero que siRNA

Para comparar el aiRNA con el siRNA en las propiedades de silenciamiento génico, se determinó en primer lugar la estructura de aiRNA óptima para el silenciamiento génico.

55 El dúplex de siRNA contiene una cadena codificante simétrica y una cadena no codificante. Aunque la estructura de siRNA dúplex que contiene un saliente 3' se requiere para la incorporación en el complejo RISC, después de la escisión mediada por Argonaute (Ago) de la cadena codificante, la cadena no codificante dirige la escisión del ARNm diana (Hammond y col., 2001; Matranga y col., 2005; Tabara y col., 1999). Se buscó hacer dúplex de ARN

asimétrico de diversas longitudes con salientes en los extremos 3' y 5' de la cadena no codificante. Se diseñó un conjunto de tales dúplex de ARN asimétrico de 12 a 15 pb con salientes no codificantes 3' y 5' para dirigirse a β -*catenina* (figura 11A), un gen endógeno implicado en el cáncer y células madre (Clevers, 2006). Se ha diseñado un siRNA optimizado de la configuración estándar para dirigirse a β -*catenina* para activar ARNi (Xiang y col., 2006).

- 5 Todos los aiRNA contra β -*catenina* se diseñaron dentro de la misma secuencia dirigida por el siRNA (figura 11A). Los resultados mostraron que el silenciamiento genético óptimo logrado fue con el aiRNA de 15 pb (figura 11B). Por lo tanto, se usó aiRNA de 15 pb para compararse con un dúplex de siRNA de 21 mer en los experimentos posteriores.
- 10 Para nuestra sorpresa, se descubrió que aiRNA indujo una reducción potente y altamente eficaz de la proteína β -*catenina* conservando al mismo tiempo los genes de control no dirigidos *actina* (figura 11C).

A continuación, se examinó el inicio del silenciamiento de genes por ARNasa y siRNA dirigidos a β -*catenina*. La secuencia del aiRNA y siRNA usados se muestra en la figura 11A. Como se muestra en la figura 12, aiRNA tiene un inicio más rápido (figura 12C y D) y también una mejor eficacia (figura 12B y D).

También se compararon los efectos del silenciamiento genético de aiRNA y siRNA sobre diversas dianas y múltiples líneas celulares humanas. Los aiRNA se diseñaron para dirigirse a los genes de diferentes categorías funcionales, incluyendo *Stat3* (figura 13b), *NQO1* (figura 12d), factor de elongación 2 (*EF2*) (figura 13c), *Nbs1* (figura 14b), *Survivina*, (figura 14b), *Parp1* (figura 14b), *p21* (figura 14b), *Rsk1* (figura 14c), *PCNA* (figura 14c), p70S6K (figura 14c), mTOR (figura 14c), y PTEN (figura 14c), además de la β -*catenina* (figura 13a) en las mismas secuencias que se han dirigido con siRNA con baja eficiencia (Rogoff y col., 2004). Como se muestra en la figura 13 y 14, aiRNA es más eficaz que el siRNA en el silenciamiento de *Stat3*, β -*catenina*, *Rsk1*, *p70S6K*, *Nbs1*, *mTOR*, y *EF2*, y es tan eficaz como siRNA en el silenciamiento de *NQO1*, *PCNA*, *Survivina*, *PTEN*, *Parp1* y *p21*. Dado que las secuencias

- 25 diana se eligieron en base a la optimización de siRNA, es posible que la eficacia y la potencia de aiRNA puedan aumentarse adicionalmente mediante por los sitios de direccionamiento que están optimizados para aiRNA. Además, los datos también muestran que el aiRNA es más eficaz que el siRNA contra la β -*catenina* en múltiples líneas celulares, incluyendo Hela (figura 13a), H1299 (figura 14a, panel izquierdo) y Dld1 (figura 14a, panel derecho).
- 30 En conjunto, estos datos demuestran que el aiRNA es más eficaz, potente, de inicio rápido y duradero que siRNA en la mediación del silenciamiento genético en células de mamíferos.

Ejemplo 4. Especificidad del silenciamiento genético mediado por aiRNA

- 35 A continuación, se investigó la especificidad del silenciamiento genético mediado por aiRNA. En primer lugar, se analizaron aiRNA que se dirigían al alelo *k-Ras* de tipo silvestre. Las células DLD1 contienen *k-Ras* de tipo silvestre, mientras que las células SW480 contienen *k-Ras* mutante que tiene una sustitución de pares de bases individual (figura 14d). La transfección de las células DLD1 con *k-Ras* de tipo silvestre dirigido a aiRNA mostró un silenciamiento eficaz, pero no se observó silenciamiento de *k-Ras* mutante en las células SW480. Estos datos
- 40 demuestran que aiRNA media el silenciamiento genético específico de alelos.

La activación de una respuesta de tipo interferón es un mecanismo no específico principal de silenciamiento genético. Un primer motivo de que se usen siRNA para el silenciamiento genético es que el dsRNA de menos de 30 pb ha reducido la agilidad para activar la respuesta de tipo interferón en células de mamífero (Bernstein y col., 2001; Martínez y Tuschl, 2004; Sledz y col., 2003). Se ensayó si aiRNA mostró algún signo de activación de la respuesta de tipo interferón en células de mamífero. El ARN recogido a partir de células PBMC transfectadas con aiRNA contra β -*catenina* y células Hela transfectadas con aiRNA contra *EF2* o *Survivina* se analizó por RT-PCR para determinar los genes inducibles por interferón. Se descubrió que la transfección de aiRNA no mostró ningún aumento por RT-PCR de ninguno de los genes inducibles de interferón ensayados, mientras que los niveles de ARNm dirigidos se

50 redujeron con respecto a las células transfectadas de control (figura 15a y b). También se realizó un análisis de micromatrices para comparar los cambios en la expresión de genes relacionados con la respuesta a interferón conocidos inducidos por aiRNA y miRNA. Como se muestra en la figura 15c, se observaron muchos menos cambios para aiRNA en comparación con el siRNA.

- 55 Además, como se ha mencionado anteriormente, el complejo RISC de cadena codificante puede causar un silenciamiento genético no específico. Para comparar aiRNA y siRNA en el silenciamiento genético no específico mediado por el complejo RISC de cadena codificante, las células se co-transfectaron con aiRNA o siRNA y un plásmido que expresaba *Stat3* (ARN codificante) o un plásmido que expresaba *Stat3* no codificante (ARN no codificante). Las células se cosecharon y el ARN se recogió 24 horas después de la transfección y se determinaron

los niveles relativos de ARN codificante y no codificante de Stat3 por PCR o RT-PCR cuantitativa en tiempo real (inserciones). Los resultados muestran que aiRNA no tiene ningún efecto sobre los ARNm de Stat3 no codificantes mientras que el siRNA si lo tiene (figura 15d). Este resultado demuestra que aiRNA suprime completamente el silenciamiento génico no específico no deseado mediado por el complejo RISC de cadena codificante.

5

En resumen, se demostró que aiRNA es una clase novedosa de inductores del silenciamiento génico, el tipo no siRNA y el andamiaje estructural más pequeño para sustratos RISC y mediadores de ARNi (figura 15f). Estos datos sugieren que el aiRNA trabaja a través de RISC, la maquinaria celular de ARNi. Después de la incorporación en RISC, el aiRNA media la escisión específica de secuencia del ARNm entre la base 10 y 11 con respecto al extremo
10 5' de la cadena no codificante de aiRNA. La configuración asimétrica de aiRNA puede interactuar más eficientemente con RISC que siRNA. Consistente con la alta eficiencia de unión a RISC, el aiRNA es más potente, eficaz, de rápido inicio y duradero que siRNA en la mediación del silenciamiento específico de genes frente a los genes ensayados en nuestro estudio. Aunque estudios anteriores han propuesto una función de Dicer al facilitar una formación de RISC eficiente, estos datos sugieren que aiRNA pueden dar lugar a los complejos RISC activos con
15 alta eficiencia independiente del procesamiento mediado por Dicer.

La característica clave de este andamiaje de dúplex de ARN novedoso es un saliente no codificante en los extremos 3' y 5'. El aiRNA 12-15 pb es el dúplex de ARN más corto conocido para inducir el ARNi. Aunque los dsRNA largos activaron un potente silenciamiento génico en *C. elegans* y *Drosophila Melanogaster*, el silenciamiento específico de genes en células de mamífero no fue posible hasta que se usaron dúplex de siRNA. El andamiaje de siRNA, como se define por la digestión de Dicer, se caracteriza por la simetría en las longitudes de cadena de los salientes 3' de 19-21 pb (Bernstein y col., 2001), que se ha considerado la estructura esencial para su incorporación en RISC para mediar el ARNi. Por lo tanto, los esfuerzos de optimización para los inductores de ARNi se han centrado en los precursores de siRNA, que son invariablemente más largos que siRNA (Soutschek y col., 2004; Zhang y Farwell,
25 2007). Estos datos sugieren que siRNA no es el andamiaje esencial para la incorporación en RISC para mediar ARNi. Los aiRNA de diferentes longitudes mostraron un espectro de la eficacia del silenciamiento génico y la eficiencia de la incorporación en RISC, ofreciendo una única oportunidad para entender el mecanismo de la incorporación en RISC y la activación. La investigación es necesaria para comprender adicionalmente la relación estructura-actividad de aiRNA en la incorporación en RISC y la inducción de ARNi, lo que debería ayudar a
30 establecer una base racional para la optimización de aiRNA con respecto a la selección de secuencias diana, la longitud, estructura, composición química y modificaciones para diversas aplicaciones ARNi.

Ejemplo 5. aiRNA es más eficaz que siRNA *in vivo*

35 Para investigar si aiRNA es eficaz *in vivo* y para compararlo con siRNA, se ensayan los efectos de aiRNA y siRNA en modelos de xenoinjerto de cáncer de colon humano.

El cáncer de colon humano es la segunda causa principal de muerte por cáncer en Estados Unidos. La ruta de señalización de β -catenina de Wnt está estrictamente regulada y tiene importantes funciones en el desarrollo, la
40 homeostasis tisular y la regeneración. La desregulación de la señalización de Wnt/ β -catenina se encuentra frecuentemente en diversos cánceres humanos. El 80 % de los cánceres colorrectales por sí solos revelan la activación de esta ruta, ya sea por la inactivación del gen supresor de tumor adenomatous polyposis coli o por la mutación del proto-oncogén β -catenina.

45 Se ha descubierto que la activación de la señalización de Wnt/ β -catenina es importante tanto para el inicio como el avance de los cánceres de diferentes tejidos. Por lo tanto, la inhibición dirigida de la señalización de Wnt/ β -catenina es un nuevo enfoque racional y prometedor para la terapia de cánceres de diversos orígenes.

In vitro, por el direccionamiento a ribozima se ha demostrado la reducción de la expresión de β -catenina en células
50 SW480 de cáncer de colon humano y la inducción asociada de muerte celular, lo que indica que la expresión de β -catenina es limitante de la tasa para el crecimiento tumoral *in vitro*.

Las células de cáncer de color humano SW480 se inocularon por vía subcutánea en ratones sin tratar atímicos hembra (8×10^6 células/ratón) y se dejaron formar tumores palpables. En este estudio, la dosificación comenzó
55 nmol de siRNA de β -catenina complejados con PEI, aiRNA de β -catenina complejados con PEI o un siRNA no relacionado complejado con PEI como un control negativo a diario. Los animales recibieron un total de 10 dosis de siRNA, aiRNA o control. Los tumores se midieron a lo largo de todo el tratamiento. Como se muestra en la figura 16, el tratamiento intravenoso con siRNA y aiRNA como monoterapia a 0,6 nmol mg/kg inhibió significativamente el

crecimiento tumoral. El % del valor de T/C del siRNA se calculó como del 48,8 % con un valor de p de 0,0286. El tratamiento con los aiRNA específicos de β -catenina, sin embargo, dio como resultado una reducción mucho más potente del crecimiento tumoral. El % de valor de T/C se calculó como del 9,9 % con un valor de p de 0,0024. No hubo ningún cambio significativo en el peso corporal debido a la administración iv del siRNA, aiRNA o control. Estos datos sugieren que la aplicación sistémica *in vivo* de aiRNA a través de formación de complejo con PEI tras el direccionamiento de la β -catenina ofrece una posibilidad para el desarrollo de agentes altamente eficientes, específicos y seguros para aplicaciones terapéuticas para pacientes con cáncer de colon.

Además, también se ensayaron los efectos de aiRNA y siRNA en un modelo de xenoinjerto de cáncer de colon humano HT29. Las células de cáncer de colon humano HT29 se inocularon por vía subcutánea en ratones sin tratar atímicos hembra (6×10^6 células/ratón) y se dejaron formar tumores palpables. En este estudio, la dosificación comenzó cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 200 mm³. Los animales se trataron por vía intravenosa (iv) con 0,6 nmol de siRNA de β -catenina complejados con PEI, aiRNA de β -catenina complejados con PEI o un siRNA no relacionado complejado con PEI como un control negativo cada dos días. Los animales recibieron un total de 8 dosis de siRNA, aiRNA o control. Los tumores se midieron a lo largo de todo el tratamiento. Como se muestra en la figura 17, el tratamiento intravenoso con siRNA y aiRNA como monoterapia a 0,6 nmol mg/kg inhibió significativamente el crecimiento tumoral. El % del valor de T/C de siRNA se calculó que era del 78 % con un valor de p de 0,21. De nuevo, el tratamiento con los aiRNA específicos de β -catenina dio como resultado una reducción incluso más potente en el crecimiento tumoral. El % del valor de T/C se calculó que era del 41 % con un valor de de 0,016. No hubo ningún cambio significativo en el peso corporal debido a la administración iv del siRNA, aiRNA o control. Estos datos sugieren que la aplicación sistémica *in vivo* de aiRNA a través de la formación de complejos de PEI tras el direccionamiento de la β -catenina ofrece una posibilidad para el desarrollo de agentes altamente eficientes, específicos y seguros para aplicaciones terapéuticas para pacientes con cáncer de colon.

En conjunto, el aiRNA puede mejorar significativamente las amplias aplicaciones de ARNi. Los productos terapéuticos a base de siRNA se han enfrentado con desafíos, incluyendo una eficacia limitada, dificultad de administración, respuestas de tipo interferón y coste de fabricación (de Fougerolles y col., 2007; Iorns y col., 2007; Rana, 2007). La mejor eficacia, potencia, durabilidad y el menor tamaño de los aiRNA pueden ayudar o superar estos desafíos ya que el aiRNA es más pequeño y puede necesitar menos material para su administración. Por lo tanto, el aiRNA representa nuevos y más pequeños dúplex de ARN que entran en RISC y media el silenciamiento génico de mejor eficacia, potencia, inicio de acción y durabilidad que el siRNA en células de mamífero, manteniendo un potencial significativo para amplias aplicaciones de ARNi en un estudio de la función génica y terapias basadas en ARNi

35 Referencias

REIVINDICACIONES

1. Una molécula dúplex de ARN interferente asimétrico que consiste en:
 - 5 una cadena no codificante, que consiste en 19-23 nucleótidos, en la que la cadena no codificante contiene un saliente 3' y un saliente 5', y en la que el saliente 3' consiste en nucleótidos de ARN, y una cadena codificante, que consiste en 14-17 nucleótidos, en la que la cadena codificante es al menos un 70 % complementaria a la cadena no codificante, en la que la cadena no codificante es al menos un 70 % complementaria a un ARNm diana; y
 - 10 en la que la cadena no codificante y la cadena codificante forman una región bicatenaria de 14, 15, 16 o 17 pares de bases nucleotídicas.
2. La molécula dúplex de ARN de la reivindicación 1, en la que la cadena codificante consiste en 15 nucleótidos.
- 15 3. La molécula dúplex de ARN de la reivindicación 1, en la que la cadena no codificante consiste en 21 nucleótidos.
4. La molécula dúplex de ARN de la reivindicación 1, en la que la cadena codificante consiste en 15 nucleótidos, la cadena no codificante consiste en 21 nucleótidos y la cadena no codificante y a cadena codificante forman una región bicatenaria de 15 pares de bases nucleotídicas.
- 20 5. La molécula dúplex de ARN de la reivindicación 1, en la que
 - 25 (1) el contenido de GC de la región bicatenaria es del 30 %-70 %;
 - (2) la molécula dúplex de ARN contiene al menos un nucleótido modificado o análogo nucleotídico;
 - (3) la molécula dúplex de ARN contiene al menos un nucleótido modificado o análogo nucleotídico y el al menos un nucleótido modificado o análogo nucleotídico es un ribonucleótido modificado en azúcar, estructura y/o base;
 - 30 (4) la molécula dúplex de ARN contiene al menos un nucleótido modificado o análogo nucleotídico, el al menos un nucleótido modificado o análogo nucleotídico es un ribonucleótido modificado en azúcar, estructura y/o base, y el ribonucleótido modificado en estructura tiene una modificación en un enlace fosfodiéster con otro ribonucleótido;
 - 35 (5) la molécula dúplex de ARN contiene al menos un nucleótido modificado o análogo nucleotídico, el al menos un nucleótido modificado o análogo nucleotídico es un ribonucleótido modificado en azúcar, estructura y/o base, el ribonucleótido modificado en estructura tiene una modificación en un enlace fosfodiéster con otro ribonucleótido, en la que el enlace fosfodiéster está modificado para incluir al menos uno de un heteroátomo de nitrógeno o azufre;
 - 40 (6) la molécula dúplex de ARN contiene al menos un nucleótido modificado o análogo nucleotídico y el al menos un nucleótido modificado o análogo nucleotídico es una base inusual o una base modificada;
 - (7) la molécula dúplex de ARN contiene al menos un nucleótido modificado o su análogo y el al menos un nucleótido modificado o análogo nucleotídico comprende inosina, o una base tritilada;
 - (8) la molécula dúplex de ARN contiene al menos un nucleótido modificado o análogo nucleotídico y en análogo nucleotídico es un ribonucleótido modificado en azúcar, en la que el grupo 2'-OH se reemplaza por un grupo seleccionado entre H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ o CN, en la que cada R es independientemente alquilo, alquenoilo o alquiniilo C1-C6, y halo es F, Cl, Br o I;
 - 45 (9) la molécula dúplex de ARN contiene al menos un nucleótido modificado o análogo nucleotídico y el análogo nucleotídico es un ribonucleótido modificado en estructura que contiene un grupo fosfotioato;
 - (10) la molécula dúplex de ARN contiene al menos un nucleótido modificado o análogo nucleotídico y la cadena no codificante comprende al menos un desoxinucleótido;
 - 50 (11) la molécula dúplex de ARN contiene al menos un nucleótido modificado o análogo nucleotídico, la cadena no codificante comprende al menos un desoxinucleótido, y los al menos un desoxinucleótidos están en una o más regiones seleccionadas entre el grupo que consiste en saliente 5' y región bicatenaria; o
 - (12) la molécula dúplex de ARN contiene al menos un nucleótido modificado o análogo nucleotídico, y en la que la cadena codificante comprende al menos un desoxinucleótido.
 - 55
6. La molécula dúplex de ARN de la reivindicación 1, en la que al menos un nucleótido del saliente 5' se selecciona entre el grupo que consiste en A, U, y dT.

7. La molécula dúplex de ARN de la reivindicación 1, en la que el saliente 5' comprende un motivo "AA".
8. La molécula dúplex de ARN de la reivindicación 1, en la que el saliente 3' tiene pares de bases con el ARNm diana.

5

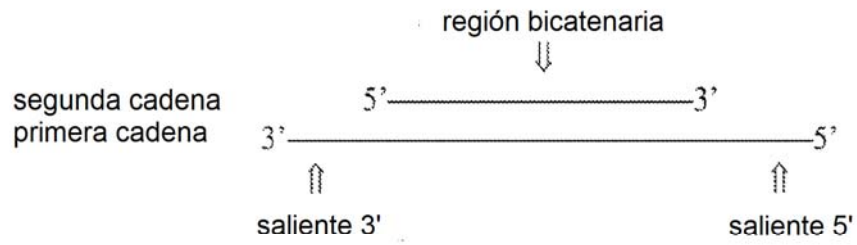


Figura 1A

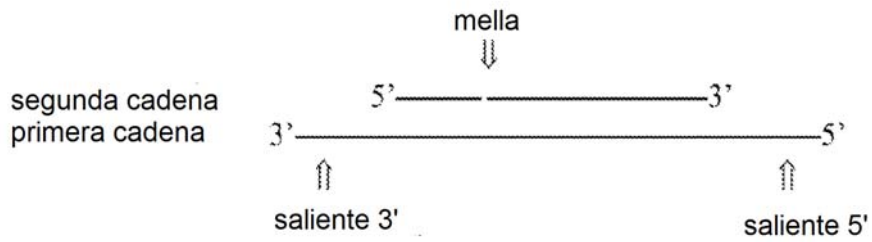


Figura 1B

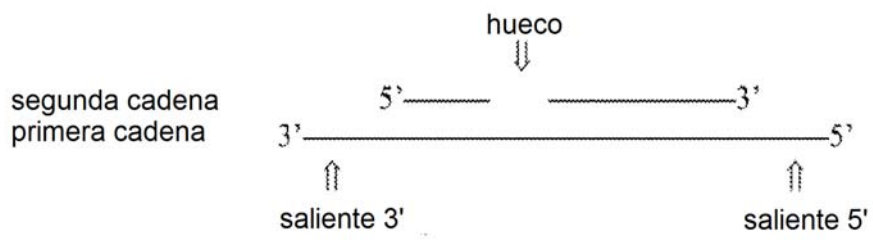
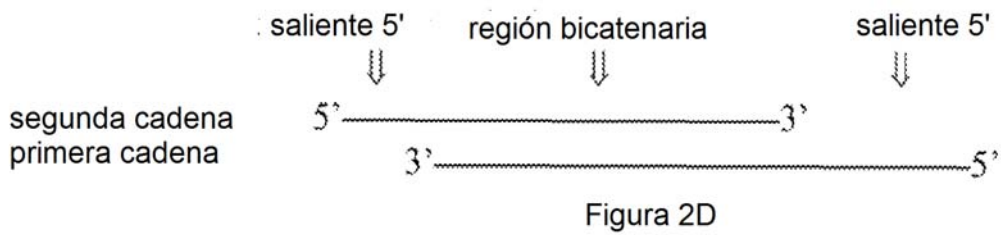
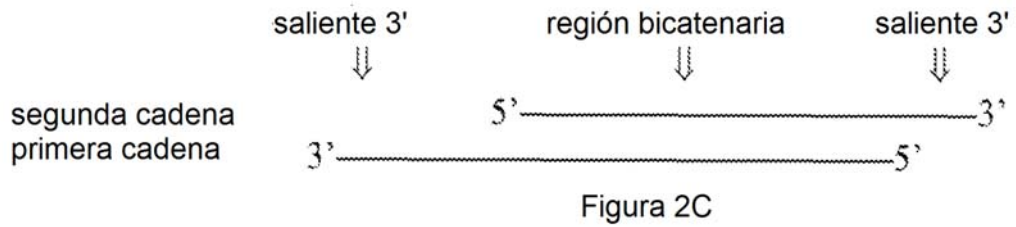
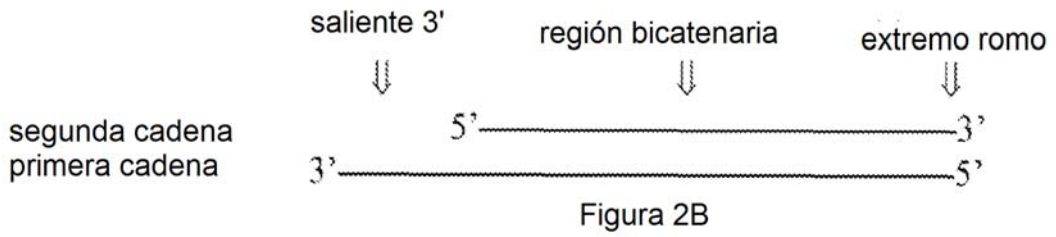
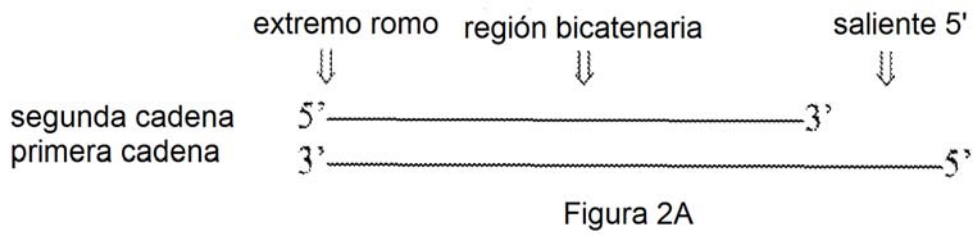


Figura 1C



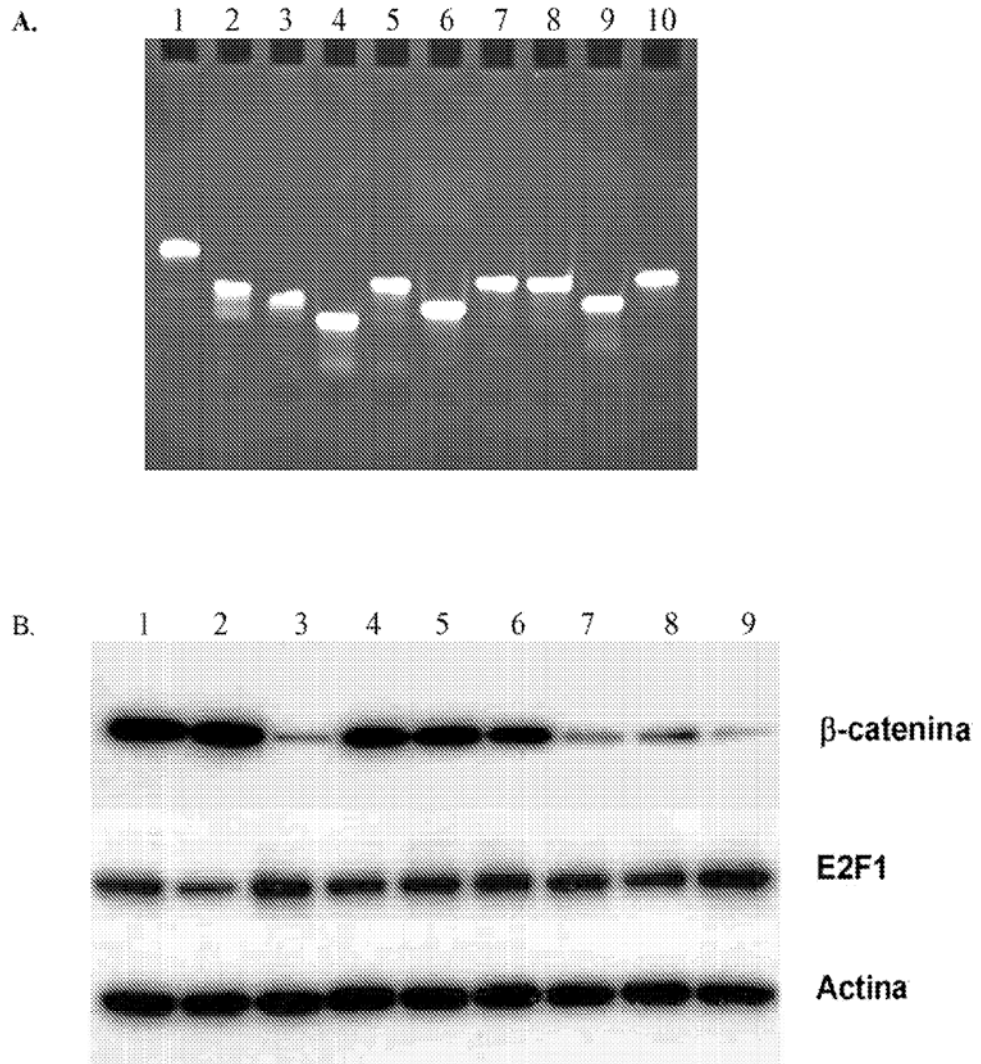


Figura 3

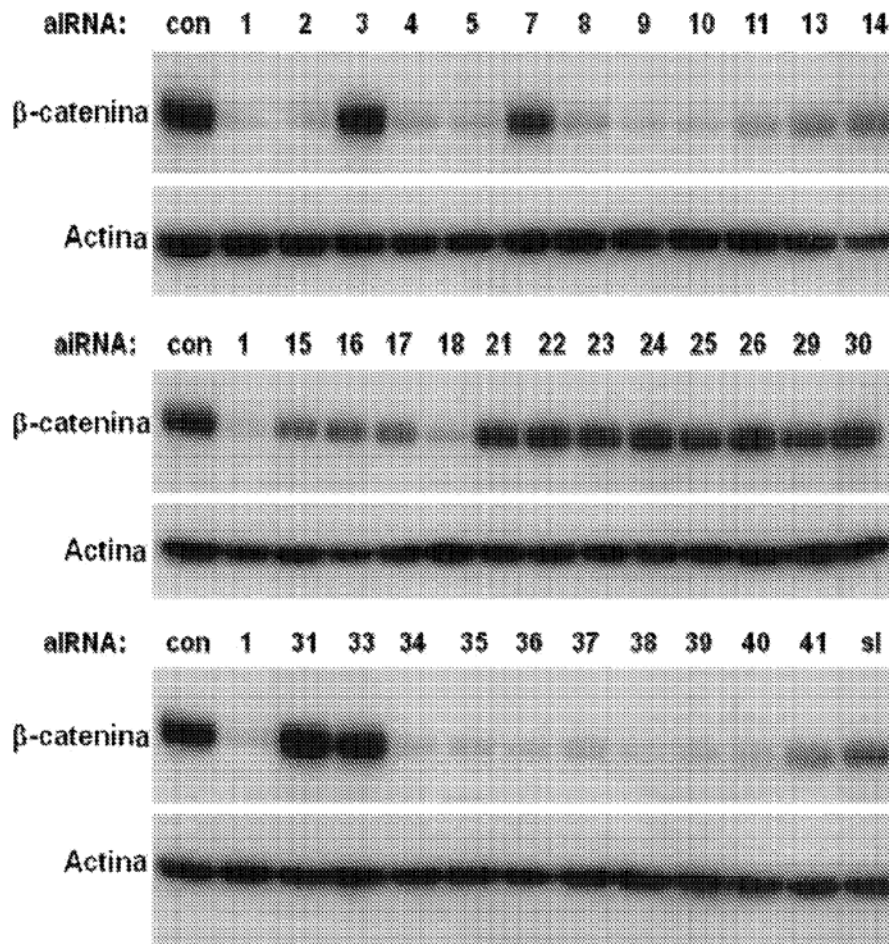


Figura 4

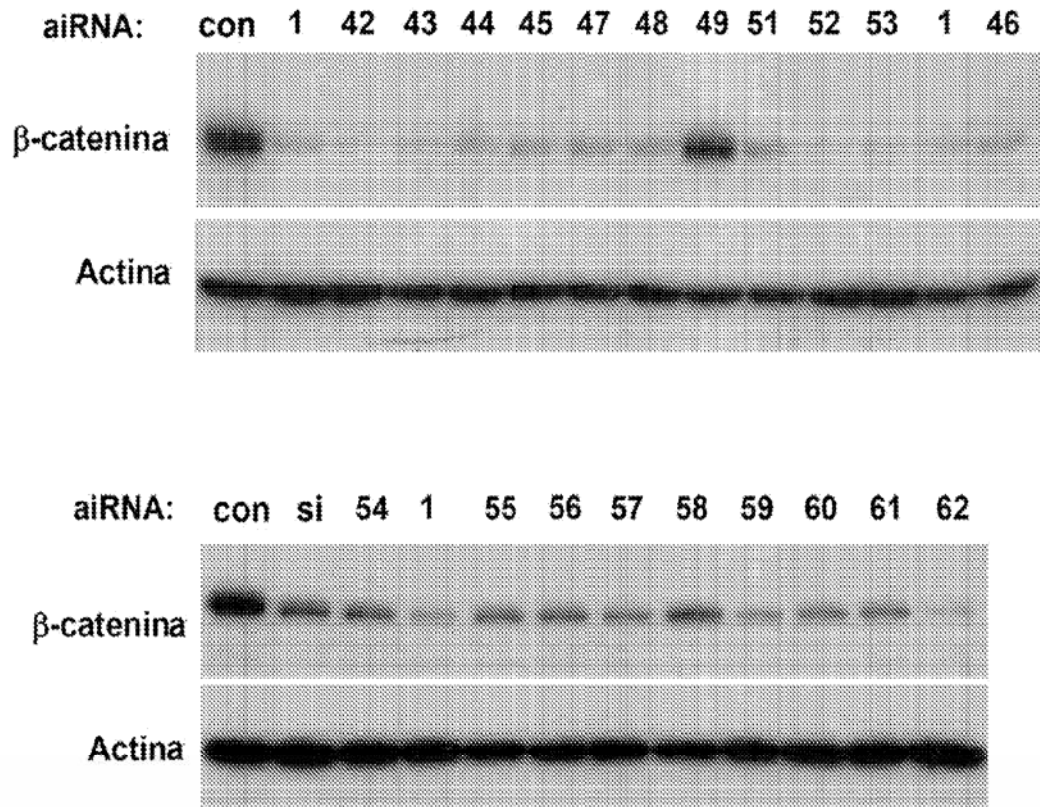
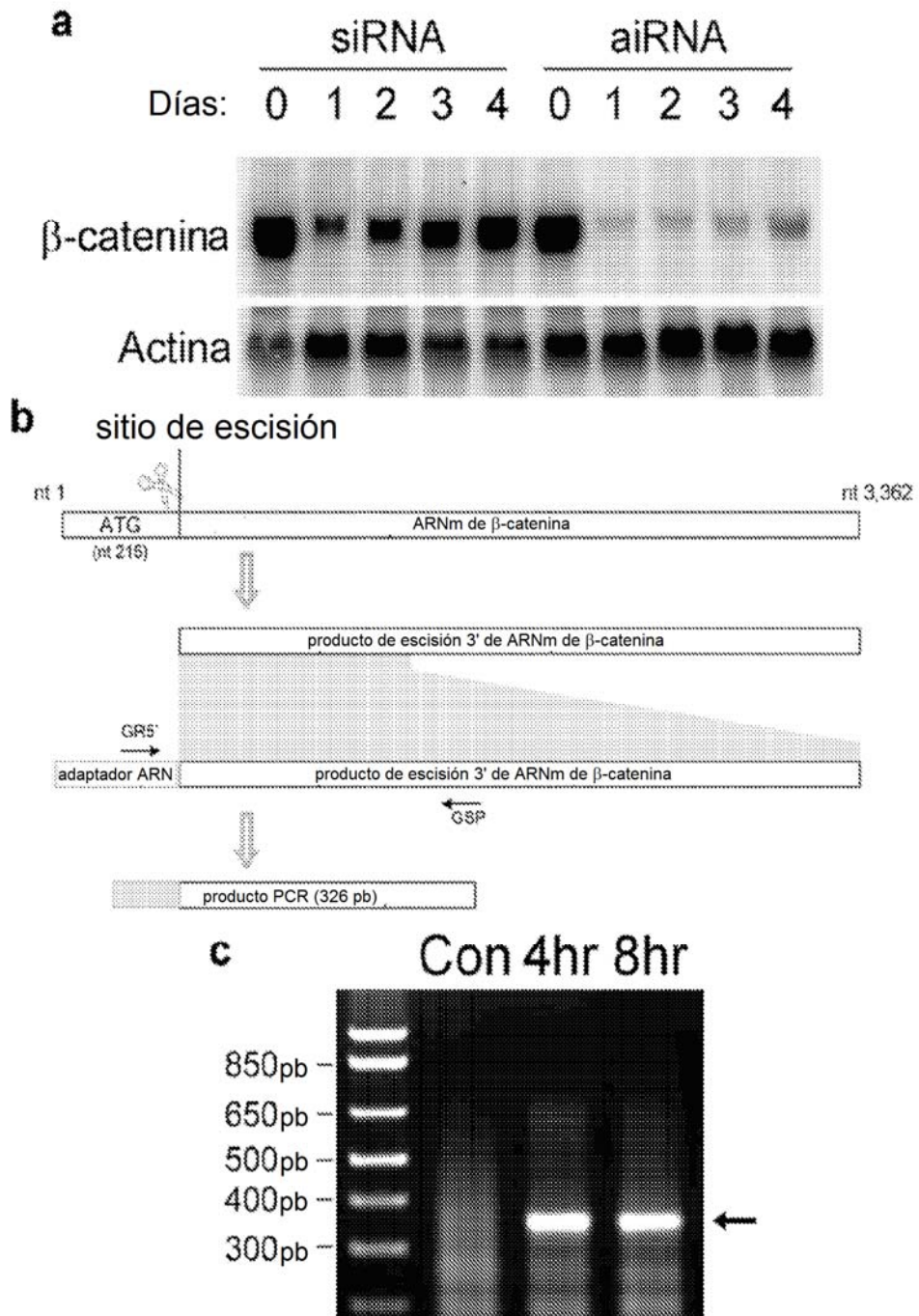
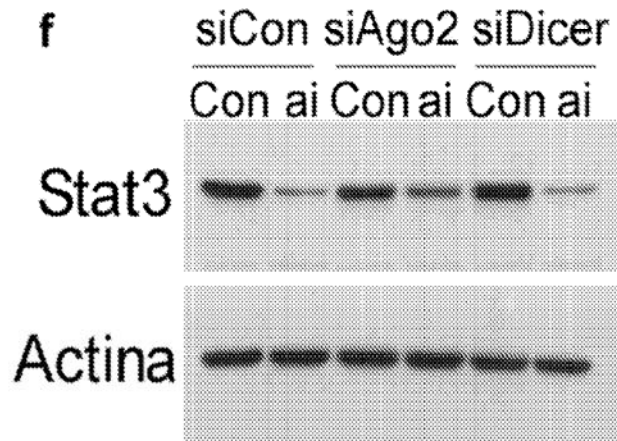
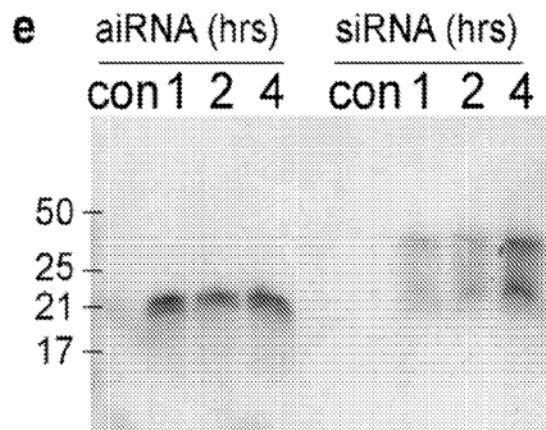


Figura 5





Figuras 6d-6f

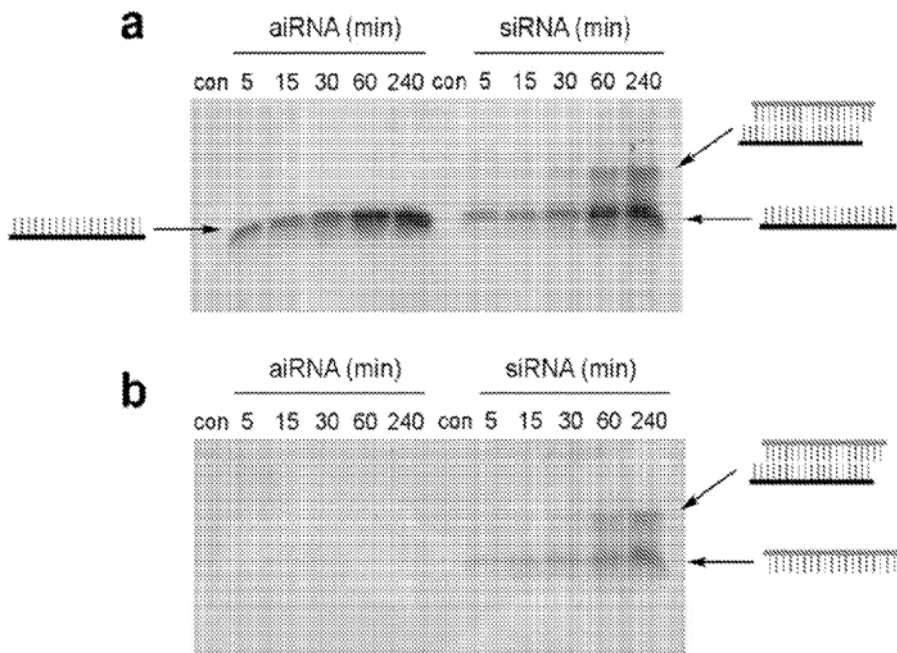


Figura 7

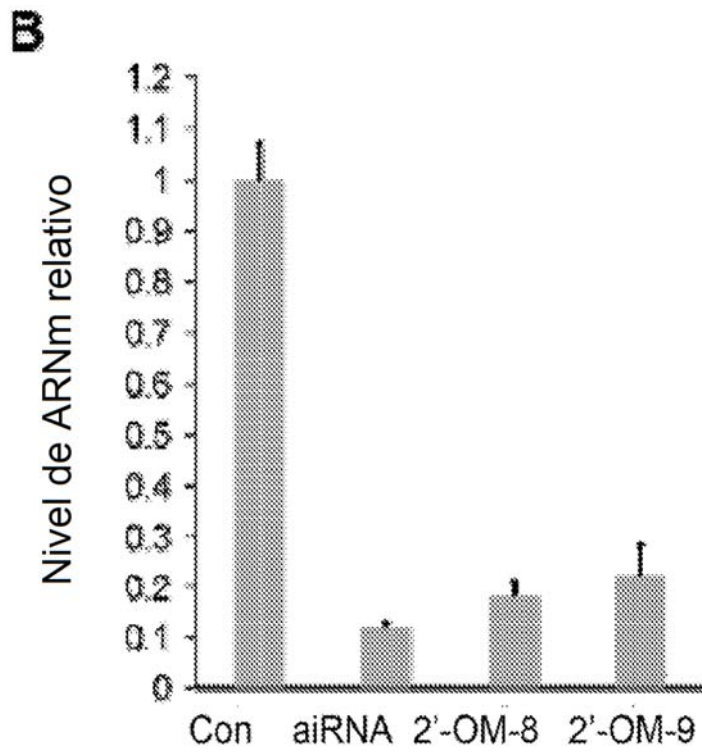
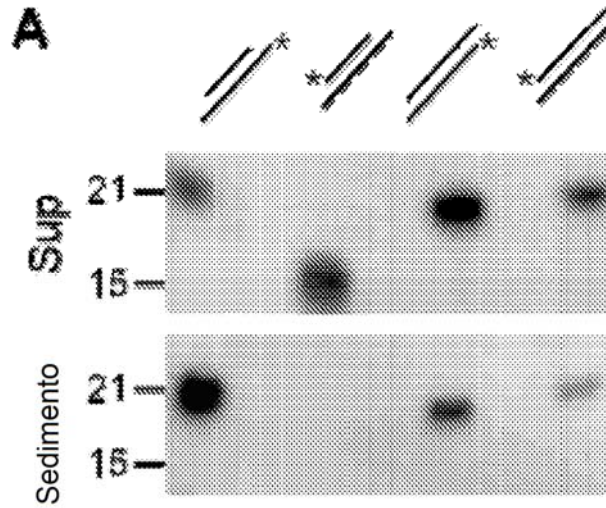


Figura 8

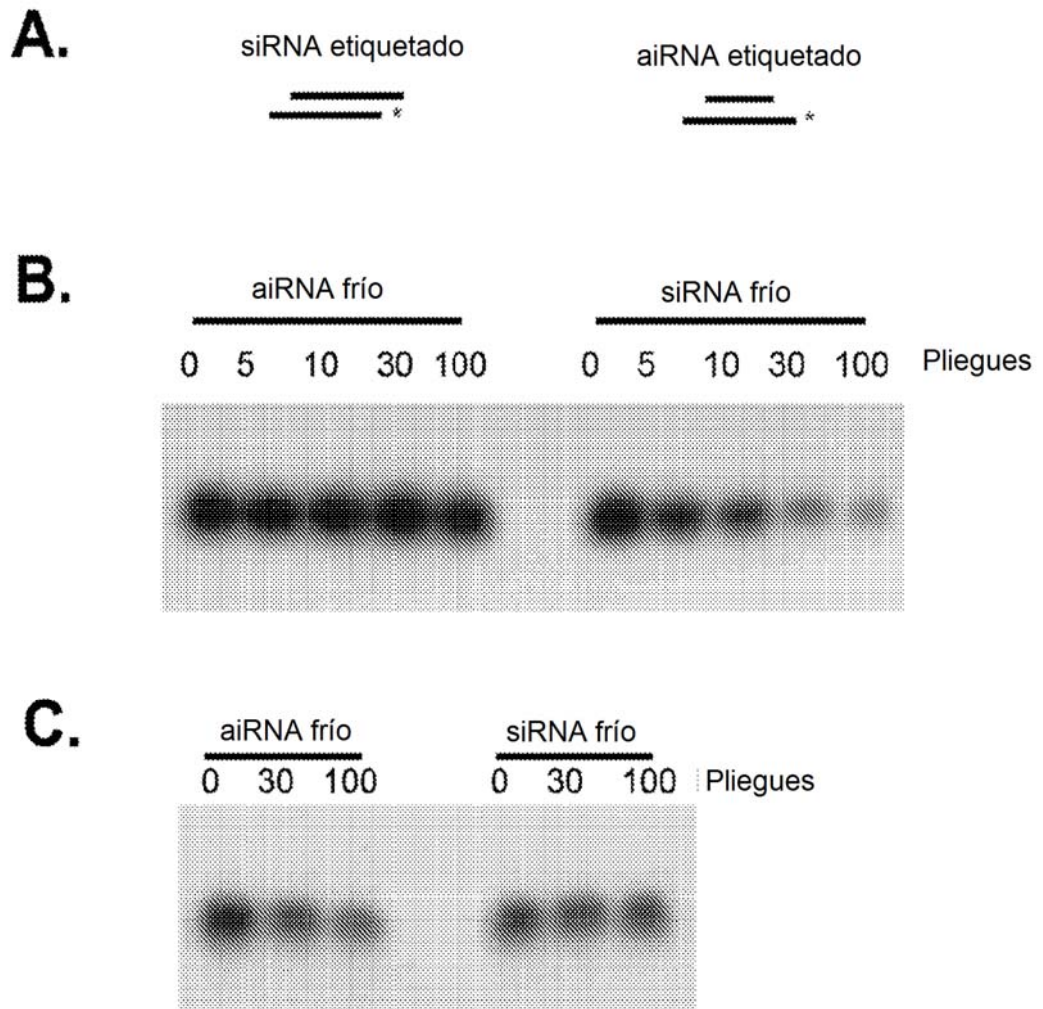


Figura 9

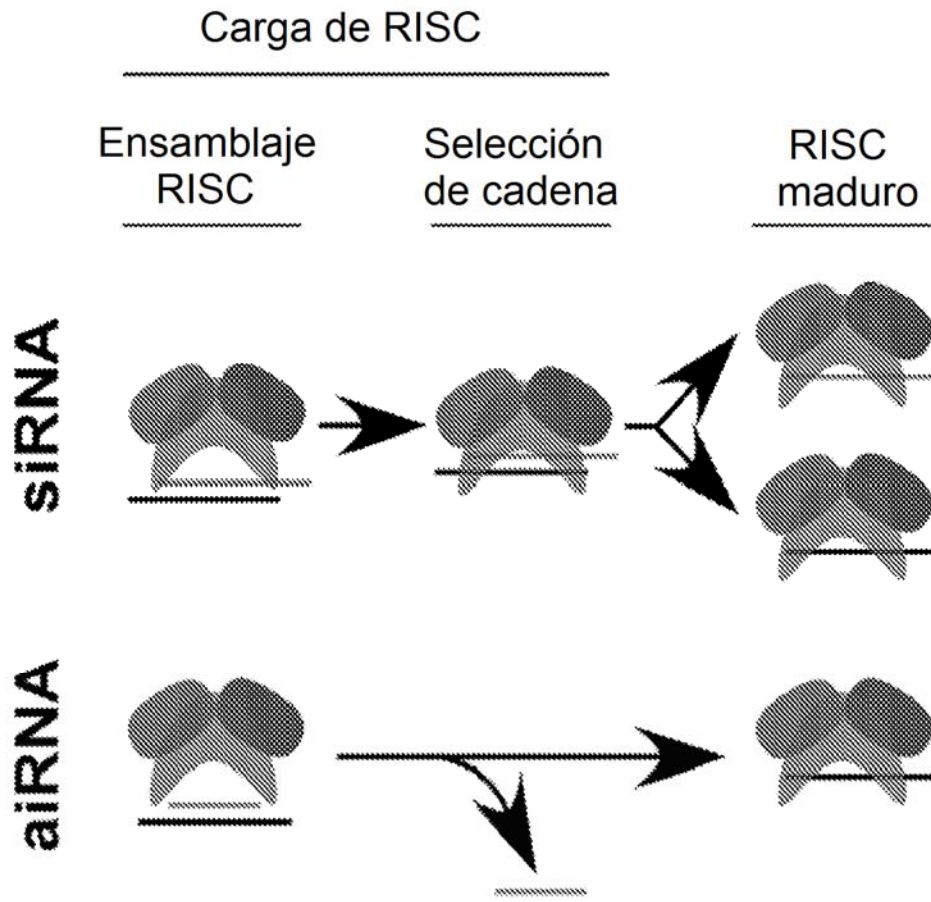
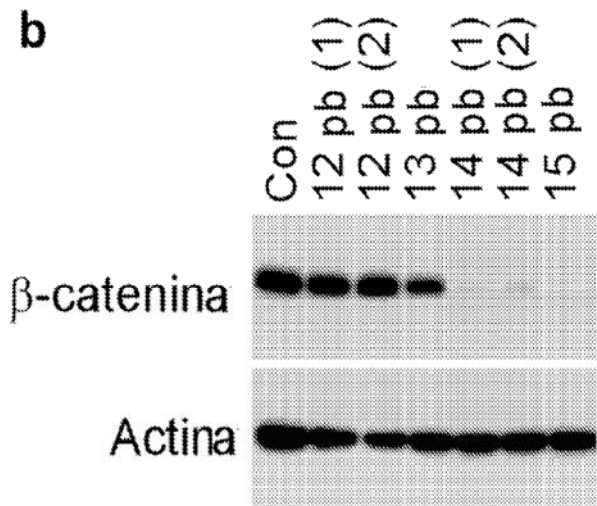
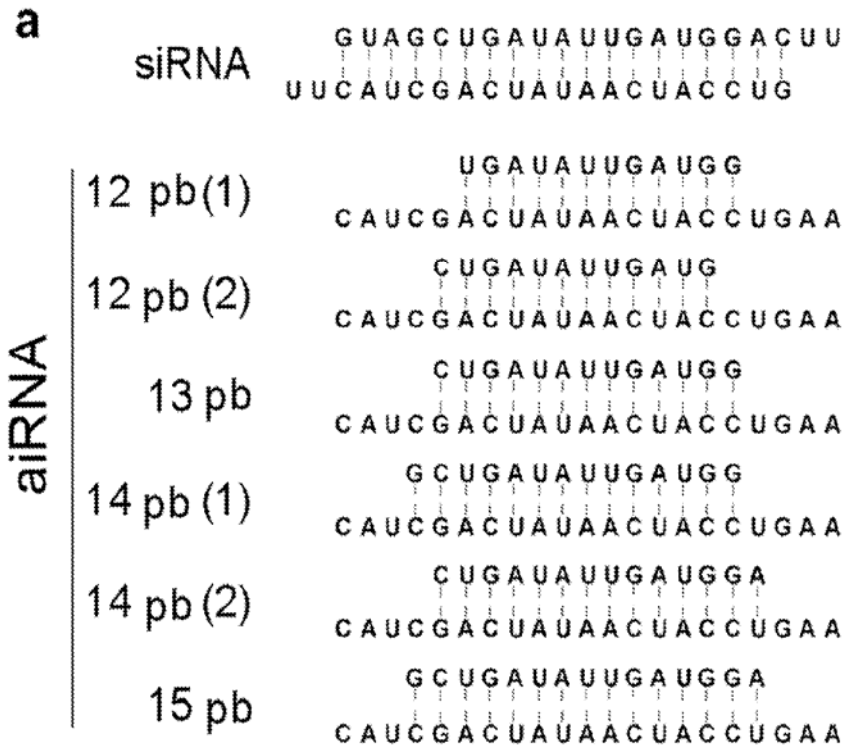
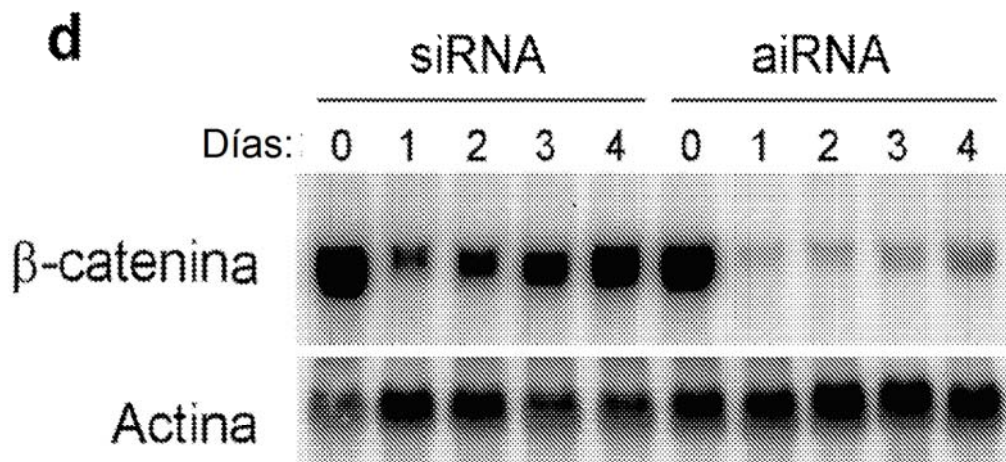
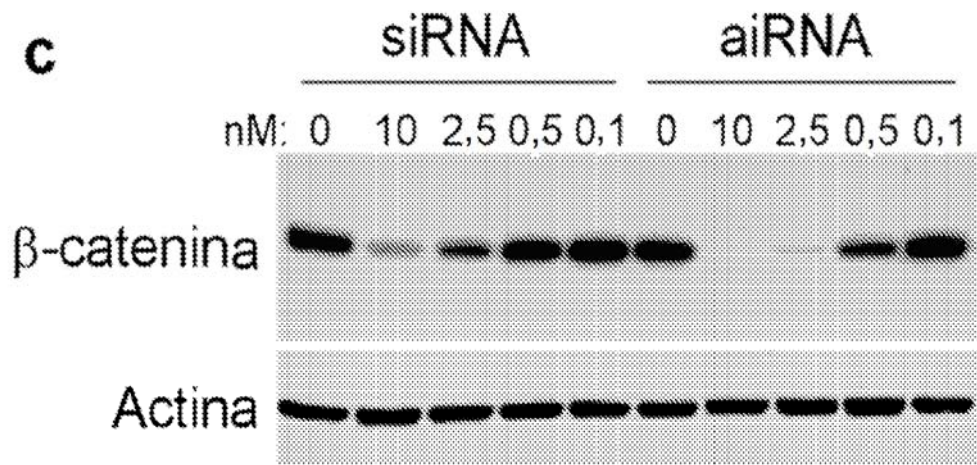


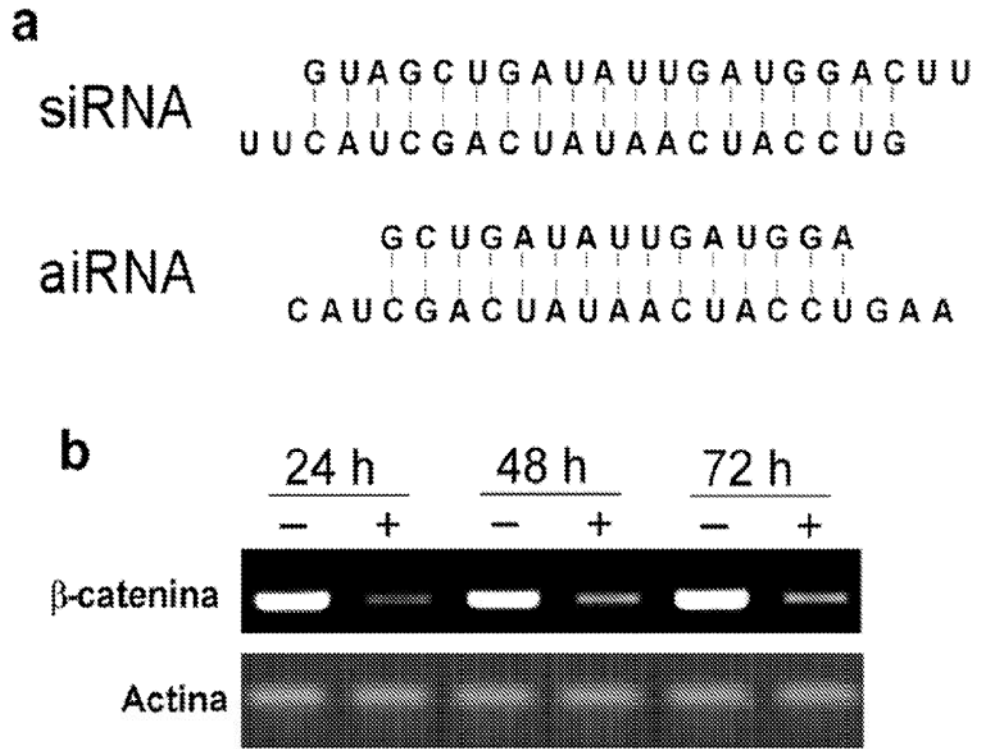
Figura 10



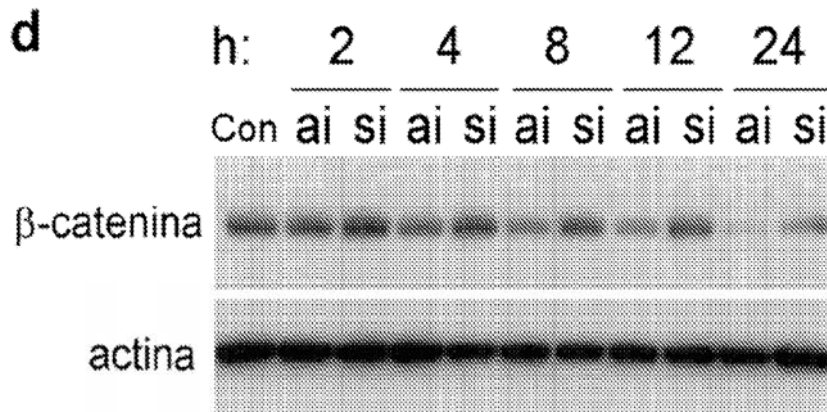
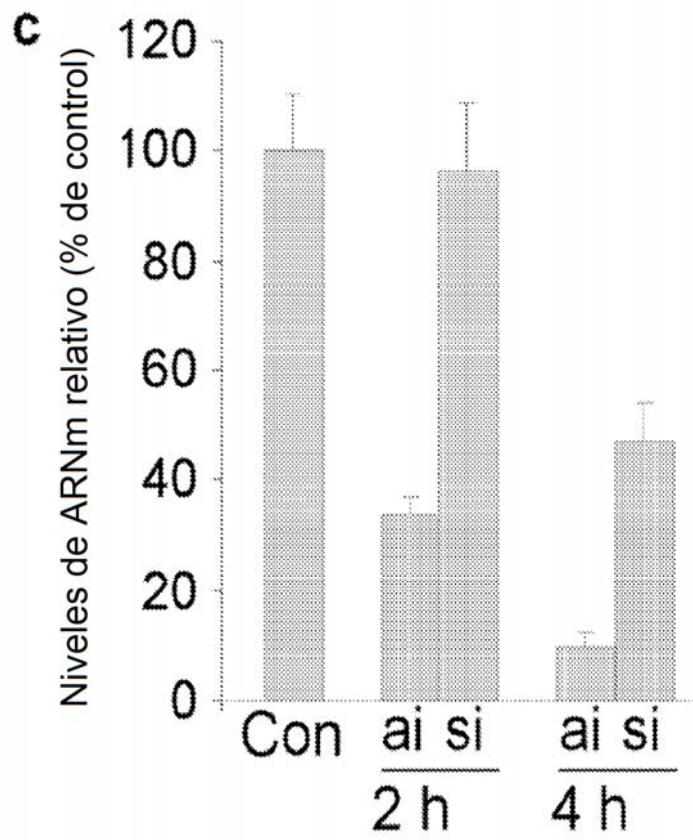
Figuras 11A-11B



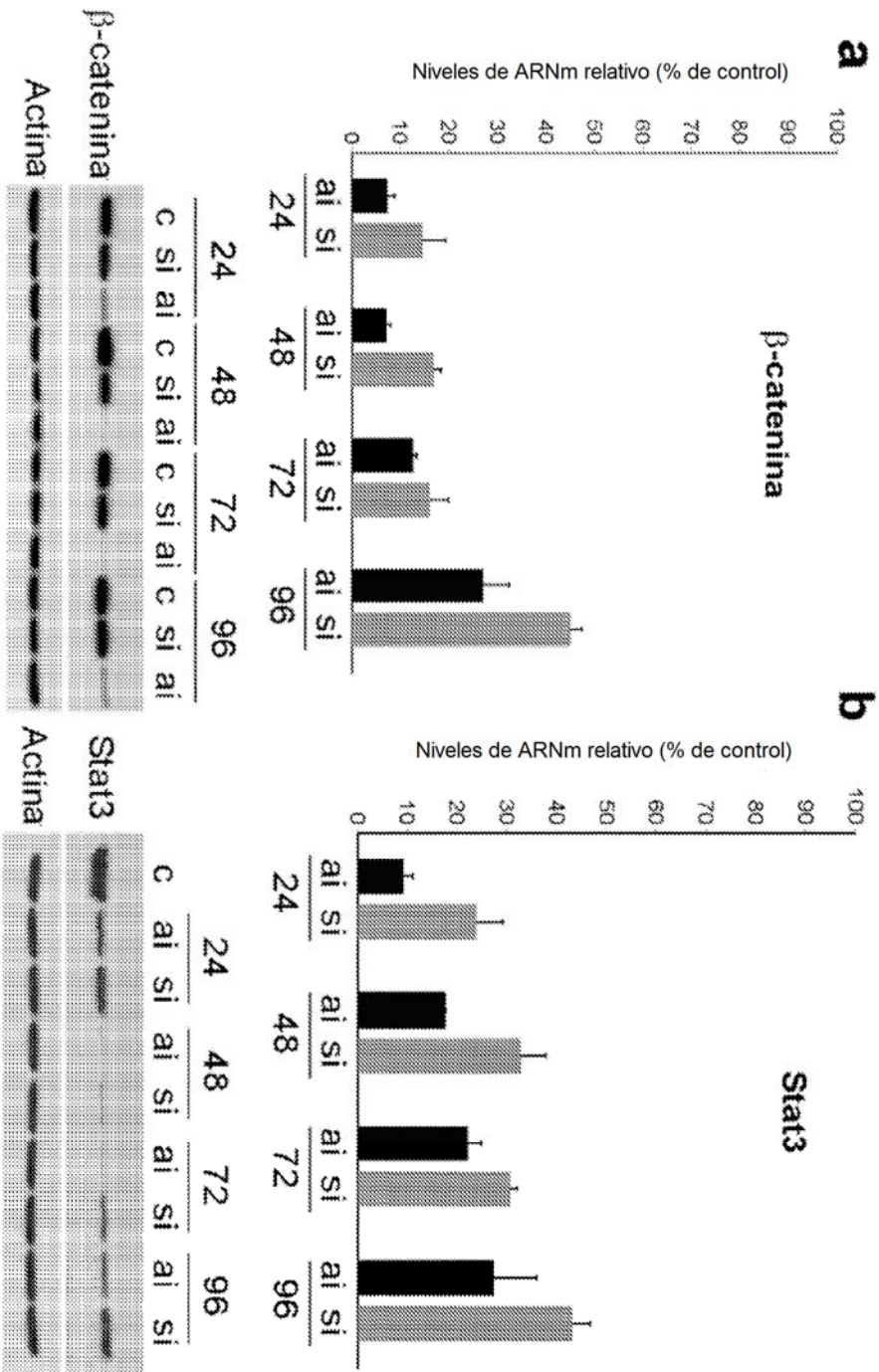
Figuras 11C-11D



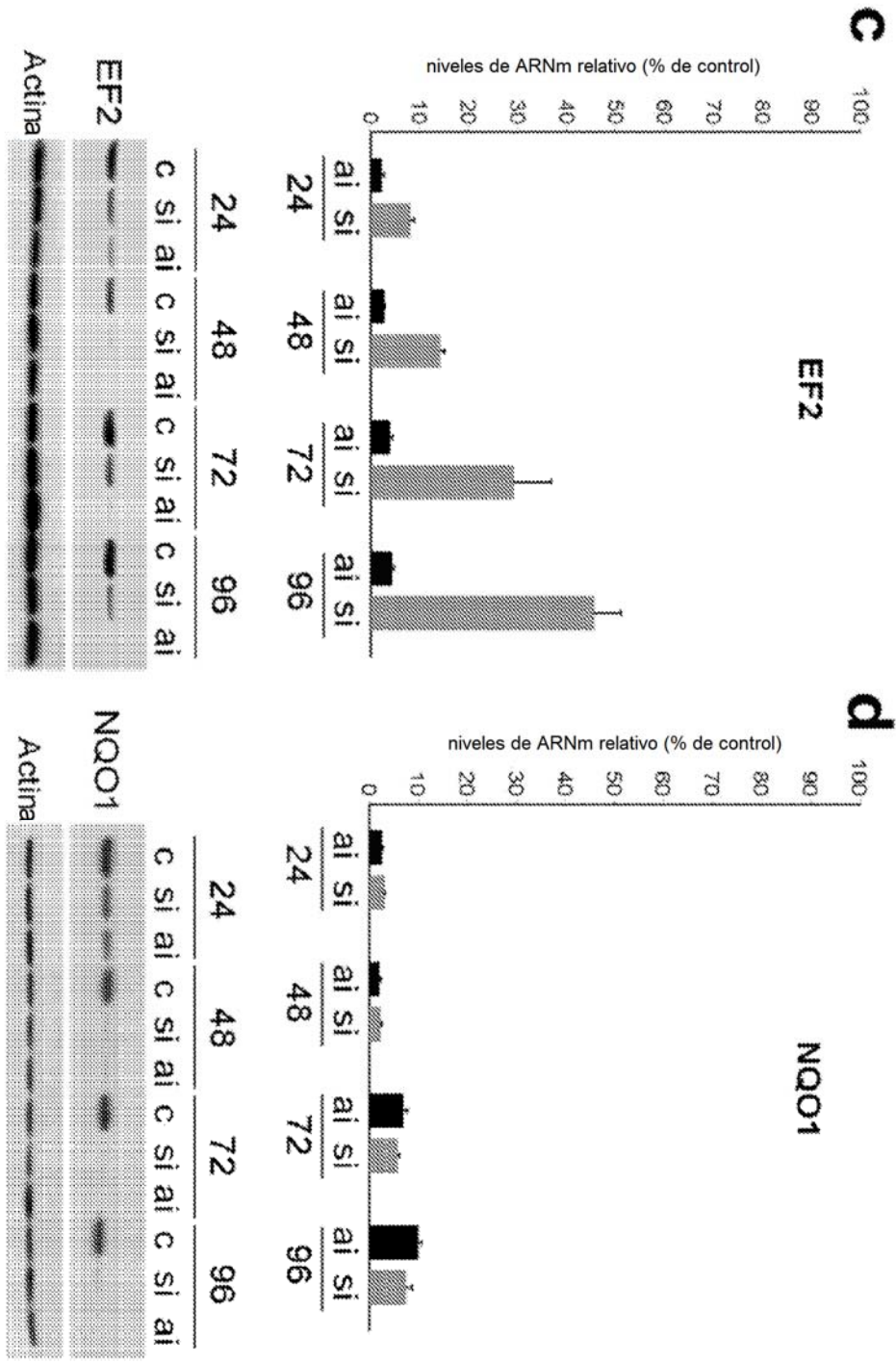
Figuras 12A-12B



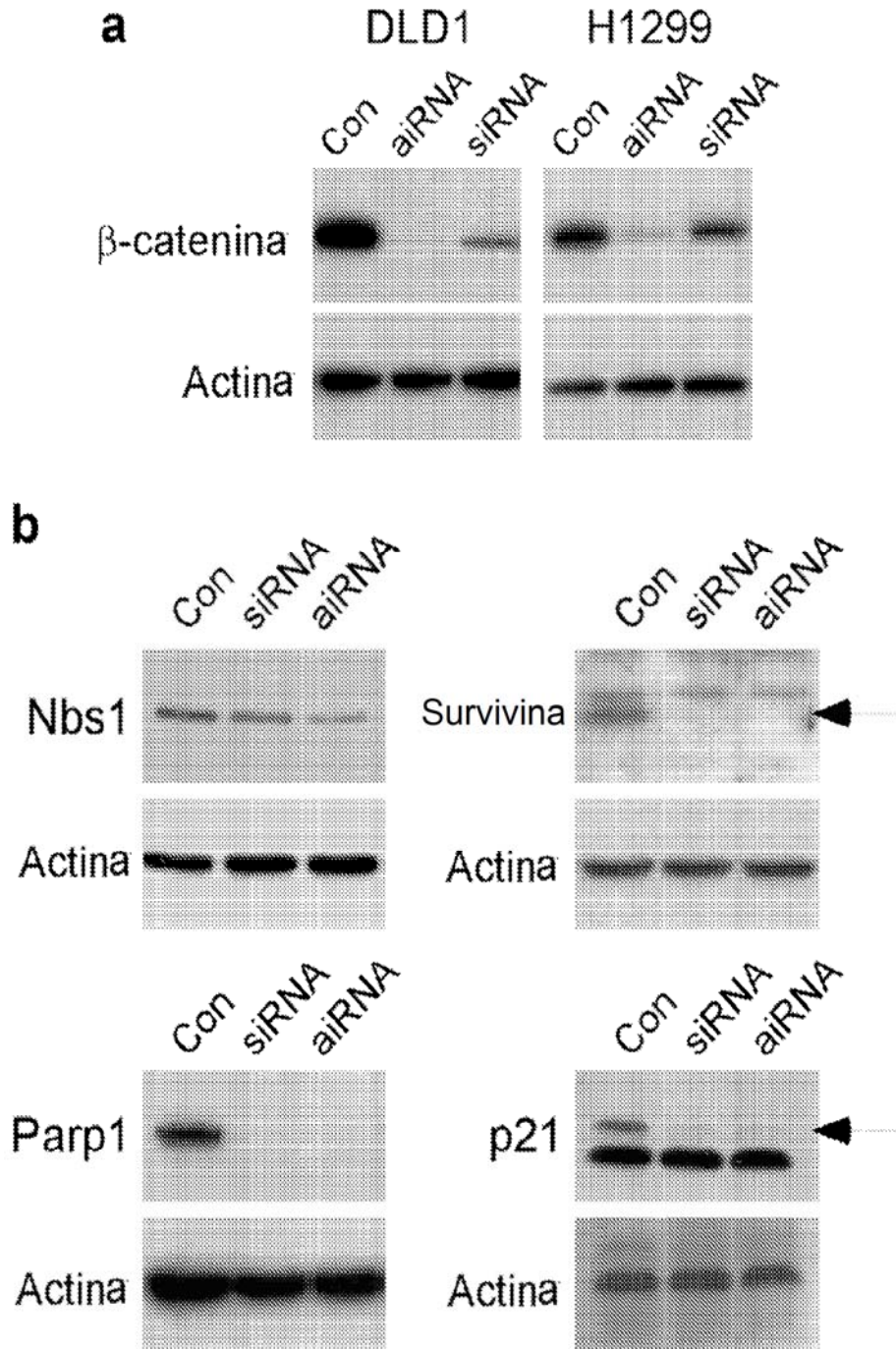
Figuras 12C-12D



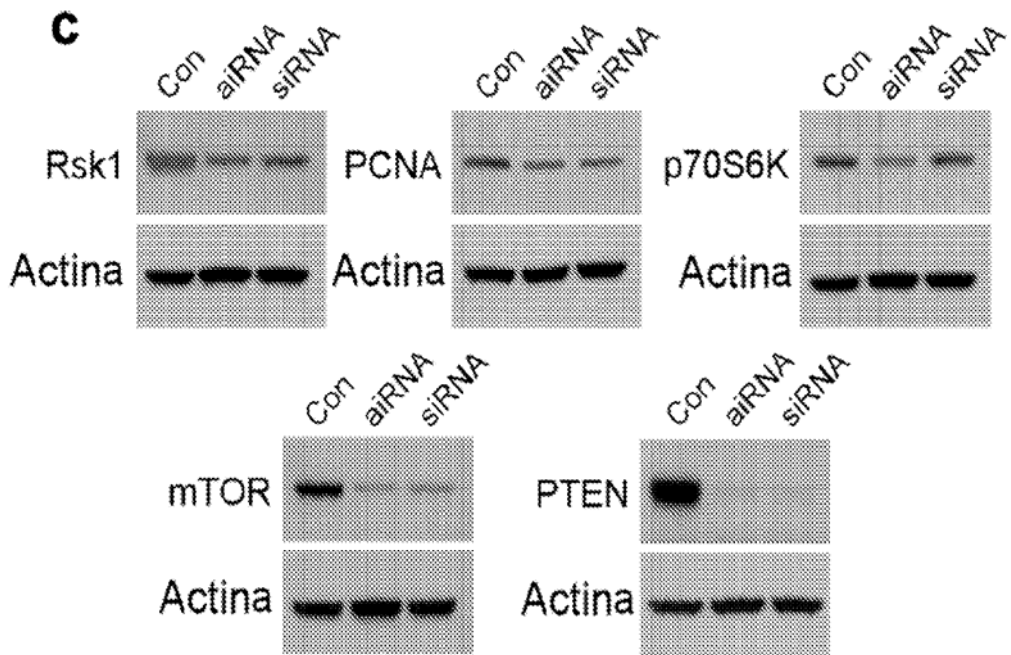
Figuras 13a-13b



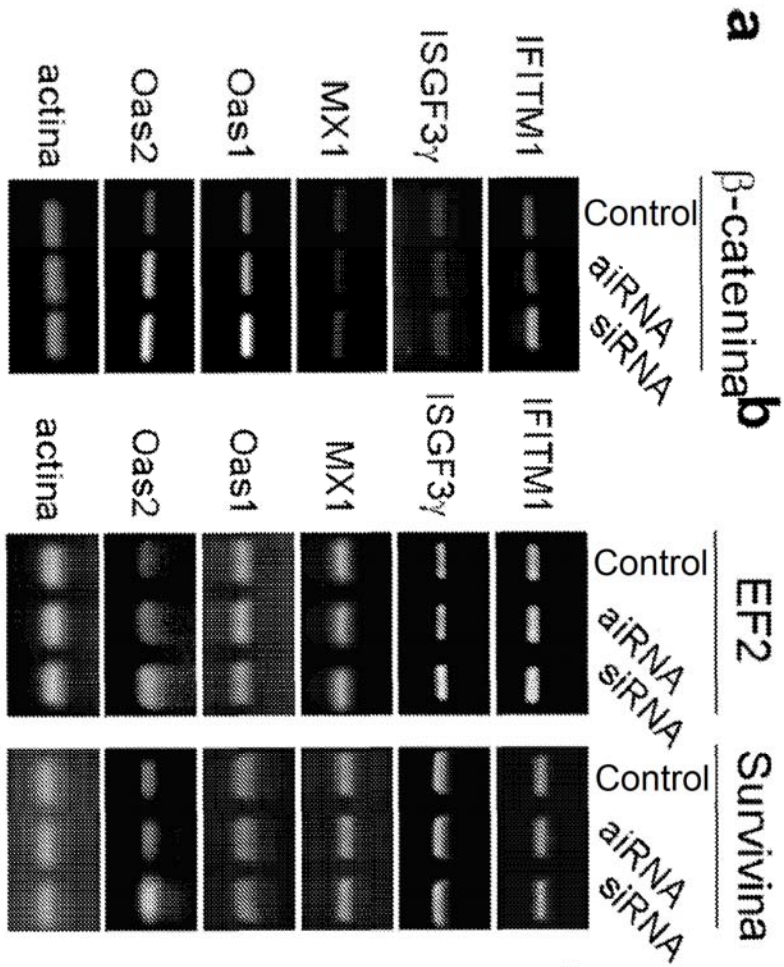
Figuras 13c-13d



Figuras 14a-14b



Figuras 14c-14d



c

	aiRNA	siRNA
ATF3-1	1,74	2
IFIH1	1,32	1,32
RSAD2-1	1,07	4,92
SP110-1	1,07	1,41
ATF3-2	0,93	1,23
SP110-2	0,93	1,14
OAS1	0,87	1,51
IFIT5	0,87	1,23
RSAD2-2	0,81	2,82
OAS3	0,81	1,23
ISGF3 γ	0,87	1,14
MX1	0,93	0,75
IFITM1	0,93	1,07

Figuras 15a-15c

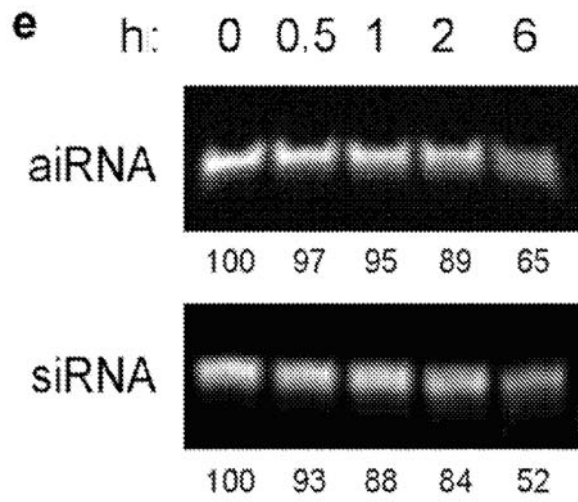
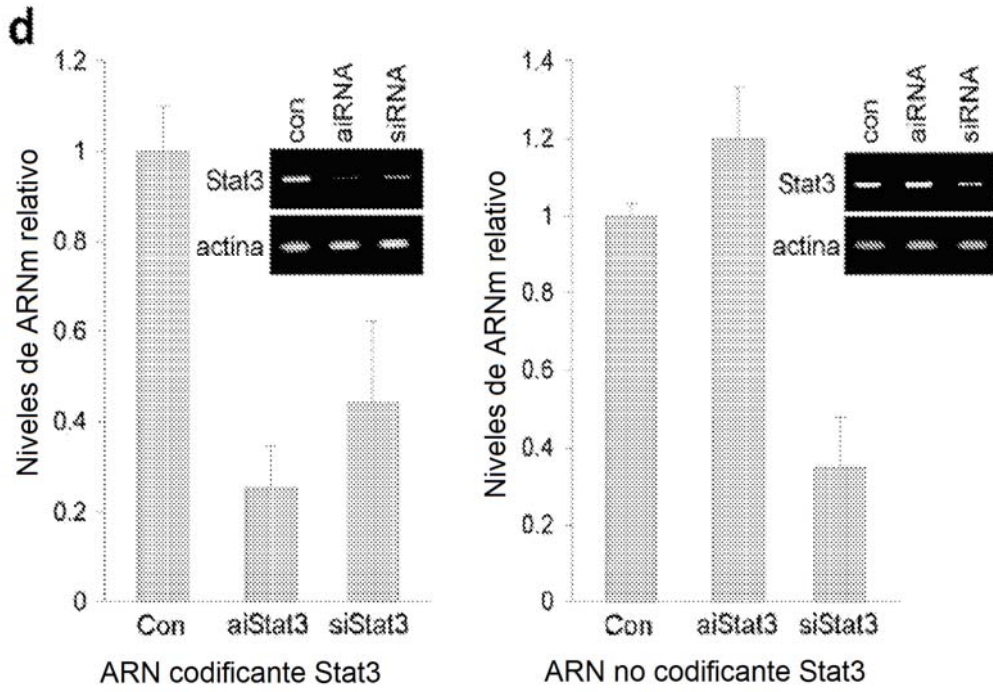


Figura 15d-15e

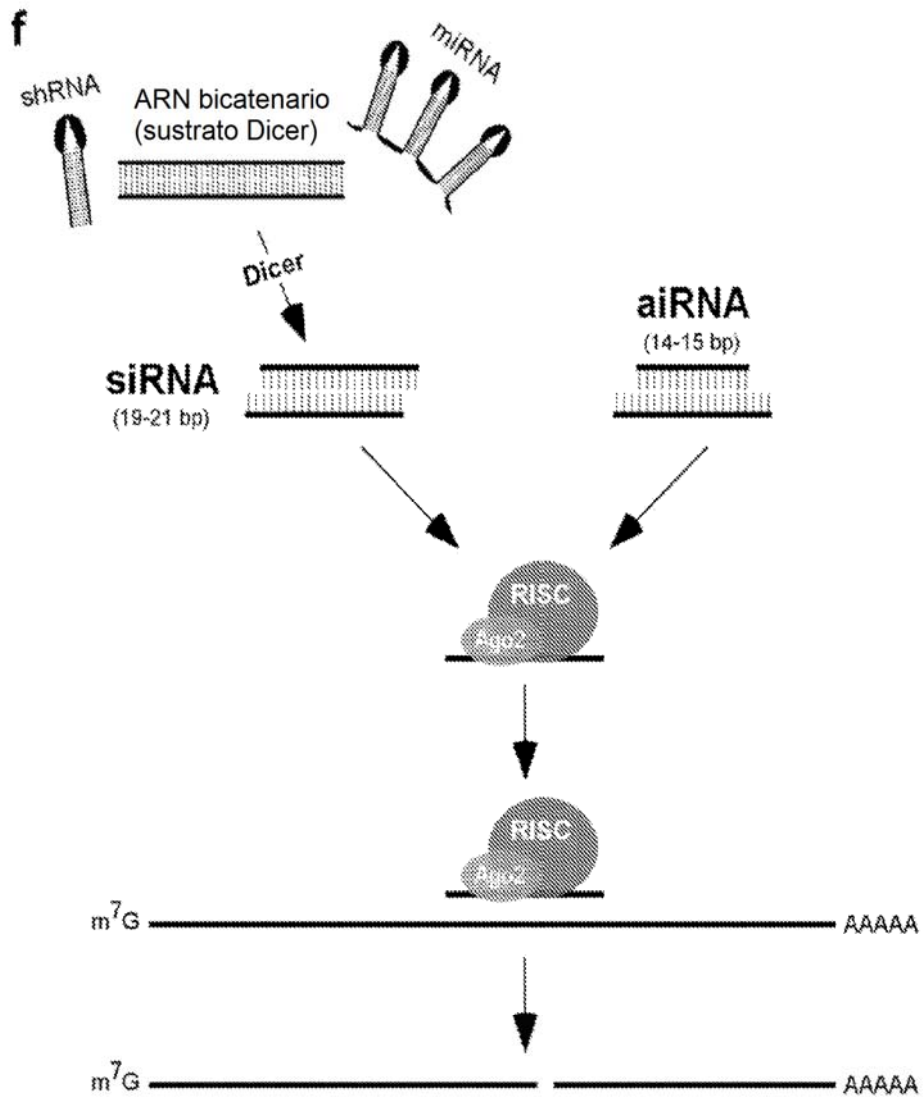


Figura 15f

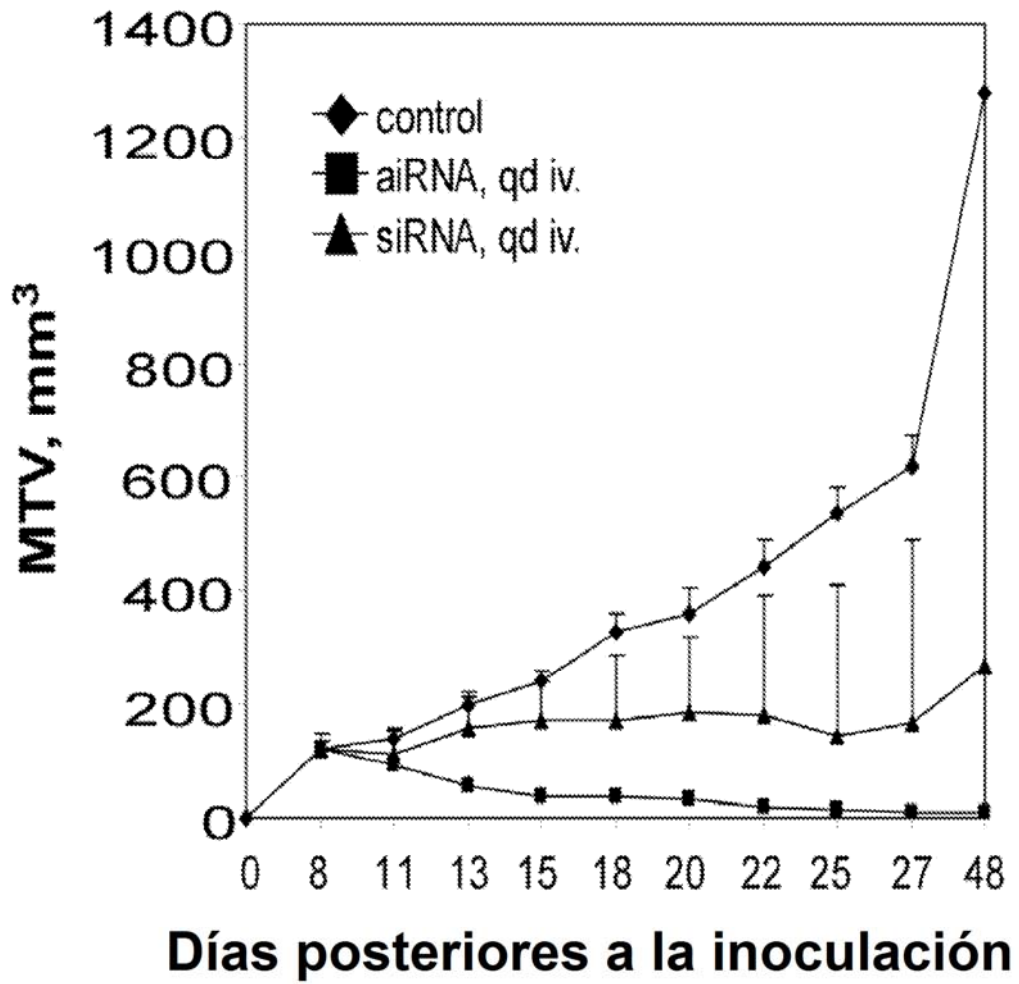


Figura 16

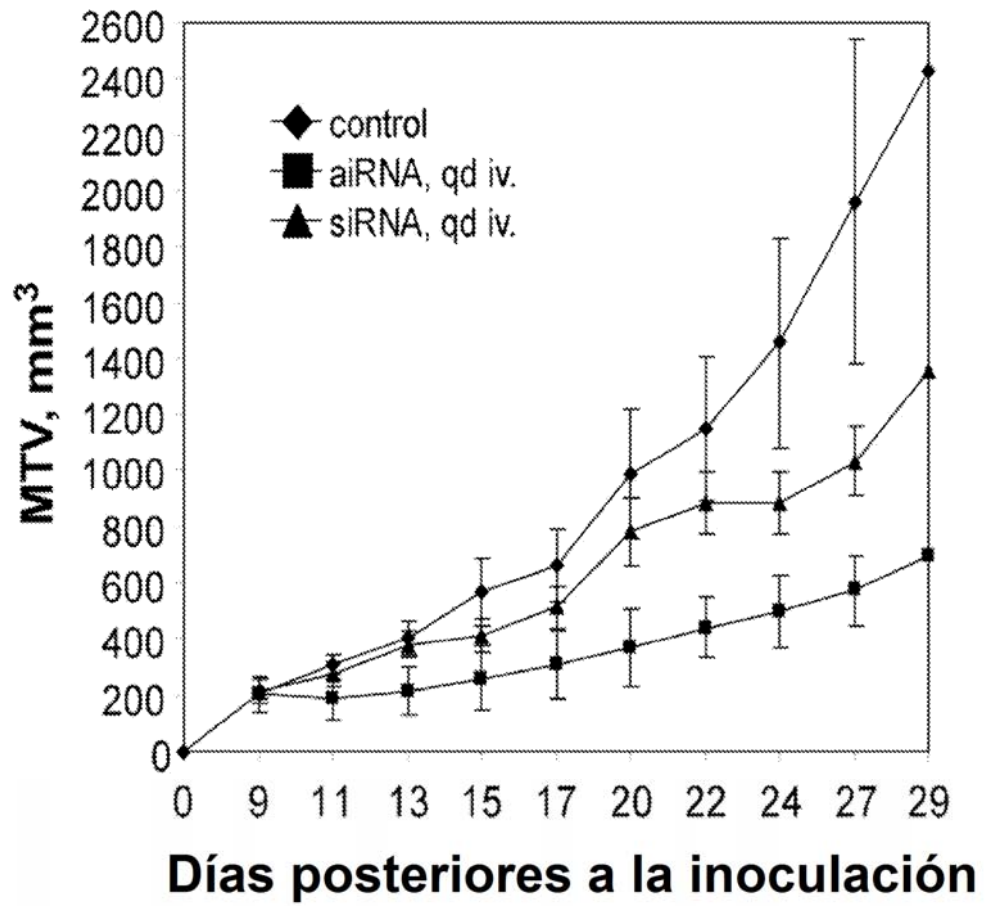


Figura 17