

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 091**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.01.2011 PCT/US2011/020298**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2011 WO11085056**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2011 E 11701706 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2521783**

54 Título: **Compuestos de oligonucleótidos que comprenden excedentes no nucleótidos**

30 Prioridad:

16.09.2010 WO PCT/US2010/049047
07.01.2010 US 292878 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2017

73 Titular/es:

QUARK PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
6501 Dumbarton Circle
Fremont, California 94555, US

72 Inventor/es:

AVKIN-NACHUM, SHARON y
FEINSTEIN, ELENA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 640 091 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

Compuestos de oligonucleótidos que comprenden excedentes no nucleótidos

Excedentes no nucleótidos

5 A lo largo de esta solicitud se citan diversas publicaciones científicas y de patentes. Las divulgaciones para estas publicaciones en su totalidad se citan a continuación para describir más completamente el estado de la técnica al que pertenece esta invención.

Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud de Patente Provisional US No. 61/292878 presentada el 7 de enero de 2010 y de la Solicitud de Patente PCT No. PCT/US2010/049047 presentada el 16 de septiembre de 2010.

10 Campo de la invención

15 Se divulgan aquí moléculas modificadas de ácido nucleico de doble cadena, composiciones farmacéuticas que las comprenden y métodos de uso de las mismas para la inhibición de genes diana de mamíferos y no mamíferos. Los compuestos y composiciones son por lo tanto útiles en el tratamiento de sujetos que sufren de enfermedades o condiciones y/o síntomas asociados con tales enfermedades o condiciones en las que la expresión génica tiene consecuencias adversas. En realizaciones particulares, la invención proporciona composiciones que las comprenden y métodos de uso de las mismas.

Antecedentes de la invención

20 La interferencia de ARN (ARNi) en mamíferos está mediada por ARNs de interferencia pequeña (ARNip) (Fire et al, Nature 1998, 391: 806) o microARNs (miARNs) (Ambros, Nature 2004, 431 (7006) 350-355; Bartel, Cell 2004, 116 (2): 281-97). El proceso correspondiente en las plantas se denomina comúnmente como silenciamiento génico post-transcripcional específico (PTGS) o silenciamiento de ARN y también se denomina como sofocamiento en hongos.

Un ARNip es un ARN de doble cadena o una molécula de ARN modificada que subregula o silencia (previene) la expresión de un gen/ARNm de su contraparte (celular) endógena. El mecanismo de interferencia de ARN se detalla infra.

25 La Publicación PCT No. WO 2008/050329 y el No. de Serie US 11/978,089 al cesionario de la presente invención se refieren a inhibidores de genes proapoptóticos. Las Publicaciones de Patente PCT Nos. WO 2008/104978 y WO 2009/044392 al cesionario de la presente invención se refieren a estructuras de ARNip modificadas químicamente.

CzaudeARN et al. (Nucleic Acids Research 2003, 31 (11): 2705-2716) divulgan desoxi abásicas invertidas y modificaciones de amino en el terminal 5' o 3' de las moléculas de siARN.

30 Chiu y col. (Molecular Cell 2002, 10: 549-561) divulgan moléculas de ARNip que contienen un extremo 3' bloqueado con 3' puromicina o biotina, en las cadenas en sentido o antisentido.

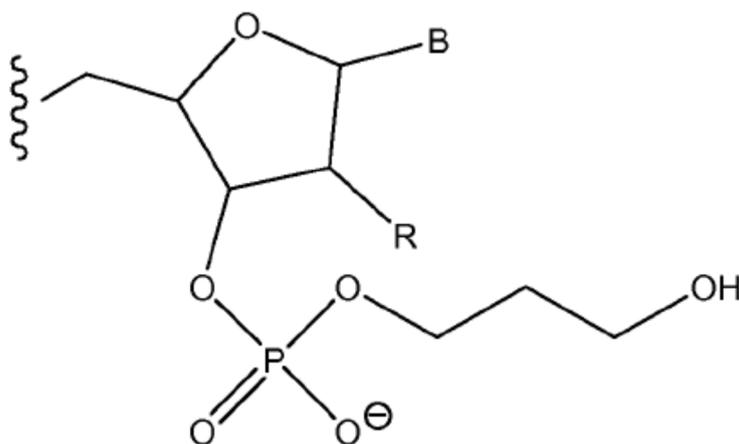
Resumen de la invención

35 La invención proporciona compuestos de ARNip modificados químicamente y/o estructuralmente para la inhibición de la expresión génica en general y de genes de mamíferos y procariontes, en particular. Se proporcionan aquí nuevos motivos estructurales útiles en la preparación de oligonucleótidos ARNip que comprenden una o más unidades estructurales no nucleótidos como un excedente 3' (o 2') en el terminal 3', composiciones que lo comprenden y métodos de uso de los mismos.

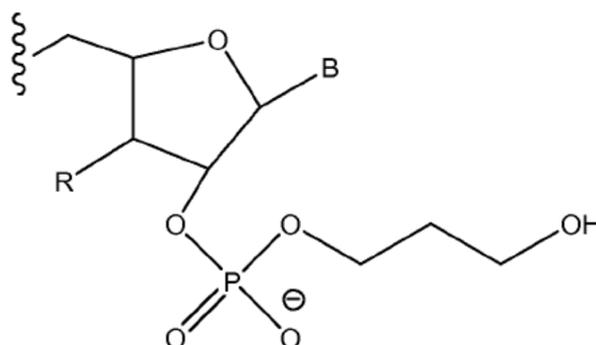
40 Más específicamente, la invención se dirige a una molécula de ácido nucleico de doble cadena que comprende una cadena en sentido y una cadena antisentido, en donde la cadena antisentido comprende una unidad estructural no nucleótido seleccionado del grupo que consiste en unidades estructurales de C3Pi-C3OH (propil fosfopropanol), C3Pi-C3Pi (Fosfato de propil fosfopropilo), C3Pi - C3Ps (propil fosfo - propil fosforotioato) C3Pi-rAb (unidad estructural de propil fosfato-riboabásico) y C3Pi-dAb (unidad estructural de propil fosfato - desoxirriboabásico) unidos covalentemente a través de un enlace de base de fosfato a una posición 3' o una posición 2' del residuo de azúcar en el nucleótido en terminal 3'.

45 El solicitante ha determinado que la adición de uno y preferiblemente dos o tres unidades estructurales no nucleótidos al terminal 3' de un ARNip proporciona propiedades ventajosas al ARNip en términos de actividad y/o estabilidad y/o suministro. En consecuencia, un ARNip existente puede ser ventajosamente modificado y futuro ARNip puede ser diseñado y producido para tomar ventaja de este hallazgo. Sin desear limitarse a la teoría, las moléculas de ácido nucleico divulgadas aquí y que tienen un excedente no nucleótido en 3' (Z o Z' es decir C3Pi-C3Ps; C3Pi-C3OH; C3Pi-

5 C3Pi; C3Pi-rAb; C3Pi-dAb) son reconocidos por el dominio PAZ de Argonaute y son capaces de realizar ARNi, mientras que exhibe buena estabilidad y actividad. Se apreciará que aunque el término terminal 3' se usa en toda esta solicitud para referirse al extremo de la cadena de ARNi a la que están unidas las unidades estructurales no nucleótidos, a menos que se indique explícitamente lo contrario las unidades estructurales no nucleótidos o "excedentes" pueden estar unidos en la posición 3 de la unidad estructural (desoxi)ribosa en el terminal 3' de la cadena oligo nucleótido o en la posición 2' de la unidad estructural (desoxi)ribosa en el terminal 3' de la cadena oligonucleótido, por ejemplo



10 (unión en la posición 3' de la unidad estructural del terminal 3' (desoxi)ribosa, en el dibujo, B es una base de nucleótidos y R es H u OH) o



(unión en la posición 2' de la unidad estructural del terminal 3' (desoxi)ribosa).

15 Se proporcionan aquí novedosas estructuras de moléculas de ácido nucleico de doble cadena, que tienen propiedades ventajosas y que pueden aplicarse al ARNi a cualquier secuencia diana, que comprende excedentes no nucleótidos en uno o ambos terminales 3' del dúplex. Las modificaciones químicamente modificadas de los ARNi divulgadas aquí son útiles en la preparación de compuestos de ARNi estables y activos útiles en la interferencia de ARN (ARNi).

20 La solicitud también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de tales oligonucleótidos y estos oligonucleótidos para uso en métodos para tratar o prevenir la incidencia o gravedad de una enfermedad o condición en un sujeto que lo necesite, en donde la enfermedad o condición y/o síntomas asociados con la misma está asociado con la expresión del gen diana. En algunas realizaciones, la enfermedad o condición se selecciona del grupo que consiste en pérdida auditiva, fallo renal agudo (ARF), glaucoma, síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) y otras lesiones pulmonares y respiratorias agudas, lesión por isquemia-reperfusión después del trasplante pulmonar, condiciones isquémicas oculares, trasplante de órganos incluyendo trasplante de pulmón, hígado, corazón, páncreas y riñón, incluyendo la función retardada del injerto (DGF), nefro- y neurotoxicidad, lesión de la médula espinal, úlceras de presión, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), síndrome del ojo seco, mucositis oral, neuropatía ocular isquémica (ION) y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD). Tales métodos

25 implican administrar a un mamífero en necesidad de tal tratamiento una cantidad profiláctica o terapéuticamente

efectiva de uno o más de tales compuestos, que inhiben o reducen la expresión o actividad de al menos uno de tales genes. Tales compuestos se pueden administrar concurrentemente o en lugar de otros tratamientos.

5 El oligonucleótido se selecciona para direccionar cualquier gen mamífero o no mamífero. En diversas realizaciones, el compuesto modificado comprende una secuencia oligonucleótido expuesta en cualquiera de las SEQ ID NOS: 97-68654 (divulgada en US Ser. No. 11/978,089 y solicitud de patente PCT No. PCT/IL 2007/001278).

10 La solicitud proporciona un compuesto ARNip de cadena doble sintético que comprende una cadena en sentido y una cadena antisentido, en donde la cadena antisentido comprende 2 unidades estructurales no nucleótidos, unidas covalentemente en el extremo del terminal 3', en donde la unidad estructural no nucleótido se selecciona del grupo que consiste en propanol, una unidad estructural C3 alquilo enlazada a un fosfodiéster, una unidad estructural C3 alquilo enlazada a un fosforotioato, una unidad estructural desoxirriboabásico, una unidad estructural ribobásica y una combinación de las mismas, más específicamente de C3Pi-C3OH, C3Pi-C3Pi, C3Pi-C3Ps, C3Pi-rAb y C3Pi-dAb.

15 La unidad estructural no nucleótido se une al residuo de azúcar mediante un enlace de base de fosfato, preferiblemente un enlace fosfodiéster o fosforotioato. La unidad estructural no nucleótido incluye una unidad estructural C3 alquilo enlazada covalentemente en una posición 3' o 2' del residuo de azúcar en el terminal 3' de la cadena antisentido, que es C3Pi.

En algunas realizaciones la molécula incluye dos o tres unidades estructurales C3 alquilo enlazadas covalentemente por un enlace fosfodiéster o fosforotioato o una unidad estructural C3 alquilo enlazada covalentemente por un enlace fosfodiéster o fosforotioato a una unidad estructural abásica. En realizaciones preferidas, la molécula incluye dos unidades estructurales C3 alquilo unidas covalentemente por un enlace fosfodiéster o fosforotioato.

20 En otras realizaciones, la molécula incluye una unidad estructural C3 alquilo enlazada covalentemente por un enlace fosfodiéster o fosforotioato a una unidad estructural abásica en donde la unidad estructural abásica se selecciona de una unidad estructural desoxirriboabásica o una unidad estructural ribobásica. La unidad estructural C3 alquilo enlazada covalentemente por un enlace fosfodiéster o fosforotioato a una unidad estructural abásica se selecciona de C3Pi-rAb y C3Pi-dAb.

25 En algunas realizaciones, se proporcionan moléculas de ácido nucleico de doble cadena que tienen la estructura (A1):

(A1) 5' (N)_x - Z 3' (cadena antisentido)

3' Z'-(N')_y -z" 5' (cadena en sentido)

en donde cada uno de N y N' es un nucleótido que puede estar no modificado o modificado, o una unidad estructural no convencional;

30 en donde cada uno de (N)_x y (N')_y es un oligonucleótido en el que cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' mediante un enlace covalente;

en donde Z está presente y consiste en una unidad estructural no nucleótido seleccionado del grupo que consiste en C3Pi-C3OH, C3Pi-C3Pi, C3Pi-C3Ps, C3Pi-rAb y C3Pi-dAb, enlazada covalentemente a través de un fosfodiéster o un enlace fosforotioato a una posición 3' o 2' del residuo de azúcar en el nucleótido en terminal de la cadena antisentido

35 en donde Z' está presente o ausente, pero si está presente comprende una unidad estructural no nucleótido unida covalentemente en el terminal 3' de la cadena en sentido;

en donde z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es una unidad estructural de cubrimiento unida covalentemente en el terminal 5' de (N')_y;

en donde cada uno de x y y es independientemente un entero entre 18 y 40;

40 en donde la secuencia de (N')_y tiene complementariedad con la secuencia de (N)_x; y

en donde la secuencia de (N)_x tiene complementariedad con una secuencia consecutiva en un ARN diana.

En algunas realizaciones, el enlace covalente que une cada N o N' consecutivos es un enlace fosfodiéster.

En algunas realizaciones, x=y=19 a 27, por ejemplo, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27. En algunas realizaciones, x= y y cada uno de x y y es 19, 20, 21, 22, 23. En diversas realizaciones x=y=19.

45 En algunas realizaciones x=y =19 y Z' está presente y consiste en dos unidades estructurales no nucleótidos.

En realizaciones preferidas x=y=19 y Z está presente y consiste en dos unidades estructurales no nucleótidos.

En las realizaciones preferidas $x=y=19$ y Z está presente y consiste en dos unidades estructurales no nucleótidos; y Z' está presente y consiste en una unidad estructural no nucleótido.

En realizaciones adicionales $x=y=19$ y Z y Z' están presentes y cada uno comprende independientemente dos unidades estructurales no nucleótidos.

- 5 En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico de doble cadena comprenden una unidad estructural de ADN o un desajuste con el objetivo en la posición 1 de la cadena antisentido (terminal 5'). Tal estructura se describe aquí. De acuerdo con una realización proporcionada son moléculas de ácido nucleico de doble cadena que tienen una estructura (A2) expuesta a continuación:

(A2) 5' N1-(N)x - Z 3' (cadena antisentido)

- 10 3' Z'-N2-(N')y -z" 5' (cadena en sentido)

en donde cada uno de N2, N y N' es un ribonucleótido no modificado o modificado, o una unidad estructural no convencional;

en donde cada uno de (N)x y (N')y es un oligonucleótido en el que cada N o N' consecutivo se une al N o N' adyacente mediante un enlace covalente;

- 15 en donde cada uno de x y y es independientemente un entero entre 17 y 39;

en donde la secuencia de (N')y tiene complementariedad con la secuencia de (N)x y (N)x tiene complementariedad con una secuencia consecutiva en un ARN diana;

en donde N1 está unido covalentemente a (N)x y no es coincidente con el ARN diana o es una unidad estructural de ADN complementario con el ARN diana;

- 20 en donde N1 es una unidad estructural seleccionado del grupo que consiste en uridina natural o modificada, desoxirriburoidina, ribotimidina, desoxirribotimidina, adenosina o desoxiadenosina;

en donde z" puede estar presente o estar ausente, pero si está presente es una unidad estructural de cubrimiento unida covalentemente en el terminal 5' de N2- (N')y, y

- 25 en donde Z está presente y consiste en una unidad estructural no nucleótido seleccionado del grupo que consiste en C3Pi-C3OH, C3Pi-C3Pi, C3Pi-C3Ps, C3Pi-rAb y C3Pi-dAb, unidos covalentemente a través de un fosfodiéster o un enlace fosforotioato en una posición 3' o una posición 2' del residuo de azúcar en el nucleótido en terminal de la cadena antisentido; y

en donde Z' está presente o ausente, pero si está presente comprende una unidad estructural no nucleótido unido covalentemente en el terminal 3' de la cadena en sentido.

- 30 En algunas realizaciones $x=y=18$ y Z' está presente y consiste en dos unidades estructurales no nucleótidos.

En realizaciones preferidas $x=y=18$ y Z está presente y consiste en dos unidades estructurales no nucleótidos.

En realizaciones preferidas $x=y=18$ y Z está presente y consiste en dos unidades estructurales no nucleótidos; y Z' está presente y consiste en una unidad estructural no nucleótido.

- 35 En realizaciones adicionales $x=y=18$ y Z y Z' están presentes y cada uno comprende independientemente dos unidades estructurales no nucleótidos.

En algunas realizaciones la secuencia de (N')y es totalmente complementaria a la secuencia de (N)x. En diversas realizaciones, la secuencia de N2-(N')y es complementaria a la secuencia de N1-(N)x. En algunas realizaciones (N)x comprende un antisentido que es totalmente complementario a aproximadamente 17 a aproximadamente 39 nucleótidos consecutivos en un ARN diana. En otras realizaciones (N)x comprende un antisentido que es sustancialmente complementario a aproximadamente 17 a aproximadamente 39 nucleótidos consecutivos en un ARN diana.

- 40 En algunas realizaciones N1 y N2 forman un par de bases de Watson-Crick. En algunas realizaciones N1 y N2 forman un par de bases no-Watson-Crick. En algunas realizaciones, se forma un par de bases entre un ribonucleótido y un desoxirribonucleótido.

En algunas realizaciones N1 y N2 forman un par de bases de Watson-Crick. En algunas realizaciones N1 y N2 forman un par de bases no-Watson-Crick. En algunas realizaciones, se forma un par de bases entre un ribonucleótido y un desoxirribonucleótido.

- 45 En algunas realizaciones $x=y=18$, $x=y=19$ o $x=y=20$. En realizaciones preferidas $x=y=18$. Cuando $x=18$ en N1-(N)x, N1 se refiere a la posición 1 y las posiciones 2-19 se incluyen en (N)18 Cuando $y=18$ en N2-(N')y N2. se refiere a la posición 19 y las posiciones 1-18 se incluyen en (N')18

En algunas realizaciones N1 está unido covalentemente a (N)x y no coincide con el ARN diana. En diversas realizaciones N1 está unido covalentemente a (N)x y es una unidad estructural de ADN complementario al ARN diana.

En algunas realizaciones N1 y N2 forman un par de bases entre uridina o desoxiuridina y adenosina o desoxiadenosina (rU-rA, rU-dA, dU-rA, dU-dA). En otras realizaciones, N1 y N2 forman un par de bases entre desoxiuridina y adenosina.

- 5 En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico de doble cadena es un siARN, siNA o un miARN. Las moléculas de ácido nucleico de doble cadena, tal como se proporcionan aquí, se denominan también "dúplex".

- 10 En ciertas realizaciones preferidas $x=y=18$. En algunas realizaciones N1 y N2 forman un par de bases de Watson-Crick. En otras realizaciones, N1 y N2 forman un par de bases no-Watson-Crick. En ciertas realizaciones, N1 se selecciona del grupo que consiste en riboadenosina, riboadenosina modificada, desoxirriboadenosina, desoxirriboadenosina modificada. En otras realizaciones, N1 se selecciona del grupo que consiste en ribouridina, desoxirriboouridina, ribouridina modificada y desoxirriboouridina modificada.

- 15 En algunas realizaciones cada uno de N y N' es un nucleótido no modificado. En algunas realizaciones, al menos uno de N o N' incluye un nucleótido químicamente modificado o una unidad estructural no convencional. En algunas realizaciones, la unidad estructural no convencional se selecciona de un nucleótido espejo, una unidad estructural ribosa abásico y una unidad estructural desoxirribosa abásico. En algunas realizaciones, la unidad estructural no convencional es un nucleótido espejo, preferiblemente una unidad estructural de L-ADN. En algunas realizaciones, al menos uno de N o N' incluye un ribonucleótido modificado con azúcar 2'OMe.

En algunas realizaciones la secuencia de (N')y es totalmente complementaria a la secuencia de (N)x. En otras realizaciones la secuencia de (N')y es sustancialmente complementaria a la secuencia de (N)x.

- 20 En algunas realizaciones (N)x incluye una secuencia antisentido que es totalmente complementaria a aproximadamente 17 a aproximadamente 39 nucleótidos consecutivos en un ARN diana. En otras realizaciones (N)x incluye un antisentido que es sustancialmente complementario a aproximadamente 17 a aproximadamente 39 nucleótidos consecutivos en un ARN diana.

- 25 En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico divulgadas en la presente invención son siARN, siNA o miARN.

- 30 En algunas realizaciones de las Estructuras A1 y A2, Z está presente y Z' está ausente. En realizaciones adicionales, tanto Z como Z' están presentes. En algunas realizaciones Z y Z' están presentes y son idénticos. En realizaciones adicionales Z y Z' están presentes y son diferentes. En algunas realizaciones Z' representa 2, 3, 4 o 5 unidades estructurales no nucleótidos o una combinación de 2, 3, 4, o 5 unidades estructurales nucleótidos y no nucleótidos. En algunas realizaciones, cada uno de Z y o Z' consiste de dos (2) unidades estructurales no nucleótidos unidos covalentemente al terminal 3' de la cadena de ARNip a través de un enlace fosfodiéster.

- 35 Una unidad estructural no nucleótido se selecciona del grupo que consiste en una unidad estructural abásica, una unidad estructural abásica invertida, una unidad estructural alquilo o un derivado del mismo, y un fosfato inorgánico. En algunas realizaciones, una unidad estructural no nucleótido es una unidad estructural alquilo o derivado del mismo. En algunas realizaciones, la unidad estructural alquilo comprende un grupo funcional terminal seleccionado del grupo que consiste en un alcohol, una amina terminal, un fosfato terminal y una unidad estructural fosforotioato terminal.

- 40 En realizaciones adicionales, Z' está presente y comprende una o más unidades estructurales no nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en una unidad estructural abásica, una unidad estructural abásica invertida, una unidad estructural de hidrocarburo y un fosfato inorgánico. En algunas realizaciones Z' está presente y comprende una o más unidades estructurales alquilo o derivados de los mismos.

En algunas realizaciones, Z está presente y consiste en dos unidades estructurales alquilo o derivados de los mismos y Z' está presente y consiste en una sola unidad estructural alquilo o derivado del mismo.

- 45 En algunas realizaciones, cada uno de Z y Z' incluye una unidad estructural abásica, por ejemplo una unidad estructural desoxirriboabásico (denominado aquí "dAb") o unidad estructural ribobásico (denominado aquí "rAb"). En algunas realizaciones Z' comprende dos unidades estructurales abásicas unidas covalentemente y es por ejemplo 5'>3' dAb-dAb o rAb-rAb o dAb-rAb o rAb-dAb. Cada unidad estructural se conjuga covalentemente con una unidad estructural adyacente a través de un enlace covalente, preferiblemente un enlace basado en el fosfato. En algunas realizaciones, el enlace a base de fosfato es un fosforotioato, un fosfonoacetato o un enlace fosfodiéster.

- 50 En algunas realizaciones, Z' incluye una unidad estructural C2, C3, C4, C5 o C6, alquilo opcionalmente una unidad estructural C3[propano, -(CH₂)₃] o un derivado de los mismos, por ejemplo propanol (C3-OH), propanodiol, o derivado fosfodiéster de propanodiol ("C3P"). En realizaciones preferidas, Z' incluye dos unidades estructurales de hidrocarburo y en algunos ejemplos es C3-C3. Cada C3 se conjuga covalentemente con un C3 adyacente a través de un enlace

covalente, preferiblemente un enlace a base de fosfato. En algunas realizaciones, el enlace a base de fosfato es un fosforotioato, un fosfonoacetato o un enlace fosfodiéster.

En algunas realizaciones, cada uno de Z y Z' incluye independientemente una unidad estructural C3 alquilo, C3 alcohol o C3 éster.

- 5 En algunas realizaciones de las Estructuras A1 y A2, cada uno de N y N' es un nucleótido no modificado. En algunas realizaciones, al menos uno de N o N' incluye un nucleótido químicamente modificado o una unidad estructural no convencional. En algunas realizaciones, la unidad estructural no convencional se selecciona de un nucleótido espejo, una unidad estructural ribosa abásico y una unidad estructural desoxirribosa abásico. En algunas realizaciones, la unidad estructural no convencional es un nucleótido espejo, preferiblemente una unidad estructural de L-ADN.
- 10 En algunas realizaciones, al menos uno de N o N' incluye un ribonucleótido modificado con azúcar 2'OMe.

En algunas realizaciones la secuencia de (N')y es totalmente complementaria a la secuencia de (N)x. En otras realizaciones la secuencia de (N')y es sustancialmente complementaria a la secuencia de (N)x.

- 15 En otras realizaciones, el compuesto de Estructura A1 o Estructura A2 incluye al menos un ribonucleótido modificado en el residuo de azúcar. En algunas realizaciones, el compuesto incluye una modificación en la posición 2' del residuo de azúcar. En algunas realizaciones la modificación en la posición 2' incluye la presencia de una unidad estructural amino, un flúor, un alcoxi o un alquilo. En ciertas realizaciones la modificación 2' incluye una unidad estructural alcoxi, En realizaciones preferidas la unidad estructural alcoxi es una unidad estructural metoxi (también conocida como 2'-O-metilo, 2'OMe, 2'-OCH₃). En algunas realizaciones, el compuesto de ácido nucleico incluye ribonucleótidos alternantes modificados con azúcar 2'OMe en uno o ambas de las cadenas antisentido y en sentido. En otras
- 20 realizaciones, el compuesto incluye ribonucleótidos modificados con azúcar 2'OMe en la cadena antisentido, (N)x o N1-(N)x solamente. En ciertas realizaciones, el ribonucleótido medio de la cadena antisentido; por ejemplo ribonucleótido en posición 10 en una cadena de 19-mer no se ha modificado. En diversas realizaciones, el compuesto de ácido nucleico incluye al menos 5 ribonucleótidos modificados y no modificados en azúcar 2'OMe alternantes. En realizaciones adicionales el compuesto de Estructura A1 o Estructura A2 incluye ribonucleótidos modificados en
- 25 posiciones alternantes en donde cada ribonucleótido en los terminales 5' y 3' de (N)x o N1-(N)x se modifican en sus residuos de azúcar y cada ribonucleótido en los terminales 5' y 3' de (N')y o N2-(N)y no están modificados en sus residuos de azúcar.

En algunas realizaciones, la molécula de doble cadena incluye una o más de las siguientes modificaciones

- 30 a) N en al menos una de las posiciones 5, 6, 7, 8 o 9 desde el terminal 5' de la cadena antisentido se selecciona de un nucleótido 2'5' o un nucleótido espejo;
- b) N' en al menos una de las posiciones 9 o 10 desde el terminal 5' de la cadena en sentido se selecciona de un nucleótido 2'5' y una pseudoUridina; y
- c) N' en 4, 5 o 6 posiciones consecutivas en las posiciones terminales 3' de (N')y comprende un nucleótido 2'5'.

En algunas realizaciones, la molécula de doble cadena incluye una combinación de las siguientes modificaciones

- 35 a) la cadena antisentido incluye un nucleótido 2'5' o un nucleótido espejo en al menos una de las posiciones 5, 6, 7, 8 o 9 desde el terminal 5'; y
- b) la cadena en sentido incluye al menos uno de un nucleótido 2'5' y una pseudoUridina en las posiciones 9 o 10 desde el terminal 5'.

En algunas realizaciones, la molécula de doble cadena incluye una combinación de las siguientes modificaciones

- 40 a) la cadena antisentido incluye un nucleótido 2'5' o un nucleótido espejo en al menos una de las posiciones 5, 6, 7, 8 o 9 desde el terminal 5'; y
- c) la cadena en sentido incluye 4, 5 o 6 nucleótidos 2'5' consecutivos en las posiciones 3' penúltima o 3' terminal.

- 45 En algunas realizaciones, la cadena en sentido [(N)x o N1-(N)x incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 ribonucleótidos modificados con azúcar 2'OMe. En algunas realizaciones, la cadena antisentido incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19. En otras realizaciones, la cadena antisentido incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19. En otras realizaciones, la cadena antisentido incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19. En algunas realizaciones, la cadena antisentido incluye una o más pirimidinas modificadas con azúcar 2'OMe. En algunas realizaciones, todos los nucleótidos de pirimidina en la cadena antisentido son modificados con azúcar 2'OMe. En
- 50 algunas realizaciones, la cadena en sentido incluye pirimidinas modificadas con azúcar 2'OMe.

En algunas realizaciones de Estructura A1 y Estructura A2, la cadena en sentido y la cadena antisentido son independientemente fosforiladas o no fosforiladas en el terminal 3' y en el terminal 5'. En algunas realizaciones de Estructura A1 y Estructura A2, la cadena en sentido y la cadena antisentido no están fosforiladas en los terminales 3' y 5'. En otras realizaciones, la cadena en sentido y la cadena antisentido se fosforilan en los terminales 3'.

- 5 En algunas realizaciones de la Estructura A1 y la Estructura A2 (N')y incluye al menos una unidad estructural no convencional seleccionada de un nucleótido espejo, un nucleótido 2'5' y un TNA. En algunas realizaciones, la unidad estructural no convencional es un nucleótido espejo. En diversas realizaciones, el nucleótido espejo se selecciona de un L-ribonucleótido (L-ARN) y un L-desoxirribonucleótido (L-ADN). En realizaciones preferidas, el nucleótido espejo es L-ADN. En ciertas realizaciones, la cadena en sentido comprende una unidad estructural no convencional en la posición 9 o 10 (desde el terminal 5'). En realizaciones preferidas, la cadena en sentido incluye una unidad estructural no convencional en la posición 9 (desde el terminal 5'). En algunas realizaciones, la cadena en sentido tiene 19 nucleótidos de longitud y comprende 4, 5 o 6 unidades estructurales no convencionales consecutivas en las posiciones 15, (desde el terminal 5'). En algunas realizaciones, la cadena en sentido incluye 4 ribonucleótidos 2'5' consecutivos en las posiciones 15, 16, 17 y 18. En algunas realizaciones, la cadena en sentido incluye 5 ribonucleótidos consecutivos 2'5' en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19. En diversas realizaciones, la cadena en sentido comprende además Z'. En algunas realizaciones Z' incluye una unidad estructural C3OH o una unidad estructural C3Pi.

- 20 En algunas realizaciones de la Estructura A1 (N')y incluye al menos una unidad estructural de L-ADN. En algunas realizaciones $x=y=19$ y (N')y, consiste en ribonucleótidos no modificados en las posiciones 1-17 y 19 y un L-ADN en la penúltima posición 3' (posición 18). En otras realizaciones $x=y=19$ y (N')y consiste en ribonucleótidos no modificados en las posiciones 1-16 y 19 y dos L-ADN consecutivos en la penúltima posición 3' (posiciones 17 y 18). En diversas realizaciones, la unidad estructural no convencional es un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace de fosfato internucleótido 2'-5'. De acuerdo con diversas realizaciones (N')y incluye 2, 3, 4, 5 o 6 ribonucleótidos consecutivos en el terminal 3' unido por enlaces internucleótidos 2'-5'. En una realización, cuatro nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')y están unidos por tres enlaces fosfodiéster 2'-5', en donde uno o más de los nucleótidos 2'-5' que forman los enlaces fosfodiéster 2'-5' incluyen además una modificación de azúcar 3'-O-metil (3'OMe). Preferiblemente, el nucleótido terminal 3' de (N')y incluye una modificación de azúcar 2'OMe. En ciertas realizaciones $x=y=19$ y (N')y incluye dos o más nucleótidos consecutivos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19 incluyen un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace internucleótido 2'-5' (2'-5' nucleótido). En diversas realizaciones, el nucleótido que forma el enlace internucleótido 2'-5' incluye un nucleótido 3' desoxirribosa o un nucleótido 3' metoxi (3'H o 3'OMe en lugar de un 3'OH). En algunas realizaciones $x=y=19$ y (N')y incluyen nucleótidos 2'-5' en las posiciones 15, 16 y 17 de tal manera que los nucleótidos adyacentes están unidos por un enlace internucleótido 2'-5' entre las posiciones 15-16, 16-17 y 17-18; o en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19 de tal manera que los nucleótidos adyacentes estén unidos por un enlace internucleótido 2'-5' entre las posiciones 15-16, 16-17, 17-18 y 18-19 y un 3'OH está disponible en el nucleótido terminal 3' o en las posiciones 16, 17 y 18 de tal manera que los nucleótidos adyacentes están unidos por un enlace internucleótido 2'-5' entre las posiciones 16-17, 17-18 y 18-19. En algunas realizaciones $x=y=19$ y (N')y incluyen nucleótidos 2'-5' en las posiciones 16 y 17 o en las posiciones 17 y 18 o en las posiciones 15 y 17 de tal manera que los nucleótidos adyacentes están unidos por un enlace 2'-5' internucleótido entre las posiciones 16-17 y 17-18 o entre las posiciones 17-18 y 18-19 o entre las posiciones 15-16 y 17-18, respectivamente. En otras realizaciones, los ribonucleótidos de pirimidina (rU, rC) en (N')y están sustituidos con nucleótidos unidos al nucleótido adyacente por un enlace internucleótido 2'-5'. En algunas realizaciones $x=y=19$ y (N')y comprende cinco nucleótidos consecutivos en el terminal 3' unidos por cuatro enlaces 2'-5', específicamente los enlaces entre la posición de los nucleótidos 15-16, 16-17, 17-18 y 18-19.

- 45 En algunas realizaciones $x=y=19$ y (N')y comprenden cinco nucleótidos consecutivos en el terminal 3' unidos por cuatro enlaces 2'-5' y opcionalmente incluye además Z' y z' seleccionados independientemente de una unidad estructural abásica invertida y una tapa C3 alquilo [C3; 1,3-propanodiol mono (dihidrogenofosfato)]. La tapa de C3 alquilo está unida covalentemente al nucleótido terminal 3' o 5'. En algunas realizaciones, la tapa terminal 3' C3 comprende además un fosfato 3'. En algunas realizaciones la tapa terminal 3' C3 comprende además un grupo hidroxilo de terminal 3'.

- 50 En algunas realizaciones $x=y=19$ y (N')y comprenden una posición de L-ADN 18; y (N')y opcionalmente incluye además Z' y z' seleccionados independientemente de una unidad estructural abásica invertida y una tapa C3 alquilo [C3; 1,3-propanodiol mono(dihidrogenofosfato)].

En algunas realizaciones (N')y comprende un fosfato 3' terminal (es decir, fosforilado en el terminal 3'). En algunas realizaciones (N')y comprende un hidroxilo de terminal 3'.

- 55 En algunas realizaciones $x=y=19$ y (N)x incluyen ribonucleótidos modificados con azúcar 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 o en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17, 19. En algunas realizaciones $x=y=19$ y (N)x incluye pirimidinas modificadas con azúcar 2'OMe. En algunas realizaciones, todas las pirimidinas en (N)x incluyen la modificación de azúcar 2'OMe.

En algunas realizaciones de la Estructura A2 $x=y=18$ y N2 es una unidad estructural riboadenosina. En algunas realizaciones $x=y=18$, y N2-(N')y comprenden cinco nucleótidos consecutivos en el terminal 3' unidos por cuatro enlaces 2'-5', específicamente los enlaces entre la posición de los nucleótidos 15-16, 16-17, 17-18 y 18-19. En algunas realizaciones, los enlaces incluyen enlaces fosfodiéster. En algunas realizaciones $x=y=18$ y N2-(N')y comprenden cinco nucleótidos consecutivos en el terminal 3' unidos por cuatro enlaces 2'-5' y opcionalmente incluye además Z' y z' seleccionados independientemente de una unidad estructural abásica invertida y una tapa C3 alquilo [C3; 1,3-propanodiol mono (dihidrogenofosfato)]. En algunas realizaciones $x=y=18$ y N2-(N')y comprenden una posición de L-ADN 18; y (N')y opcionalmente incluye además Z' y z' seleccionados independientemente entre una unidad estructural abásica invertida y una tapa C3 alquilo [C3; 1,3-propanodiol mono (dihidrogenofosfato)]. En algunas realizaciones, N2-(N')y comprende un fosfato de terminal 3'. En algunas realizaciones, N2-(N')y comprende un hidroxilo de terminal 3'. En algunas realizaciones $x=y=18$ y N1-(N)x incluyen ribonucleótidos modificados con azúcar 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 o en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17, 19 o en las posiciones 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17 o en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17, 19. En algunas realizaciones $x=y=18$ y N1-(N)x incluyen ribonucleótidos modificados con azúcar 2'OMe en las posiciones 11, 13, 15, 17 y 19 (desde el terminal 5'). En algunas realizaciones $x=y=18$ y N1-(N)x incluyen ribonucleótidos modificados con azúcar 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 o en las posiciones 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19. En algunas realizaciones $x=y=18$ y N1-(N)x incluyen ribonucleótidos modificados con azúcar 2'OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17, 19.

En algunas realizaciones $x=y=18$ y N1-(N)x incluyen pirimidinas modificadas con azúcar 2'OMe. En algunas realizaciones, todas las pirimidinas en (N)x incluyen la modificación con azúcar 2'OMe. En algunas realizaciones, la cadena antisentido comprende además un L-ADN o un nucleótido 2'-5' en la posición 5, 6 o 7 (5'>3'). En otras realizaciones, la cadena antisentido comprende además un ribonucleótido, que genera un enlace internucleótido 2'5' entre los ribonucleótidos en las posiciones 5-6 o 6-7 (5'>3').

En algunas realizaciones de la Estructura A2, (N)y incluye al menos una unidad estructural de L-ADN. En algunas realizaciones $x=y=18$ y (N')y consiste en ribonucleótidos no modificados en las posiciones 1-16 y 18 y un L-ADN en la penúltima posición 3' (posición 17). En otras realizaciones $x=y=18$ y (N')y consisten en ribonucleótidos no modificados en las posiciones 1-15 y 18 y dos L-ADN consecutivos en la penúltima posición 3' (posiciones 16 y 17). En diversas realizaciones, la unidad estructural no convencional es un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace de fosfato internucleótido 2'-5'. De acuerdo con diversas realizaciones (N')y incluye 2, 3, 4, 5 o 6 ribonucleótidos consecutivos en el terminal 3' unido por enlaces internucleótidos 2'-5'. En una realización, cuatro nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')y están unidos por tres enlaces fosfodiéster 2'-5', en donde uno o más de los nucleótidos 2'-5' que forman los enlaces 2'-5' fosfodiéster incluye además una modificación con azúcar 3'-O-metil (3'OMe). Preferiblemente, el nucleótido terminal 3' de (N')y incluye una modificación con azúcar 2'OMe. En ciertas realizaciones $x=y=18$ y en (N')y dos o más nucleótidos consecutivos en las posiciones 14, 15, 16, 17 y 18 incluyen un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace internucleótido 2'-5'. En diversas realizaciones, el nucleótido que forma el enlace internucleótido 2'-5' incluye un nucleótido 3' desoxirribosa o un nucleótido 3' metoxi. En algunas realizaciones $x=y=18$ y (N')y incluyen nucleótidos unidos al nucleótido adyacente por un enlace internucleótido 2'-5' entre las posiciones 15-16, 16-17 y 17-18 o entre las posiciones 16-17 y 17-18. En algunas realizaciones $x=y=18$ y (N')y incluyen nucleótidos unidos al nucleótido adyacente por un enlace internucleótido 2'-5' entre las posiciones 14-15, 15-16, 16-17 y 17-18 o entre posiciones 15-16, 16-17 y 17-18 o entre las posiciones 16-17 y 17-18 o entre las posiciones 17-18 o entre las posiciones 15-16 y 17-18. En otras realizaciones, los ribonucleótidos de pirimidina (rU, rC) en (N')y son sustituidos con nucleótidos unidos al nucleótido adyacente por un enlace internucleótido 2'-5'.

La unidad estructural C3 alquilo puede estar unida covalentemente al terminal 3' de (N')y y/o al terminal 3' de (N)x a través de un enlace fosfodiéster. En algunas realizaciones, la unidad estructural alquilo comprende propanol, propil fosfato o propil fosforotioato. En algunas realizaciones Z' se selecciona de propanol, propil fosfato, propil fosforotioato combinaciones de los mismos o múltiples de los mismos, en particular 2 o 3 propanol unidos covalentemente, propil fosfato, propil fosforotioato o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones Z' se selecciona de propil fosfato, propil fosforotioato, propil fosfo-propanol; propil fosfo-propil fosforotioato; fosfato de propilfosfopropilo; (propil fosfato)₃, (propil fosfato)₂-propanol, (propil fosfato)₂-propil fosforotioato. Cualquier unidad estructural conjugada de propano o propanol puede incluirse en Z'.

En realizaciones adicionales Z' comprende una combinación de una unidad estructural abásica y un desoxirribonucleótido o ribonucleótido no modificado o una combinación de una unidad estructural de hidrocarburo y un desoxirribonucleótido o ribonucleótido no modificado o una combinación de una unidad estructural abásica (desoxirribo o ribo) y una unidad estructural de hidrocarburo. En tales realizaciones, Z' comprende C3Pi-rAb, C3Ps-rAb, C3Ps-dAb o C3Pi-dAb.

De acuerdo con ciertas realizaciones, la invención proporciona un compuesto de ARNip que comprende además uno o más ribonucleótidos modificados o unidad estructural no convencional, en donde el nucleótido modificado posee una modificación en la unidad estructural de azúcar, en la unidad estructural de base o en la unidad estructural de enlace

internucleótido. En algunas realizaciones, uno o más de N o N' comprende un ribonucleótido modificado con 2'OMe, un 2'5' o un L-nucleótido.

5 En algunas realizaciones (N)x comprende ribonucleótidos modificados y no modificados, cada ribonucleótido modificado que tiene un 2'-O-metilo en su azúcar (2'OMe modificado o modificado con azúcar 2'OMe), en donde N en el terminal 3' de (N) x es un ribonucleótido modificado, (N)x comprende al menos cinco ribonucleótidos modificados alternantes que comienzan en el extremo 3' y al menos nueve ribonucleótidos modificados en total y cada N restante es un ribonucleótido no modificado.

10 En algunas realizaciones, al menos uno de (N)x y (N')y comprenden al menos un nucleótido espejo. En algunas realizaciones en (N')y está presente al menos una unidad estructural no convencional, unidad estructural no convencional que se selecciona de una unidad estructural de ribosa abásica, una unidad estructural de desoxirribosa abásico, un desoxirribonucleótido modificado o no modificado, un nucleótido espejo y un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace de fosfato internucleótido 2'-5'. En algunas realizaciones, al menos uno de N' es un nucleótido espejo.

15 En algunas realizaciones, la unidad estructural no convencional es un nucleótido espejo de L-ADN. En realizaciones adicionales x=y=19 y al menos una unidad estructural no convencional está presente en una de las posiciones 15, 16, 17 o 18 en (N')y. En algunas realizaciones, la unidad estructural no convencional es un nucleótido espejo, preferiblemente una unidad estructural de L-ADN. En algunas realizaciones, la unidad estructural de L-ADN está presente en la posición 17, en la posición 18 o en las posiciones 17 y 18.

20 En algunas realizaciones, la unidad estructural no convencional es un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace fosfato internucleótido 2'-5'. En realizaciones adicionales x=y=19 y los nucleótidos en las posiciones 15-19 o 16-19 o 17-19 en (N')y se unen a nucleótidos adyacentes mediante enlaces fosfato internucleótido 2'-5'. En algunas realizaciones x=y=19 y los nucleótidos en las posiciones 15-19 o 16-19 o 17-19 o 15-18 o 16-18 en (N')y se unen a los nucleótidos adyacentes por enlaces de fosfato internucleótidos 2'-5'.

25 En algunas realizaciones (N)x comprende nueve ribonucleótidos modificados alternantes. En otras realizaciones (N)x comprende nueve ribonucleótidos modificados alternantes que comprenden además un nucleótido modificado por 2'OMe en la posición 2. En algunas realizaciones x = 19 y (N)x comprende ribonucleótidos modificados por 2'OMe en las posiciones impares 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19. En otras realizaciones (N)x comprende además un ribonucleótido modificado por 2'OMe en una o ambas posiciones 2 y 18. En aún otras realizaciones (N)x comprende ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17, 19. En algunas realizaciones, al menos un nucleótido de pirimidina en (N)x comprende una modificación con azúcar 2'OMe. En algunas realizaciones, todos los nucleótidos de pirimidina en (N)x comprenden una modificación con azúcar 2'OMe. En algunas realizaciones, los nucleótidos de pirimidina 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 1'0, 11, 12, 13, 14, o 15 en N(x) comprenden una modificación con azúcar 2'OMe

30 En diversas realizaciones, z" está presente y se selecciona de una unidad estructural ribosa abásico, una unidad estructural desoxirribosa abásico, una unidad estructural desoxirribosa, una unidad estructural ribosa abásico invertido, una unidad estructural C3, C6-amino-Pi, un nucleótido espejo.

35 En ciertas realizaciones (N)x es totalmente complementario a una secuencia diana. En otras realizaciones (N)x es sustancialmente complementaria a una secuencia diana. En algunas realizaciones (N)x comprende un desajuste con la secuencia diana. En realizaciones preferidas (N)x comprende una no coincidencia de un nucleótido con la secuencia diana en el terminal 5' de (N)x; es decir, la posición 1.

40 En ciertas realizaciones (N)x y (N')y son totalmente complementarias. En otras realizaciones (N)x y (N')y son sustancialmente complementarias.

En algunas realizaciones (N)x comprende una no coincidencia con la secuencia diana en la posición 1 y (N)x y (N')y son totalmente complementarios. En algunas realizaciones (N)x comprende una no coincidencia de nucleótidos a la secuencia diana en la posición 1 y (N')y comprende una no coincidencia de nucleótidos a (N)x en la posición 1.

45 En algunas realizaciones x=y=19 y en (N)x dieciocho nucleótidos consecutivos en las posiciones 2-19 son complementarios a dieciocho nucleótidos consecutivos en el ARN diana y el nucleótido en la posición 1 no es coincidente con la secuencia de ARN diana. En diversas realizaciones, el nucleótido en la posición 1 en (N)x está sustituido con una unidad estructural seleccionada del grupo que consiste en ribouracilo, ribouracilo modificado, desoxirriburacilo, desoxirriburacilo modificado, pseudouracilo, desoxipseudouracilo, desoxirribotimidina, desoxirribotimidina modificada, ribocitosina, ribocitosina modificada, desoxirribocitosina, desoxirribocitosina modificada, una unidad estructural de ribosa abásico y una unidad estructural de desoxirribosa abásico. En algunas realizaciones, el nucleótido en la posición 1 en (N)x está sustituido con una unidad estructural seleccionado del grupo que consiste en ribouracilo, ribouracilo modificado, desoxirriburacilo, desoxirriburacilo modificado.

5 En algunas realizaciones $x=y=19$ y en $(N)x$ 18 nucleótidos consecutivos en las posiciones 2-19 son complementarios a 18 nucleótidos consecutivos en el ARN diana y el nucleótido en la posición 1 no es coincidente con la secuencia de ARN diana y el nucleótido en la posición 19 de (N') y es complementario al nucleótido en la posición 1 de $(N)x$. En otras realizaciones $x=y=19$ y el nucleótido en la posición 1 de $(N)x$ no es coincidente con la secuencia de ARNm diana y el nucleótido en la posición 19 de (N') y no es coincidente con el nucleótido en la posición 1 de $(N)x$.

Las moléculas de ácido nucleico de doble cadena divulgadas aquí son ventajosas porque presentan una estabilidad mejorada y/o una actividad mejorada y/o reducen los efectos objetivo y/o una respuesta inmune reducida y/o una captación potenciada por las células cuando se comparan con las terminaciones romas o moléculas con 3' dTdT.

10 Se prevén otras realizaciones en donde $x=y=21$ o en donde $x=y=23$. La Estructura (A1) y (A2) son útiles con los pares de oligonucleótidos conocidos y futuros (cadenas en sentido y antisentido) a un gen de mamífero o de no mamífero (por ejemplo, bacteriano, vegetal). En algunas realizaciones el gen de mamífero es un gen humano. En diversas realizaciones, el ARNm del gen humano se expone en la Publicación de Patente PCT No. WO 2009/044392. En realizaciones adicionales el par de oligonucleótidos se expone en la Publicación de Patente PCT No. WO 2009/044392. En realizaciones adicionales las Estructuras (A1) o (A2) comprenden además modificaciones y motivos
15 expuestos en la Publicación de Patente PCT No. WO 2009/044392.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula de la invención, en una cantidad efectiva para inhibir la expresión génica humana; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Más específicamente, la invención proporciona composiciones para uso en el tratamiento de un sujeto que sufre de insuficiencia renal aguda (ARF), pérdida de audición, glaucoma, síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) y otras lesiones pulmonares y respiratorias agudas, lesión (por ejemplo lesión por isquemia-reperusión) en trasplante de órganos incluyendo trasplante de pulmón, riñón, médula ósea, corazón, páncreas, córnea o de hígado e incluyendo nefrotoxicidad de la función de injerto retardado (DGF), lesión de la médula espinal, úlceras de presión, síndrome de ojo seco, mucositis oral, neuropatía ocular isquémica (ION) y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).

25 Los métodos comprenden administrar al sujeto uno o más compuestos ARNip que inhiben la expresión de un gen. Las novedosas estructuras divulgadas aquí, cuando se integran en secuencias de ácido nucleico en antisentido y en sentido correspondiente a cualquier gen diana, proporcionan un compuesto de ARNip útil para reducir la expresión de ese gen diana. El gen diana es un gen de mamífero o no mamífero.

Breve descripción de las figuras

30 Las Figuras 1A-1J muestran estructuras químicas de algunos posibles excedentes de derivados 3' alquilo/alquilo como unidos covalentemente al nucleótido en terminal 3' (ADN o ARN) de la cadena de oligonucleótido a través de un enlace fosfodiéster. B en la unidad estructural de nucleótidos se refiere a nucleótido "base"; R en cada caso es bien sea H o OH; La Fig. 1A muestra un nucleótido terminal 3' unido covalentemente a una unidad estructural propanol a través de un enlace fosfodiéster; La Fig. 1B muestra un nucleótido terminal 3' unido covalentemente a través de un enlace fosfodiéster a una unidad estructural C3Pi; La Fig. 1C muestra un nucleótido terminal 3' enlazado covalentemente a través de un enlace fosfodiéster a una unidad estructural C3Pi-C3OH (C3 está unido covalentemente al C3OH a través de un enlace fosfodiéster); La Fig. 1D muestra un nucleótido terminal 3' unido covalentemente a una unidad estructural C3Pi-C3Pi a través de un enlace fosfodiéster; La Fig. 1E muestra un nucleótido terminal 3' unido covalentemente a C3Pi-C3Pi-C3OH a través de un enlace fosfodiéster. La Fig. 1F muestra un nucleótido terminal 3' unido covalentemente a C3Pi-C3Pi-C3Pi a través de un enlace fosfodiéster. La Fig. 1G muestra un nucleótido terminal 3' unido covalentemente a C3Pi-rAb o C3Pi-dAb a través de un enlace fosfodiéster. La Fig. 1H muestra un nucleótido terminal 3' unido covalentemente a rAb-C3Pi (R1=OH) o dAb-C3Pi (R1=H) a través de un enlace fosfodiéster. La Fig. 1J muestra un nucleótido terminal 3' unido covalentemente a rAb-rAb(R1=R2= OH) o dAb-rAb (R1 = H, R2 = OH) o rAbdAb (R1 = OH, R2 = H) o dAb-dAb (R1 = R2 = H) a través de un enlace fosfodiéster.
35
40
45

Las Figuras 2A-2F son análogas a las Figuras 1A-1F, excepto que los excedentes no nucleótidos en el terminal 3' están unidos a la posición 2' de la unidad estructural ribosa en lugar de la posición 3'.

Las Figuras 3A-3K ilustran algunos ejemplos específicos de nucleótidos en terminal 3' con excedentes, en algunos casos en los que un átomo de oxígeno unido al fósforo ha sido sustituido por azufre.

50 La Figura 4 proporciona datos de estabilidad para dos moléculas bicatenarias, S505 que es un dúplex de 19-mer de extremos romos (compuesto 5 en la Tabla 3 en los Ejemplos) y S800 que es un dúplex de 19-mer que comprende un excedente de terminal 3' C3C3 no nucleótido (C3Pi-C3OH, compuesto 7 en la Tabla 3 en los Ejemplos). Los dos compuestos son nucleasa estables en extracto celular durante al menos 36 horas, sin embargo, S800 tiene un valor

de IC50 de aproximadamente 0.17 nM y S505 tiene un valor de IC50 de 1.1 nM. Las secuencias utilizadas en la generación de los dos compuestos se exponen en las SEQ ID NOS: 1 y 2 (cadena en sentido y cadena antisentido, respectivamente).

Descripción detallada de la invención

- 5 La presente solicitud se refiere a compuestos de ARNip de doble cadena que comprenden al menos una unidad estructural no nucleótido unido covalentemente en el terminal 3' de una o ambas de las cadenas en sentido y antisentido. La unidad estructural no nucleótido se selecciona de una unidad estructural abásica, una unidad estructural abásica invertida, una unidad estructural alquilo o un derivado del mismo, y un fosfato inorgánico.

Diseño estructural

- 10 En un aspecto proporcionado aquí son moléculas de ácido nucleico de doble cadena que comprenden una cadena en sentido y una cadena antisentido, en donde la cadena antisentido comprende 2, unidades estructurales no nucleótidos unidas covalentemente en el extremo terminal 3'; en donde la unidad estructural no nucleótido se selecciona de una unidad estructural alquilo (hidrocarburo) o un derivado del mismo y una unidad estructural basado en fosfato, más específicamente de C3Pi-C3OH, C3Pi-C3Pi, C3Pi-C3Ps, C3Pi-rAb y C3Pi-dAb. En ciertas realizaciones preferidas, la
- 15 unidad estructural no nucleótido incluye una unidad estructural alquilo o una unidad estructural derivada de alquilo.

En algunas realizaciones, se proporcionan moléculas de ácido nucleico de doble cadena que tienen la estructura (A1):

(A1) 5' (N)_x - Z 3' (cadena antisentido)

3' Z'-(N')_y -z" 5' (cadena en sentido)

- 20 en donde cada uno de N y N' es un nucleótido que puede estar no modificado o modificado, o una unidad estructural no convencional;

en donde cada uno de (N)_x y (N')_y es un oligonucleótido en el que cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' mediante un enlace covalente;

- 25 en donde Z está presente y consiste en una unidad estructural no nucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en C3Pi-C3OH, C3Pi-C3Pi, C3Pi-C3Ps, C3Pi-rAb y C3Pi-dAb, unidos covalentemente a través de un fosfodiéster o un enlace fosforotioato en una posición 3' o una posición 2' del residuo de azúcar en el nucleótido en terminal de la cadena antisentido;

en donde Z' está presente o ausente, pero si está presente comprende una unidad estructural no nucleótido unido covalentemente en el terminal 3' de la cadena en sentido;

- 30 en donde z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es una unidad estructural de cubrimiento unida covalentemente en el terminal 5' de (N')_y;

en donde cada uno de x y y es independientemente un entero entre 18 y 40;

en donde la secuencia de (N')_y tiene complementariedad con la secuencia de (N)_x; y

en donde la secuencia de (N)_x tiene complementariedad con una secuencia consecutiva en un ARN diana.

En algunas realizaciones, el enlace covalente que une cada N o N' consecutivos es un enlace fosfodiéster.

- 35 En algunas realizaciones, x = y=19 a 27, por ejemplo 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27. En algunas rrealizaciones x = y y cada un o de x y y es 19, 20, 21, 22 o 23. En diversas realizaciones x=y=19.

En algunas realizaciones x=y=19 y Z' está presente y consiste en dos unidades estructurales no nucleótidos.

En realizaciones preferidas x=y=19 y Z está presente y consiste en dos unidades estructurales no nucleótidos.

- 40 En realizaciones preferidas x=y=19 y Z está presente y consiste en dos unidades estructurales no nucleótidos; y Z' está presente y consiste en una unidad estructural no nucleótido.

En realizaciones adicionales x=y=19 y Z y Z' están presentes y cada uno comprende independientemente dos unidades estructurales no nucleótidos.

En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico de doble cadena comprenden una unidad estructural de ADN o una no coincidencia con el objetivo en la posición 1 de la cadena antisentido (terminal 5'). Tal estructura se

describe aquí. De acuerdo con una realización proporcionada son moléculas de ácido nucleico de doble cadena que tienen una estructura (A2) expuesta a continuación:

(A2) 5' N1-(N)x - Z 3' (cadena antisentido)

3' Z'-N2-(N')y -z" 5' (cadena en sentido)

- 5 en donde cada uno de N2, N y N' es un ribonucleótido no modificado o modificado, o una unidad estructural no convencional;
- en donde cada uno de (N)x y (N')y es un oligonucleótido en el que cada N o N' consecutivo se une al N o N' adyacente mediante un enlace covalente;
- en donde cada uno de x y y es independientemente un entero entre 17 y 39;
- 10 en donde la secuencia de (N')y tiene complementariedad con la secuencia de (N)x y (N)x tiene complementariedad con una secuencia consecutiva en un ARN diana;
- en donde N1 está unido covalentemente a (N)x y no es coincidente con el ARN diana o es una unidad estructural de ADN complementaria con el ARN diana;
- 15 en donde N1 es una unidad estructural seleccionada del grupo que consiste en uridina natural o modificada, desoxirriburoidina, ribotimidina, desoxirribotimidina, adenosina o desoxiadenosina;
- en donde z" puede estar presente o estar ausente, pero si está presente una unidad estructural de cubrimiento unida covalentemente en el terminal 5' de N2- (N')y, y
- en donde Z está presente y consiste en una unidad estructural no nucleótido seleccionada entre el grupo que consiste en C3Pi-C3OH, C3Pi-C3Pi, C3Pi-C3Ps, C3Pi-rAb y C3Pi-dAb, unidos covalentemente a través de un fosfodiéster o un enlace fosforotioato en una posición 3' o una posición 2' del residuo de azúcar en el nucleótido en terminal de la cadena antisentido; y
- 20 en donde Z' está presente o ausente, pero si está presente comprende una unidad estructural no nucleótido unida covalentemente en el terminal 3' de la cadena en sentido.
- En algunas realizaciones x=y=18 y Z' está presente y consiste en dos unidades estructurales no nucleótidos.
- 25 En realizaciones preferidas x=y=18 y Z está presente y consiste en dos unidades estructurales no nucleótidos.
- En realizaciones preferidas x=y=18 y Z está presente y consiste en dos unidades estructurales no nucleótidos; y Z' está presente y consiste en una unidad estructural no nucleótido.
- En realizaciones adicionales x=y=18 y Z y Z' están presentes y cada uno comprende independientemente dos unidades estructurales no nucleótidos.
- 30 En algunas realizaciones la secuencia de (N')y es totalmente complementaria a la secuencia de (N)x. En diversas realizaciones, la secuencia de N2-(N')y es complementaria a la secuencia de N1-(N)x. En algunas realizaciones (N)x comprende un antisentido que es totalmente complementario a aproximadamente 17 a aproximadamente 39 nucleótidos consecutivos en un ARN diana. En otras realizaciones (N)x comprende un antisentido que es sustancialmente complementario a aproximadamente 17 a aproximadamente 39 nucleótidos consecutivos en un ARN diana.
- 35 En algunas realizaciones N1 y N2 forman un par de bases de Watson-Crick. En algunas realizaciones, N1 y N2 forman un par de bases no-Watson-Crick. En algunas realizaciones, se forma un par de bases entre un ribonucleótido y un desoxirribonucleótido.
- En algunas realizaciones x=y=18, x=y=19 o x=y=20. En realizaciones preferidas x=y=18. Cuando x = 18 en N1-(N)x, N1 se refiere a la posición 1 y las posiciones 2-19 se incluyen en (N) 18 Cuando y = 18 en N2-(N')y, N2 se refiere a la posición 19 y las posiciones 1-18 se incluyen en (N') 18.
- 40 En algunas realizaciones N1 está unido covalentemente a (N)x y no es coincidente con el ARN diana. En diversas realizaciones N1 está unido covalentemente a (N)x y es una unidad estructural de ADN complementario al ARN diana.
- 45 En algunas realizaciones, una uridina en la posición 1 de la cadena antisentido está sustituida con un N1 seleccionado entre adenosina, desoxiadenosina, desoxiuridina (dU), ribotimidina o desoxitimidina. En diversas realizaciones N1 se selecciona entre adenosina, desoxiadenosina o desoxiuridina.

- En algunas realizaciones la guanosina en la posición 1 de la cadena antisentido está sustituida con una N1 seleccionado entre adenosina, desoxiadenosina, uridina, desoxiuridina, ribotimidina o desoxitimidina. En diversas realizaciones N1 se selecciona de adenosina, desoxiadenosina, uridina o desoxiuridina.
- 5 En algunas realizaciones la citidina en la posición 1 de la cadena antisentido está sustituida con un N1 seleccionado entre adenosina, desoxiadenosina, uridina, desoxiuridina, ribotimidina o desoxitimidina. En diversas realizaciones N1 se selecciona de adenosina, desoxiadenosina, uridina o desoxiuridina.
- En algunas realizaciones la adenosina en la posición 1 de la cadena antisentido está sustituida con un N1 seleccionado entre desoxiadenosina, desoxiuridina, ribotimidina o desoxitimidina. En diversas realizaciones N1 se selecciona entre desoxiadenosina o desoxiuridina.
- 10 En algunas realizaciones N1 y N2 forman un par de bases entre uridina o desoxiuridina y adenosina o desoxiadenosina. En otras realizaciones, N1 y N2 forman un par de bases entre desoxiuridina y adenosina.
- En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico de doble cadena es un siARN, siNA o un miARN. Las moléculas de ácido nucleico de doble cadena, tal como se proporcionan aquí, se denominan también "dúplex".
- 15 En ciertas realizaciones preferidas $x=y=18$. En algunas realizaciones N1 y N2 forman un par de bases de Watson-Crick. En otras realizaciones, N1 y N2 forman un par de bases no-Watson-Crick. En ciertas realizaciones, N1 se selecciona del grupo que consiste en riboadenosina, riboadenosina modificada, desoxirriboadenosina, desoxirriboadenosina modificada. En otras realizaciones, N1 se selecciona del grupo que consiste en ribouridina, desoxirribouridina, ribouridina modificada y desoxirribouridina modificada.
- 20 En ciertas realizaciones, la posición 1 en la cadena antisentido (terminal 5') comprende desoxirribidina (dU) o adenosina. En algunas realizaciones, N1 se selecciona del grupo que consiste en riboadenosina, riboadenosina modificada, desoxirriboadenosina, desoxirriboadenosina modificada y N2 se selecciona del grupo que consiste en ribouridina, desoxirributiridina, ribouridina modificada y desoxirriboridina modificada. En ciertas realizaciones N1 se selecciona del grupo que consiste en riboadenosina y riboadenosina modificada y N2 se selecciona del grupo que consiste en ribouridina y ribouridina modificada.
- 25 En ciertas realizaciones, N1 se selecciona del grupo que consiste en ribouridina, desoxirribouridina, ribouridina modificada y desoxirriboridina modificada y N2 se selecciona del grupo que consiste en riboadenosina, riboadenosina modificada, desoxirriboadenosina, desoxirriboadenosina modificada. En ciertas realizaciones N1 se selecciona del grupo que consiste en ribouridina y desoxirribouridina y N2 se selecciona del grupo que consiste en riboadenosina y riboadenosina modificada. En ciertas realizaciones N1 es ribureidina y N2 es riboadenosina. En ciertas realizaciones,
- 30 N1 es desoxirribiridina y N2 es riboadenosina.
- En algunas realizaciones de la Estructura (A2), N1 incluye ribouracilo modificado con azúcar 2'OMe o riboadenosina modificada con azúcar 2'OMe. En ciertas realizaciones de la estructura (A2), N2 incluye un ribonucleótido o desoxirribonucleótido modificado con azúcar 2'OMe.
- 35 En algunas realizaciones de la Estructura (A2), N1 incluye ribouracilo modificado con azúcar 2'OMe o ribocitosina modificada con azúcar 2'OMe. En ciertas realizaciones de la estructura (A2), N2 incluye un ribonucleótido modificado con azúcar 2'OMe.
- En algunas realizaciones cada uno de N y N' es un nucleótido no modificado. En algunas realizaciones, al menos uno de N o N' incluye un nucleótido químicamente modificado o una unidad estructural no convencional. En algunas realizaciones, la unidad estructural no convencional se selecciona de un nucleótido espejo, una unidad estructural ribosa abásico y una unidad estructural desoxirribosa abásico. En algunas realizaciones, la unidad estructural no convencional es un nucleótido espejo, preferiblemente una unidad estructural de L-ADN. En algunas realizaciones, al menos uno de N o N' incluye un ribonucleótido modificado con azúcar 2'OMe.
- 40 En algunas realizaciones la secuencia de (N')y es totalmente complementaria a la secuencia de (N)x. En otras realizaciones la secuencia de (N')y es sustancialmente complementaria a la secuencia de (N)x.
- 45 En algunas realizaciones (N)x incluye una secuencia antisentido que es totalmente complementaria a aproximadamente 17 a aproximadamente 39 nucleótidos consecutivos en un ARN diana. En otras realizaciones (N)x incluye un antisentido que es sustancialmente complementario a aproximadamente 17 a aproximadamente 39 nucleótidos consecutivos en un ARN diana.
- 50 En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico divulgadas en la presente invención son siARN, siNA o miARN.

- En algunas realizaciones de las Estructuras A1 y A2, Z está presente y Z' está ausente. En realizaciones adicionales, tanto Z como Z' están presentes. En algunas realizaciones Z y Z' están presentes y son idénticos. En realizaciones adicionales Z y Z' están presentes y son diferentes. En algunas realizaciones Z' representa 2, 3, 4 o 5 unidades estructurales no nucleótidos o una combinación de 2, 3, 4, o 5 unidades estructurales no nucleótidos y nucleótidos. En algunas realizaciones, cada uno de Z y o Z' consta de dos (2) unidades estructurales no nucleótidos unidos covalentemente al terminal 3' de la cadena de ARNip a través de un enlace fosfodiéster.
- Una unidad estructural no nucleótido se selecciona del grupo que consiste en una unidad estructural abásica, una unidad estructural abásica invertida, una unidad estructural alquilo o un derivado de los mismos, y un fosfato inorgánico. En algunas realizaciones, una unidad estructural no nucleótido es una unidad estructural alquilo o derivado del mismo. En algunas realizaciones, la unidad estructural alquilo comprende un grupo funcional terminal seleccionado del grupo que consiste en un alcohol, una amina terminal, un fosfato terminal y una unidad estructural fosforotioato terminal.
- En realizaciones adicionales, Z' está presente y comprende una o más unidades estructurales no nucleótidos seleccionadas del grupo que consiste en una unidad estructural abásica, una unidad estructural abásica invertida, una unidad estructural de hidrocarburo y un fosfato inorgánico. En algunas realizaciones Z' está presente y comprende una o más unidades estructurales alquilo o derivados de los mismos.
- En algunas realizaciones, Z está presente y consiste en dos unidades estructurales alquilo o derivados de los mismos y Z' está presente y consiste en una sola unidad estructural alquilo o derivado del mismo.
- En algunas realizaciones, cada uno de Z y Z' incluye una unidad estructural abásica, por ejemplo una unidad estructural desoxirriboabásico (denominado aquí "dAb") o unidad estructural ribobásico (denominado aquí "rAb"). En algunas realizaciones Z' comprende dos unidades estructurales abásicas unidas covalentemente y es por ejemplo 5'> 3' dAb-dAb o rAb-rAb o dAb-rAb o rAb-dAb. Cada unidad estructural se conjuga covalentemente con una unidad estructural adyacente a través de un enlace covalente, preferiblemente un enlace basado en fosfato. En algunas realizaciones, el enlace a base de fosfato es un fosforotioato, un fosfonoacetato o un enlace fosfodiéster.
- En algunas realizaciones, Z' incluye una unidad estructural alquilo C2, C3, C4, C5 o C6, opcionalmente una unidad estructural C3[propano, -(CH₂)₃] o un derivado de los mismos, por ejemplo propanol (C3-OH), propanodiol, o derivado fosfodiéster de propanodiol ("C3P"). En realizaciones preferidas, Z' incluye dos unidades estructurales de hidrocarburo y en algunos ejemplos es C3-C3. Cada C3 se conjuga covalentemente con un C3 adyacente a través de un enlace covalente, preferiblemente un enlace a base de fosfato. En algunas realizaciones, el enlace a base de fosfato es un fosforotioato, un fosfonoacetato o un enlace fosfodiéster.
- En algunas realizaciones, cada uno de Z y Z' incluye independientemente una unidad estructural C3 alquilo, C3 alcohol o C3 éster.
- En algunas realizaciones de las Estructuras A1 y A2, cada uno de N y N' es un nucleótido no modificado. En algunas realizaciones, al menos uno de N o N' incluye un nucleótido químicamente modificado o una unidad estructural no convencional. En algunas realizaciones, la unidad estructural no convencional se selecciona de un nucleótido espejo, una unidad estructural ribosa abásica y una unidad estructural desoxirribosa abásica. En algunas realizaciones, la unidad estructural no convencional es un nucleótido espejo, preferiblemente una unidad estructural de L-ADN. En algunas realizaciones, al menos uno de N o N' incluye un ribonucleótido modificado con azúcar 2'OMe.
- En algunas realizaciones la secuencia de (N')_y es totalmente complementaria a la secuencia de (N)_x. En otras realizaciones la secuencia de (N')_y es sustancialmente complementaria a la secuencia de (N)_x.
- En otras realizaciones, el compuesto de la Estructura A1 o Estructura A2 incluye al menos un ribonucleótido modificado en el residuo de azúcar. En algunas realizaciones, el compuesto incluye una modificación en la posición 2' del residuo de azúcar. En algunas realizaciones la modificación en la posición 2' incluye la presencia de una unidad estructural amino, flúor, alcoxi o alquilo. En ciertas realizaciones la modificación 2' incluye una unidad estructural alcoxi, En realizaciones preferidas la unidad estructural alcoxi es una unidad estructural metoxi (también conocido como 2'-O-metilo, 2'OMe, 2'-OCH₃). En algunas realizaciones, el compuesto de ácido nucleico incluye ribonucleótidos alternantes modificados con azúcar 2'OMe en uno o ambos de las cadena antisentido y en sentido. En otras realizaciones, el compuesto incluye ribonucleótidos modificados con azúcar 2'OMe en la cadena antisentido, (N)_x o N1-(N)_x solamente. En ciertas realizaciones, el ribonucleótido medio de la cadena antisentido; por ejemplo ribonucleótido en posición 10 en una cadena de 19-mer no se ha modificado. En diversas realizaciones, el compuesto de ácido nucleico incluye al menos 5 ribonucleótidos modificados y no modificados con azúcar 2'OMe alternantes. En realizaciones adicionales el compuesto de la Estructura A1 o Estructura A2 incluye ribonucleótidos modificados en posiciones alternantes en donde cada ribonucleótido en los terminales 5' y 3' de (N)_x o N1-(N)_x se modifican en sus residuos de azúcar y cada ribonucleótido en los terminales 5' y 3' de (N')_y o N2-(N)_y no están modificados en sus residuos de azúcar.

En algunas realizaciones, la molécula de doble cadena incluye una o más de las siguientes modificaciones

a) N en al menos una de las posiciones 5, 6, 7, 8 o 9 desde el terminal 5' de la cadena antisentido se selecciona de un nucleótido 2'5' o un nucleótido espejo;

5 b) N' en al menos una de las posiciones 9 o 10 desde el terminal 5' de la cadena en sentido se selecciona de un nucleótido 2'5' y una pseudoUridina; y

c) N' en posiciones 4, 5 o 6 consecutivas en las posiciones terminales 3' de (N')y comprende un nucleótido 2'5'.

En algunas realizaciones, la molécula de doble cadena incluye una combinación de las siguientes modificaciones

a) la cadena antisentido incluye un nucleótido 2'5' o un nucleótido espejo en al menos una de las posiciones 5, 6, 7, 8 o 9 desde el terminal 5'; y

10 b) la cadena en sentido incluye al menos uno de un nucleótido 2'5' y una pseudoUridina en las posiciones 9 o 10 desde el terminal 5'.

En algunas realizaciones, la molécula de doble cadena incluye una combinación de las siguientes modificaciones:

a) la cadena antisentido incluye un nucleótido 2'5' o un nucleótido espejo en al menos una de las posiciones 5, 6, 7, 8 o 9 desde el terminal 5'; y

15 c) la cadena en sentido incluye 4, 5 o 6 nucleótidos 2'5' consecutivos en las posiciones penúltima 3' o terminal 3'.

En algunas realizaciones, la cadena en sentido [(N)x o N1-(N)x incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 ribonucleótidos modificados con azúcar 2'OMe. En algunas realizaciones, la cadena antisentido incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19. En otras realizaciones, la cadena antisentido incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19. En otras realizaciones, la

20 cadena antisentido incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19. En algunas realizaciones, la cadena antisentido incluye una o más pirimidinas modificadas con azúcar 2'OMe. En algunas realizaciones, todos los nucleótidos de pirimidina en la cadena antisentido son modificados con azúcar 2'OMe. En algunas realizaciones, la cadena en sentido incluye pirimidinas modificadas con azúcar 2'OMe.

25 En algunas realizaciones de la Estructura A1 y Estructura A2, la cadena en sentido y la cadena antisentido están independientemente fosforiladas o no fosforiladas en el terminal 3' y en el terminal 5'. En algunas realizaciones de la Estructura A1 y Estructura A2, la cadena en sentido y la cadena antisentido no están fosforiladas en los terminales 3' y 5'. En otras realizaciones, la cadena en sentido y la cadena antisentido se fosforilan en los terminales 3'.

30 En algunas realizaciones de la Estructura A1 y la Estructura A2 (N')y incluye al menos una unidad estructural no convencional seleccionada entre un nucleótido espejo, un nucleótido 2'5' y un TNA. En algunas realizaciones, la unidad estructural no convencional es un nucleótido espejo. En diversas realizaciones, el nucleótido espejo se selecciona de un L-ribonucleótido (L-ARN) y un L-deoxirribonucleótido (L-ADN). En realizaciones preferidas, el nucleótido espejo es L-ADN. En ciertas realizaciones, la cadena en sentido comprende una unidad estructural no convencional en la posición 9 o 10 (desde el terminal 5'). En realizaciones preferidas, la cadena en sentido incluye una unidad estructural no convencional en la posición 9 (desde el terminal 5'). En algunas realizaciones, la cadena en sentido tiene 19

35 nucleótidos de longitud y comprende 4, 5 o 6 unidades estructurales no convencionales consecutivas en las posiciones 15, (desde el terminal 5'). En algunas realizaciones, la cadena en sentido incluye 4 ribonucleótidos 2'5' consecutivos en las posiciones 15, 16, 17 y 18. En algunas realizaciones, la cadena en sentido incluye 5 ribonucleótidos consecutivos 2'5' en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19. En diversas realizaciones, la cadena en sentido comprende además Z'. En algunas realizaciones Z' incluye una unidad estructural C3OH o una unidad estructural C3Pi.

40 En algunas realizaciones de la Estructura A1 (N')y incluye al menos una unidad estructural de L-ADN. En algunas realizaciones x=y=19 y (N')y, consiste en ribonucleótidos no modificados en las posiciones 1-17 y 19 y un L-ADN en la penúltima posición 3' (posición 18). En otras realizaciones x=y=19 y (N')y consiste en ribonucleótidos no modificados en las posiciones 1-16 y 19 y dos L-ADN consecutivos en la penúltima posición 3' (posiciones 17 y 18). En diversas realizaciones, la unidad estructural no convencional es un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace internucleótido de fosfato 2'-5'. De acuerdo con diversas realizaciones (N')y incluye 2, 3, 4, 5 o 6 ribonucleótidos consecutivos en el terminal 3' unido por enlaces internucleótidos 2'-5'. En una realización, cuatro nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')y están unidos por tres enlaces fosfodiéster 2'-5', en donde uno o más de los nucleótidos 2'-5' que forman los enlaces 2'-5' fosfodiéster incluye además una modificación con azúcar 3'-O-metil (3'OMe). Preferiblemente, el nucleótido terminal 3' de (N')y incluye una modificación con azúcar 2'OMe. En ciertas realizaciones x=y=19 y (N')y incluye dos o más nucleótidos consecutivos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19 incluyen un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace internucleótido 2'-5' (2'-5' nucleótido). En diversas realizaciones, el nucleótido que forma el enlace internucleótido 2'-5' incluye un nucleótido 3' desoxirribosa o un

50

- nucleótido 3' metoxi (3' H o 3'OMe en lugar de un 3' OH). En algunas realizaciones $x=y=19$ y (N')y incluye nucleótidos 2'-5' en las posiciones 15, 16 y 17 de tal manera que los nucleótidos adyacentes están unidos por un enlace internucleótido 2'-5' entre las posiciones 15-16, 16-17 y 17-18; o en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19 de tal manera que los nucleótidos adyacentes están unidos por un enlace internucleótido 2'-5' entre las posiciones 15-16, 16-17, 17-18 y 18-19 y un 3' OH está disponible en el nucleótido terminal 3' o en las posiciones 16, 17 y 18 de tal manera que los nucleótidos adyacentes están unidos por un enlace internucleótido 2'-5' entre las posiciones 16-17, 17-18 y 18-19. En algunas realizaciones $x=y=19$ y (N')y incluye nucleótidos 2'-5' en las posiciones 16 y 17 o en las posiciones 17 y 18 o en las posiciones 15 y 17 de tal manera que los nucleótidos adyacentes están unidos por un enlace 2'-5' internucleótido entre las posiciones 16-17 y 17-18 o entre las posiciones 17-18 y 18-19 o entre las posiciones 15-16 y 17-18, respectivamente. En otras realizaciones, los ribonucleótidos de pirimidina (rU, rC) en (N')y están sustituidos con nucleótidos unidos al nucleótido adyacente por un enlace internucleótido 2'-5'. En algunas realizaciones $x=y=19$ y (N')y comprende cinco nucleótidos consecutivos en el terminal 3' unidos por cuatro enlaces 2'-5', específicamente los enlaces entre la posición de los nucleótidos 15-16, 16-17, 17-18 y 18-19.
- En algunas realizaciones $x=y=19$ y (N')y comprende cinco nucleótidos consecutivos en el terminal 3' unidos por cuatro enlaces 2'-5' y opcionalmente además incluye Z' y z' seleccionados independientemente entre una unidad estructural abásica invertida y una cobertura de C3 [C3; 1,3-propanodiol mono (dihidrogenofosfato)]. La cobertura de C3 alquilo está unida covalentemente al nucleótido terminal 3' o 5'. En algunas realizaciones, la cobertura terminal 3' C3 comprende además un fosfato 3'. En algunas realizaciones la cobertura terminal 3' C3 comprende además un grupo hidroxilo terminal 3'.
- En algunas realizaciones $x=y=19$ y (N')y comprende una posición de L-ADN 18; y (N')y opcionalmente incluye además Z' y z' seleccionados independientemente entre una unidad estructural abásica invertida y una cobertura C3 alquilo [C3; 1,3-propanodiol mono (dihidrogenofosfato)].
- En algunas realizaciones (N')y comprende un fosfato 3' terminal (es decir, fosforilado en el terminal 3'). En algunas realizaciones (N')y comprende un hidroxilo terminal 3'.
- En algunas realizaciones $x=y=19$ y (N)x incluye ribonucleótidos modificados con azúcar 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 o en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17, 19. En algunas realizaciones $x=y=19$ y (N)x incluye pirimidinas modificadas con azúcar 2'OMe. En algunas realizaciones, todas las pirimidinas en (N)x incluyen la modificación con azúcar 2'OMe.
- En algunas realizaciones de la estructura A2 $x=y=18$ y N2 es una unidad estructural riboadenosina. En algunas realizaciones $x=y=18$, y N2-(N')y comprende cinco nucleótidos consecutivos en el terminal 3' unidos por cuatro enlaces 2'-5', específicamente los enlaces entre la posición de los nucleótidos 15-16, 16-17, 17-18 y 18-19. En algunas realizaciones, los enlaces incluyen enlaces fosfodiéster. En algunas realizaciones $x=y=18$ y N2-(N')y comprende cinco nucleótidos consecutivos en el terminal 3' unidos por cuatro enlaces 2'-5' y opcionalmente incluye además Z' y z' seleccionados independientemente entre una unidad estructural abásica invertida y una cobertura C3 alquilo [C3; 1,3-propanodiol mono (dihidrogenofosfato)]. En algunas realizaciones $x=y=18$ y N2-(N')y comprende una posición 18 de L-ADN; y (N')y opcionalmente incluye además Z' y z' seleccionados independientemente entre una unidad estructural abásica invertida y una cobertura C3 alquilo [C3; 1,3-propanodiol mono(dihidrogenofosfato)]. En algunas realizaciones, N2-(N')y comprende un fosfato terminal 3'. En algunas realizaciones, N2-(N')y comprende un hidroxilo terminal 3'. En algunas realizaciones $x=y=18$ y N1-(N)x incluye ribonucleótidos modificados con azúcar 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 o en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17, 19 o en las posiciones 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17 o en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17, 19. En algunas realizaciones $x=y=18$ y N1-(N)x incluye ribonucleótidos modificados con azúcar 2'OMe en las posiciones 11, 13, 15, 17 y 19 (desde el terminal 5'). En algunas realizaciones $x=y=18$ y N1-(N)x incluye ribonucleótidos modificados con azúcar 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 o en las posiciones 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19. En algunas realizaciones $x=y=18$ y N1-(N)x incluye ribonucleótidos modificados con azúcar 2'OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17, 19.
- En algunas realizaciones $x=y=18$ y N1-(N)x incluye pirimidinas modificadas con azúcar 2'OMe. En algunas realizaciones, todas las pirimidinas en (N)x incluyen la modificación con azúcar 2'OMe. En algunas realizaciones, la cadena antisentido comprende además un L-ADN o un nucleótido 2'-5' en la posición 5, 6 o 7 (5'> 3'). En otras realizaciones, la cadena antisentido comprende además un ribonucleótido, que genera un enlace internucleótido 2'5' entre los ribonucleótidos en las posiciones 5-6 o 6-7 (5'> 3').
- En algunas realizaciones de la Estructura A2, (N)y incluye al menos una unidad estructural de L-ADN. En algunas realizaciones $x=y=18$ y (N')y consiste en ribonucleótidos no modificados en las posiciones 1-16 y 18 y un L-ADN en la penúltima posición 3' (posición 17). En otras realizaciones $x=y=18$ y (N')y consiste en ribonucleótidos no modificados en las posiciones 1-15 y 18 y dos L-ADN consecutivos en la penúltima posición 3' (posiciones 16 y 17). En diversas realizaciones, la unidad estructural no convencional es un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace internucleótido fosfato 2'-5'. De acuerdo con diversas realizaciones (N')y incluye 2, 3, 4, 5 o 6 ribonucleótidos

consecutivos en el terminal 3' unido por enlaces internucleótidos 2'-5'. En una realización, cuatro nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')y están unidos por tres enlaces fosfodiéster 2'-5', en donde uno o más de los nucleótidos 2'-5' que forman los enlaces fosfodiéster 2'-5' incluye además una modificación con azúcar 3'-O-metil (3'OMe). Preferiblemente, el nucleótido terminal 3' de (N')y incluye una modificación con azúcar 2'OMe. En ciertas realizaciones x=y=18 y en (N')y dos o más nucleótidos consecutivos en las posiciones 14, 15, 16, 17 y 18 incluyen un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace internucleótido 2'-5'. En diversas realizaciones, el nucleótido que forma el enlace internucleótido 2'-5' incluye un nucleótido 3' desoxirribosa o un nucleótido 3' metoxi. En algunas realizaciones x=y=18 y (N')y incluye nucleótidos unidos al nucleótido adyacente por un enlace internucleótido 2'-5' entre las posiciones 15-16, 16-17 y 17-18 o entre las posiciones 16-17 y 17-18. En algunas realizaciones x=y=18 y (N')y incluye nucleótidos unidos al nucleótido adyacente por un enlace internucleótido 2'-5' entre las posiciones 14-15, 15-16, 16-17 y 17-18 o entre posiciones 15-16, 16-17 y 17-18 o entre las posiciones 16-17 y 17-18 o entre las posiciones 17-18 o entre las posiciones 15-16 y 17-18. En otras realizaciones, los ribonucleótidos de pirimidina (rU, rC) en (N')y están sustituidos con nucleótidos unidos al nucleótido adyacente por un enlace internucleótido 2'-5'.

En algunas realizaciones de la Estructura A1 y la Estructura A2 cada N consiste en un ribonucleótido no modificado. En algunas realizaciones de Estructura A1 y Estructura A2, cada N' consiste en un nucleótido no modificado. En realizaciones preferidas, al menos uno de N y N' es un ribonucleótido modificado o una unidad estructural no convencional.

En otras realizaciones, la molécula de Estructura A1 o Estructura A2 incluye al menos un ribonucleótido modificado en el residuo de azúcar. En algunas realizaciones, el compuesto incluye una modificación en la posición 2' del residuo de azúcar. En algunas realizaciones, la modificación en la posición 2' incluye la presencia de una unidad estructural amino, fluoro, alcoxi o alquilo. En ciertas realizaciones la modificación 2' incluye una unidad estructural alcoxi, En las realizaciones preferidas la unidad estructural alcoxi es una unidad estructural metoxi (también conocido como 2'-O-metilo, 2'OMe, 2'-OCH₃). En algunas realizaciones, el compuesto de ácido nucleico incluye ribonucleótidos alternantes modificados con azúcar 2'OMe en una o ambas de las cadenas antisentido y en sentido. En otras realizaciones, el compuesto incluye ribonucleótidos modificados con azúcar 2'OMe en la cadena antisentido, (N)x o N1-(N)x solamente. En ciertas realizaciones, el ribonucleótido medio de la cadena antisentido; por ejemplo ribonucleótido en posición 10 en una cadena de 19-mer no se ha modificado. En diversas realizaciones, el compuesto de ácido nucleico incluye al menos 5 ribonucleótidos modificados y no modificados con azúcar 2'OMe alternantes.

En realizaciones adicionales el compuesto de Estructura A1 o Estructura A2 incluye ribonucleótidos modificados en posiciones alternas en donde cada ribonucleótido en los terminales 5' y 3' de (N)x o N1-(N)x se modifican en sus residuos de azúcar y cada ribonucleótido en los terminales 5' y 3' de (N')y o N2-(N)y no están modificados en sus residuos de azúcar.

En algunas realizaciones, (N)x o N1-(N)x incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19. En otras realizaciones (N)x (N) x o N1-(N)x incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19. En algunas realizaciones (N)x o N1-(N)x incluye pirimidinas modificadas con 2'OMe. En algunas realizaciones, todos los nucleótidos de pirimidina en (N)x o N1-(N)x son modificados con 2'OMe. En algunas realizaciones (N')y o N2-(N')y incluye pirimidinas modificadas con 2'OMe. En realizaciones adicionales el compuesto de estructura A1 o estructura A2 incluye ribonucleótidos modificados en posiciones alternas en las que cada ribonucleótido en los terminales 5' y 3' de (N)x o N1-(N)x se modifican en sus residuos de azúcar y cada ribonucleótido en los terminales 5' y 3' de (N')y o N2-(N)y no están modificados en sus residuos de azúcar.

Las moléculas de ácido nucleico divulgadas aquí pueden tener un extremo romo en un extremo, por ejemplo cuando Z' está ausente. La molécula de ácido nucleico puede ser modificada con nucleótidos modificados o unidades estructurales no convencionales que pueden estar localizados en cualquier posición a lo largo de bien sea, la cadena en sentido o antisentido. La molécula de ácido nucleico puede incluir aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos modificados. La molécula de ácido nucleico puede incluir aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 unidades estructurales no convencionales. La molécula de ácido nucleico puede incluir un grupo de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, preferiblemente 1, 2, 3 o 4 nucleótidos modificados contiguos o unidades estructurales no convencionales. Los ácidos nucleicos modificados pueden estar presentes sólo en la cadena en sentido, en la cadena antisentido solamente, o tanto en la cadena en sentido y en la cadena antisentido. En algunas realizaciones, el nucleótido modificado comprende un nucleótido modificado con azúcar 2', que incluye nucleótido modificado con 2' O-metil, nucleótido modificado con 2'desoxifluoro, nucleótido modificado con 2'-amino. En algunas realizaciones, la unidad estructural no convencional comprende un nucleótido espejo (es decir, L-ADN o L-ARN) o un nucleótido capaz de formar un enlace 2'-5' (nucleótido 2'5').

Tal como se utiliza aquí, el término "región dúplex" se refiere a la región en la molécula de doble cadena en la que dos oligonucleótidos complementarios o sustancialmente complementarios forman pares de bases entre sí, típicamente por emparejamiento de bases de Watson-Crick o por cualquier otra forma que permita una formación dúplex. Por ejemplo, una cadena de oligonucleótidos que tiene 19 unidades de nucleótidos puede formar un par de bases con un

5 oligonucleótido complementario de 19 unidades de nucleótidos, o puede formar un par de bases con 15, 16, 17 o 18 bases sobre cada cadena de tal manera que la "región dúplex" consiste en 15,16-17 o 18 pares de bases. Los pares de bases restantes pueden, por ejemplo, existir como excedentes 5' y 3'. Además, dentro de la región dúplex, no se requiere una complementariedad del 100%; se permite una complementariedad sustancial dentro de una región dúplex. La región excedente puede consistir en unidades estructurales nucleótidos o no nucleótidos. Como se divulga aquí, al menos una región excedente consiste en una o más unidades estructurales no nucleótidos.

10 Los patrones genéricos de moléculas de ácidos nucleicos no limitantes se muestran a continuación donde N'= nucleótido de cadena en sentido en la región dúplex; z '= unidad estructural de cobertura en 5' unida covalentemente en el terminal 5 'de la cadena en sentido, C3 = 3 unidades estructurales de carbono no nucleótido; N = nucleótido de cadena antisentido en la región dúplex; idB = unidad estructural nucleótido de desoxirribonucleótido abásico invertido. Cada N, N', está independientemente modificado o no modificado o una unidad estructural no convencional. Las cadenas en sentido y antisentido son cada una independientemente de 18-40 nucleótidos de longitud. Los ejemplos proporcionados a continuación tienen una región dúplex de 19 nucleótidos, sin embargo, las moléculas de ácido nucleico divulgadas aquí pueden tener una región dúplex en cualquier lugar entre 18 y 40 nucleótidos y donde cada
 15 cadena es independientemente de 18 y 40 nucleótidos de longitud. En cada dúplex la cadena antisentido (N)x se muestra en la parte superior. En algunas realizaciones una molécula de ácido nucleico de doble cadena tiene la siguiente estructura:

En realizaciones adicionales Z' está presente y comprende una combinación de uno o más nucleótidos y una o más unidades estructurales no nucleótido seleccionado entre las unidades estructurales divulgadas aquí.

5 En algunas realizaciones cada uno de Z y Z' incluye una unidad estructural abásica, opcionalmente desoxirriboabásica (denominado aquí como "dAb") o riboabásica (denominado aquí como "rAb"). En algunas realizaciones Z' es dAb-dAb o rAb-rAb.

10 En algunas realizaciones, cada uno de Z y/o Z' incluye, independientemente, una unidad estructural alquilo, opcionalmente un derivado fosfodiéster de unidad estructural modificado con propanodiol ((CH₂)₃-Pi, denominado aquí también como "C3Pi"). En algunas realizaciones Z y/o Z' son C3Pi-C3Pi. En una realización específica x=y=19 y Z comprende dos derivados de propanodiol, C3-C3 (es decir -C3-Pi-C3-Pi). En diversas realizaciones, la unidad estructural C3 está unida covalentemente al terminal 3' de la cadena en sentido o antisentido a través de un enlace fosfodiéster.

En realizaciones adicionales Z' es opcionalmente C3-rAb o C3-dAb.

15 En realizaciones adicionales relacionadas con la estructura A1 o A2, las moléculas de ácido nucleico comprenden además una modificación 2'-O-Me en el azúcar de ribonucleótidos en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19 de la cadena antisentido. En realizaciones adicionales, el compuesto también comprende un nucleótido de L-ADN en la posición 18 de la cadena en sentido. En realizaciones adicionales, el compuesto comprende un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace fosfato internucleótido 2'-5'. En realizaciones adicionales x=y=19 y los nucleótidos en las posiciones 15-19 o 16-19 o 17-19 en (N')y se unen a nucleótidos adyacentes mediante enlaces de fosfato internucleótidos 2'-5'. En algunas realizaciones x=y=19 y los nucleótidos en las posiciones 15-19 o 16-19 o 17-19 o 15-18 o 16-18 en (N')y se unen a los nucleótidos adyacentes mediante enlaces de fosfato internucleótidos 2'-5'.

20 De acuerdo con ciertas realizaciones, la invención proporciona un compuesto de ARNip que comprende además uno o más nucleótidos modificados, en donde el nucleótido modificado posee una modificación en la unidad estructural de azúcar, en la unidad estructural de base o en la unidad estructural de enlace internucleótido.

25 En algunas realizaciones (N)x comprende ribonucleótidos modificados y no modificados, teniendo cada ribonucleótido modificado un 2'-O-metilo en su azúcar, en donde N en el terminal 3' de (N)x es un ribonucleótido modificado, (N)x comprende al menos cinco ribonucleótidos modificados alternantes comenzando en el terminal 3' y al menos nueve ribonucleótidos modificados en total y cada N restante es un ribonucleótido no modificado.

30 En algunas realizaciones, al menos uno de (N)x y (N')y comprende al menos un nucleótido espejo. En algunas realizaciones en (N')y está presente al menos una unidad estructural no convencional, cuyo unidad estructural no convencional puede ser una unidad estructural ribosa abásico, una unidad estructural desoxirribosa abásico, un desoxirribonucleótido modificado o no modificado, un nucleótido espejo y un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace fosfato internucleótido 2'-5' , o cualquier otra unidad estructural no convencional divulgada aquí.

35 En algunas realizaciones, una unidad estructural no convencional es un nucleótido espejo de L-ADN; en realizaciones adicionales, al menos una unidad estructural no convencional está presente en las posiciones 15, 16, 17 o 18 en (N')y. En algunas realizaciones, la unidad estructural no convencional se selecciona de un nucleótido espejo, una unidad estructural ribosa abásico y una unidad estructural desoxirribosa abásico. En algunas realizaciones, la unidad estructural no convencional es un nucleótido espejo, preferiblemente una unidad estructural de L-ADN. En algunas realizaciones, la unidad estructural LADN está presente en la posición 17, en la posición 18 o en las posiciones 17 y 40 18.

En aún otras realizaciones (N')y comprende al menos cinco unidades estructurales ribosa abásicos o unidades estructurales de desoxirribosa abásico y al menos uno de N' es un LNA.

45 En algunas realizaciones (N)x comprende nueve ribonucleótidos modificados alternantes. En otras realizaciones (N)x comprende nueve ribonucleótidos modificados alternantes que comprenden además un nucleótido modificado 2' en la posición 2. En algunas realizaciones (N)x comprende ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones impares 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19. En otras realizaciones (N)x comprende además un ribonucleótido modificado con 2'OMe en una o ambas posiciones 2 y 18. En aún otras realizaciones (N)x comprende ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17, 19. En algunas realizaciones, al menos un nucleótido de pirimidina en (N)x comprende una modificación con azúcar 2'OMe. En algunas realizaciones, todos los nucleótidos de pirimidina en (N)x comprenden una modificación con azúcar 2'OMe. En algunas realizaciones, los nucleótidos de pirimidina 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 1'0, 11, 12, 13, 14, or 15 en N(x) comprenden una modificación con azúcar 2'OMe

En diversas realizaciones, z' está presente y se selecciona de una unidad estructural de ribosa abasico, una unidad estructural de desoxirribosa, una unidad estructural de ribosa abásico invertido, una unidad estructural de desoxirribosa, C6-amino-Pi, un nucleótido espejo.

- 5 En una realización de las moléculas de ácido nucleico (N')y comprende al menos dos nucleótidos en uno o ambos terminales 5' y 3' de (N')y se unen mediante un enlace fosfodiéster 2'-5'. En ciertas realizaciones $x=y=19$; en (N)x los nucleótidos alternan entre ribonucleótidos modificados y ribonucleótidos sin modificar, siendo modificado cada ribonucleótido modificado de manera que tenga un 2'-O-metilo en su azúcar y el ribonucleótido situado en el centro de (N)x no sea modificado; y tres nucleótidos en el terminal 3' de (N')y están unidos por dos enlaces 2'-5' fosfodiéster. En otras realizaciones, $x=y=19$; en (N)x los nucleótidos alternan entre ribonucleótidos modificados y ribonucleótidos sin modificar, modificándose cada ribonucleótido modificado de manera que tenga un 2'-O-metilo en su azúcar y el ribonucleótido situado en el centro de (N)x no sea modificado; y cuatro nucleótidos consecutivos en el terminal 5' de (N')y están unidos por tres enlaces fosfodiéster 2'-5'. En una realización adicional, un nucleótido adicional situado en la posición intermedia de (N)y puede ser modificado con 2'-O-metilo en su azúcar. En otra realización, en (N)x los nucleótidos alternan entre ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo y ribonucleótidos no modificados, y en (N')y cuatro nucleótidos consecutivos en el terminal 5' están unidos por tres fosfodiéster 2'-5' y el nucleótido terminal 5' o dos o tres nucleótidos consecutivos en el terminal 5' comprenden modificaciones con azúcar 3'-O-Me.

En ciertas realizaciones de la Estructura (A1), $x=y=19$ y en (N')y el nucleótido en al menos una posición comprende un nucleótido espejo, un desoxirribonucleótido y un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un nucleótido enlace internucleótido 2'-5';.

- 20 En ciertas realizaciones de Estructura (A1), $x=y=19$ y (N')y comprende un nucleótido espejo. En diversas realizaciones, el nucleótido espejo es un nucleótido de L-ADN. En ciertas realizaciones, el L-ADN es L-desoxirribocitidina. En algunas realizaciones (N')y comprende L-ADN en la posición 18. En otras realizaciones (N')y comprende L-ADN en las posiciones 17 y 18. En ciertas realizaciones (N')y comprende las sustituciones de L-ADN en las posiciones 2 y en una o ambas posiciones 17 y 18. Se contemplan otras realizaciones de Estructura (A1) en donde $x=y=21$ o donde $x=y=23$; en estas realizaciones las modificaciones para (N')y discutidas anteriormente en lugar de estar en las posiciones 15, 16, 17, 18 están en las posiciones 17, 18, 19, 20 para 21 mer y en las posiciones 19, 20, 21, 22 para 23 mer; de manera similar las modificaciones en una o ambas posiciones 17 y 18 están en una o ambas posiciones 19 o 20 para 21 mer y una o ambas posiciones 21 y 22 para 23 mer. Todas las modificaciones en el 19 mer se ajustan de manera similar para los 21 y 23 mers.

- 30 De acuerdo con diversas realizaciones de la Estructura A1 o A2 en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos en el terminal 3' en (N')y o N2-(N')y están unidos por enlaces inter-nucleótidos 2'-5'. En una realización, cuatro nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')y están unidos por tres enlaces fosfodiéster 2'-5', en los que uno o más de los nucleótidos 2'-5' que forman los enlaces fosfodiéster 2'-5' comprende además una modificación con azúcar 3'-O-metilo. Preferiblemente, el nucleótido terminal 3' de (N')y comprende una modificación con azúcar 2'-O-metilo. En ciertas realizaciones de la Estructura (A1), $x=y=19$ y en (N')y dos o más nucleótidos consecutivos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19 comprenden un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace internucleótido 2'-5'. En diversas realizaciones, el nucleótido que forma el enlace internucleótido 2'-5' comprende un nucleótido desoxirribosa 3' o un nucleótido metoxi 3'. En algunas realizaciones, los nucleótidos en las posiciones 17 y 18 en (N')y están unidos por un enlace internucleótido 2'-5'. En otras realizaciones, los nucleótidos en las posiciones 16, 17, 18, 16-17, 17-18, o 16-18 en (N')y están unidos por un enlace internucleótido 2'-5'.

En ciertas realizaciones (N')y comprende un L-ADN en la posición 2 y enlaces internucleótidos 2'-5' en las posiciones 16, 17, 18, 16-17, 17-18 o 16-18. En ciertas realizaciones (N')y comprende enlaces internucleótidos 2'-5' en las posiciones 16, 17, 18, 16-17, 17-18 o 16-18 y un nucleótido de cobertura terminal 5'.

- 45 En una realización de las moléculas de ácido nucleico, el nucleótido terminal 3' o dos o tres nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')y son L-desoxirribonucleótidos.

- En otras realizaciones, las moléculas de ácido nucleico, en (N')y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos en cualquiera de los nucleótidos terminales o 2-8 modificados en cada uno de los terminales 5' y 3' son independientemente nucleótidos modificados con azúcar en 2'. En algunas realizaciones la modificación con azúcar en 2' comprende la presencia de una unidad estructural amino, flúor, alcoxi o alquilo. En ciertas realizaciones la modificación con azúcar en 2' comprende una unidad estructural metoxi (2'-OMe).

- 50 En una realización, tres, cuatro o cinco nucleótidos consecutivos en el terminal 5' de (N')y comprenden la modificación con 2'-OMe. En otra realización, tres nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')y comprenden la modificación con azúcar 2'-O-Me.

- 55 En algunas realizaciones de la Estructura A1 o A2 en (N')y o N2-(N')y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 ribonucleótidos consecutivos en o bien 2-8 nucleótidos modificados en cada uno de los terminales 5' y 3' son,

independientemente, nucleótidos bicíclicos. En diversas realizaciones, el nucleótido bicíclico es un ácido nucleico bloqueado (LNA). Un ácido nucleico puenteado con 2'-O, 4'-C-etileno (ENA) es una especie de LNA (véase más adelante).

5 En diversas realizaciones (N')y o N2-(N')y comprende nucleótidos modificados en el terminal 5' o en los dos terminales 3' y 5'.

10 En algunas realizaciones de la Estructura A1 o A2, al menos dos nucleótidos en uno o ambos terminales 5' y 3' de (N')y están unidos por modificaciones de la estructura P-etoxi. En ciertas realizaciones $x=y=19$ o $x=y=23$; en (N)x los nucleótidos alternan entre ribonucleótidos modificados y ribonucleótidos sin modificar, siendo modificado cada ribonucleótido modificado de tal manera que tenga un 2'-O-metilo sobre su azúcar y el ribonucleótido situado en la posición media de (N)x no modificado; y cuatro nucleótidos consecutivos en el terminal 3' o en el terminal 5' de (N')y están unidos por tres modificaciones de la estructura P-etoxi. En otra realización, tres nucleótidos consecutivos en el terminal 3' o en el terminal 5' de (N')y están unidos por dos modificaciones de la estructura p-etoxi.

15 En algunas realizaciones de la Estructura A1 o A2 en (N')y o N2-(N')y 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, los ribonucleótidos consecutivos en cada uno de los terminales 5' y 3' son independientemente nucleótidos espejo, nucleótidos unidos por enlace fosfodiéster 2'-5', nucleótidos modificados con azúcar 2' o nucleótidos bicíclicos. En una realización, la modificación en los terminales 5' y 3' de (N')y es idéntica. En una realización, cuatro nucleótidos consecutivos en el terminal 5' de (N')y están unidos por tres enlaces fosfodiéster 2'-5' y tres nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')y están unidos por dos enlaces 2'-5' fosfodiéster. En otra realización, la modificación en el terminal 5' de (N')y es diferente de la modificación en el terminal 3' de (N')y. En una realización, los nucleótidos modificados en el terminal 5' de (N')y son nucleótidos espejo y los nucleótidos modificados en el terminal 3' de (N')y se unen por enlace fosfodiéster 2'-5'. En otra realización específica, tres nucleótidos consecutivos en el terminal 5' de (N')y son nucleótidos de LNA y tres nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')y están unidos por dos enlaces fosfodiéster 2'-5'. En (N)x los nucleótidos alternan entre ribonucleótidos modificados y ribonucleótidos sin modificar, modificándose cada ribonucleótido modificado de manera que tenga un 2'-O-metilo sobre su azúcar y el ribonucleótido situado en el centro de (N)x no sea modificado, o estando los ribonucleótidos en (N)x no modificados

20 En otra realización de la Estructura A1, la invención proporciona un compuesto en el que $x=y=19$; en (N)x los nucleótidos alternan entre ribonucleótidos modificados y ribonucleótidos sin modificar, modificándose cada ribonucleótido modificado de manera que tenga un 2'-O-metilo en su azúcar y el ribonucleótido situado en el centro de (N)x no sea modificado; tres nucleótidos en el terminal 3' de (N')y están unidos por dos enlaces fosfodiéster 2'-5' y tres nucleótidos en el terminal 5' de (N')y son LNA tales como ENA; y Z y/o Z' comprenden independientemente una o más unidades estructurales no nucleótido seleccionadas entre el grupo que consiste en una unidad estructural abásica, una unidad estructural abásica invertida, una unidad estructural de hidrocarburo, y un fosfato inorgánico, o una combinación de una o más unidades estructurales no nucleótidos nucleótidos y uno o más nucleótidos. En algunas realizaciones Z se selecciona de C3Pi-C3Pi, C3Pi-C3OH; C3Pi-rAb y C3Pi-dAb.

35 En otra realización, cinco nucleótidos consecutivos en el terminal 5' de (N')y o N2-(N')y comprenden la modificación con azúcar 2'-O-meiloy dos nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')y son L ADN.

40 De acuerdo con otras realizaciones en (N')y o N2-(N')y el nucleótido terminal 5' o 3', o 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos consecutivos en cualquiera de los terminales o 1-4 nucleótidos modificados en cada uno de los terminales 5' y 3' son, independientemente, nucleótidos de fosfonocarboxilato o fosfinocarboxilato (nucleótidos PACE). En algunas realizaciones, los nucleótidos PACE son desoxirribonucleótidos. En algunas realizaciones en (N')y o N2-(N')y, 1 o 2 nucleótidos consecutivos en cada uno de los terminales 5' y 3' son nucleótidos PACE. Ejemplos de nucleótidos y análogos de PACE se divulgan en las Patentes US Nos. 6,693,187 y 7,067,641.

45 En una realización de Estructura (A1), $x=y=19$; (N)x comprende ribonucleótidos no modificados en los que dos nucleótidos consecutivos unidos por un enlace internucleótido 2'-5' en el terminal 3'; (N')y comprende ribonucleótidos no modificados en los que dos nucleótidos consecutivos unidos por un enlace internucleótido 2'-5' en el terminal 5'; y Z' comprende una o más unidades estructurales no nucleótidos seleccionado entre el grupo que consiste de una unidad estructural abásica, una unidad estructural abásica invertida, una unidad estructural de hidrocarburo y un fosfato inorgánico, o una combinación de una o más unidades estructurales no nucleótidos y uno o más nucleótidos, y Z se selecciona de C3Pi-C3Ps; C3Pi-C3OH; C3Pi-C3Pi; C3Pi-rAb and C3Pi-dA, cada C3, rAb, dAb unido covalentemente al C3Pi, rAb, dAb adyacente a través de un enlace a base de fosfato. En algunas realizaciones, el enlace a base de fosfato es un enlace fosfodiéster o un enlace fosforotiofosfato.

50 En algunas realizaciones, $x=y=19$; (N)x comprende ribonucleótidos no modificados en los que tres nucleótidos consecutivos en el terminal 3' están unidos entre sí por dos enlaces fosfodiéster 2'-5'; (N')y comprende ribonucleótidos no modificados en los que cuatro nucleótidos consecutivos en el terminal 5' están unidos entre sí por tres enlaces fosfodiéster 2'-5'; y Z' comprende una o más unidades estructurales no nucleótidos seleccionados entre el grupo

- constituido por una unidad estructural abásica, una unidad estructural abásica invertida, una unidad estructural de hidrocarburo y un fosfato inorgánico, o una combinación de una o más unidades estructurales no nucleótidos y uno o más nucleótidos, y Z se selecciona de C3Pi-C3Ps; C3Pi-C3OH; C3Pi-C3Pi; C3Pi-rAb y C3PidAb en donde cada C3Pi, rAb, dAb unido covalentemente al C3Pi, rAb, dAb adyacente a través de un enlace a base de fosfato. En algunas realizaciones, el enlace a base de fosfato es un enlace fosfodiéster o un enlace fosfortiofosfato.
- De acuerdo con una realización de la Estructura A1 o A2, cuatro nucleótidos consecutivos en el terminal 5' de (N')y (N')y-N2, respectivamente, están unidos por tres enlaces fosfodiéster 2'-5'; tres nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')x están unidos por dos enlaces fosfodiéster 2'-5'; y Z' comprende una o más unidades estructurales no nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en una unidad estructural abásica, una unidad estructural abásica invertida, una unidad estructural de hidrocarburo, y un fosfato inorgánico, o una combinación de una o más unidades estructurales no nucleótidos y uno o más nucleótidos, y Z se selecciona de C3Pi-C3Ps; C3Pi-C3OH; C3Pi-C3Pi; C3Pi-rAb; C3Pi-dAb y C3-dAb. Tres nucleótidos en el terminal 5' de (N')y y dos nucleótidos en el terminal 3' de (N')x también pueden comprender modificaciones con azúcar 3'-O-Me.
- En una realización de la Estructura A1 o A2, cinco nucleótidos consecutivos en el terminal 5' de (N')y o (N')y-N2, comprenden respectivamente la modificación con azúcar 2'-O-Me y cinco nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')x comprenden la modificación con azúcar 2'-O-Me. En otra realización, diez nucleótidos consecutivos en el terminal 5' de (N')y comprenden la modificación con azúcar 2'-O-Me y cinco nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')x comprenden la modificación con azúcar 2'-O-Me. En otra realización, trece nucleótidos consecutivos en el terminal 5' de (N')y comprenden la modificación con azúcar 2'-O-Me; cinco nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')x comprenden la modificación con azúcar 2'-O-Me; y Z' comprende una o más unidades estructurales no nucleótidos seleccionados entre el grupo constituido por una unidad estructural abásica, una unidad estructural abásica invertida, una unidad estructural de hidrocarburo y un fosfato inorgánico, o una combinación de una o más unidades estructurales no nucleótidos y uno o más nucleótidos, y Z se selecciona de C3Pi-C3Ps; C3Pi-C3OH; C3Pi-C3Pi; C3Pi-rAb y C3Pi-dAb.
- En realizaciones específicas cinco nucleótidos consecutivos en el terminal 5' de (N')y (N')y-N2, respectivamente, comprenden la modificación con azúcar 2'-O-Me y dos nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')y son L-ADN. Además, el compuesto puede comprender además cinco nucleótidos consecutivos modificados con 2'-O-metilo en el terminal 3' de (N')x y Z' puede comprender una o más unidades estructurales no nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en una unidad estructural abásica, una unidad estructural abásica invertida, una unidad estructural de hidrocarburo, y un fosfato inorgánico, o una combinación de una o más unidades estructurales no nucleótidos y uno o más nucleótidos; y Z se selecciona de C3Pi-C3Ps; C3Pi-C3OH; C3Pi-C3Pi; C3Pi-rAb y C3Pi-dAb.
- En diversas realizaciones de la Estructura A1 o A2 los nucleótidos modificados en (N)x son diferentes de los nucleótidos modificados en (N')y. Por ejemplo, los nucleótidos modificados en (N)x son nucleótidos modificados con azúcar 2' y los nucleótidos modificados en (N')y son nucleótidos unidos por enlaces internucleótidos 2'-5'. En otro ejemplo, los nucleótidos modificados en (N)x son nucleótidos espejo y los nucleótidos modificados en (N')y son nucleótidos unidos por enlaces internucleótidos 2'-5'. En otro ejemplo, los nucleótidos modificados en (N)x son nucleótidos unidos por enlaces internucleótidos 2'-5' y los nucleótidos modificados en (N')y son nucleótidos espejo.
- En algunos aspectos divulgados aquí es un compuesto que tiene una estructura expuesta a continuación:
- (X1) 5' (N)x - Z 3' (cadena antisentido)
- 3' Z'-(N')y-z' 5' (cadena en sentido)
- en donde cada uno de N y N' es un ribonucleótido que puede estar no modificado o modificado, o es una unidad estructural no convencional;
- en donde cada uno de (N)x y (N')y es un oligonucleótido en el que cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' mediante un enlace covalente;
- en donde Z consiste en dos unidades estructurales no nucleótidos, o una combinación de una unidad estructural no nucleótido y un nucleótido;
- en donde Z' puede estar presente o estar ausente pero si está presente comprende una unidad estructural no nucleótido;
- en donde z" puede estar presente o estar ausente pero si está presente es una unidad estructural de cubrimiento unida covalentemente en el terminal 5' de (N')y ;
- en donde cada uno de x y y es independientemente un entero de 18 a 27;

en donde (N')y comprende al menos un nucleótido espejo en la posición 3' o penúltima posición 3'; y

en donde la secuencia de (N)x comprende una secuencia antisentido con un gen de mamífero.

En algunos aspectos $x=y=19$.

5 En algunos aspectos, los nucleótidos espejo se seleccionan entre una unidad estructural L-ADN y una unidad estructural L-ARN. En algunos aspectos, el nucleótido espejo es una unidad estructural de L-ADN. En algunos aspectos, bien sea Z o Z' está presente y comprende una unidad estructural abásica o unidad estructural de hidrocarburo o una combinación de los mismos. En algunos aspectos Z' está ausente, Z está presente y comprende una unidad estructural hidrófoba.

10 En algunos aspectos, los nucleótidos espejo se seleccionan entre una unidad estructural de L-ADN y una unidad estructural de L-ARN. En algunos aspectos, el nucleótido espejo es una unidad estructural de L-ADN.

En algunos aspectos N'(y) comprende dos o tres nucleótidos espejo en el terminal 3', y N(x) comprende opcionalmente al menos un nucleótido espejo en el terminal 3'.

15 En algunos aspectos N'(y) comprende dos nucleótidos espejo en la penúltima posición 3'. En algunos aspectos N(x) comprende uno o dos nucleótidos espejo en la penúltima posición 3' y N'(y) opcionalmente comprende además uno o dos nucleótidos espejo en la penúltima posición 5'. En algunos aspectos (N')y comprende un nucleótido espejo en el terminal 5' o la penúltima posición 5'.

20 En algunos aspectos (N)x comprende ribonucleótidos modificados con azúcar 2'OMe. En algunos aspectos (N)x comprende ribonucleótidos de pirimidina modificados con azúcar 2'OMe. En algunos aspectos (N)x comprende ribonucleótidos modificados con azúcar 2'OMe alternando con ribonucleótidos no modificados. En algunos aspectos $x=y=19$ y (N)x comprende ribonucleótidos modificados con azúcar 2'OMe en posición (5' > 3') 3, 5 y 11, 13, 15, 17 y 19. En algunos aspectos (N)x comprende además un nucleótido espejo o un nucleótido 2'5' en las posiciones 6 o 7.

En algunos aspectos la secuencia de (N)x tiene complementariedad con la secuencia de (N')y; y la secuencia de (N')y tiene identidad con una secuencia dentro de un ARNm codificado por un gen diana.

En otro aspecto divulgado aquí es un compuesto que tiene la estructura expuesta a continuación:

25 (X2) 5' (N)x - Z 3' (cadena antisentido)

3' Z'-(N')y-z" 5' (cadena en sentido)

en donde cada uno de N y N' es un ribonucleótido que puede estar no modificado o modificado, o es una unidad estructural no convencional;

30 en donde cada uno de (N)x y (N')y es un oligonucleótido en el que cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' mediante un enlace covalente;

en donde Z consiste en dos unidades estructurales no nucleótidos, o una combinación de una unidad estructural no nucleótido y un nucleótido;

en donde Z' puede estar presente o estar ausente pero si está presente comprende una unidad estructural no nucleótido;

35 en donde z" puede estar presente o estar ausente pero si está presente es una unidad estructural de cubrimiento unido covalentemente en el terminal 5' de (N')y;

en donde cada uno de x y y es independientemente un entero de 18 a 27;

en donde (N')y comprende al menos una o más pirimidinas modificadas con 2'OMe y

en donde la secuencia de (N)x comprende una secuencia antisentido con un gen de mamífero.

40 En algunos aspectos $x=y=19$.

En algunos aspectos están presentes bien sea Z o Z' . En algunos aspectos están presentes tanto Z como Z'. En algunos aspectos Z' está ausente, Z está presente y comprende una unidad estructural hidrófoba.

45 En algunos aspectos (N)x comprende ribonucleótidos modificados con azúcar 2'OMe. En algunos aspectos (N)x comprende ribonucleótidos de pirimidina modificados con azúcar 2'OMe. En algunos aspectos (N)x comprende ribonucleótidos modificados con azúcar 2'OMe alternando con ribonucleótidos no modificados. En algunos aspectos

y (N')y son fosforilados en los terminales 3' usando grupos fosfato no escindibles. En aún otro aspecto, uno o ambos (N)x y (N')y se fosforilan en la posición terminal 2' usando grupos fosfato escindibles o no escindibles.

5 Para todas las estructuras mencionadas anteriormente, Z está presente. En realizaciones adicionales, tanto Z como Z' están presentes. En algunas realizaciones Z y Z' están presentes y son idénticos. En realizaciones adicionales Z y Z' están presentes y son diferentes. En algunas realizaciones, Z' representa 1, 2, 3, 4 o 5 unidades estructurales no nucleótidos, o una combinación de una unidad estructural no nucleótido y un nucleótido.

En algunas realizaciones, Z está presente y comprende una o más unidades estructurales no nucleótidos seleccionados entre una unidad estructural abásica, una unidad estructural abásica invertida, una unidad estructural de hidrocarburo tal como (CH₂)₃ y una unidad estructural de fosfato inorgánico.

10 En algunas realizaciones, Z' comprende uno o dos unidades estructurales no nucleótidos y comprende además un nucleótido.

En algunas realizaciones, Z y/o Z' comprenden unidades estructurales abásicas, opcionalmente desoxirriboabásicas (denominadas aquí como "dAb") o unidades estructurales ribobásicas (denominados aquí como "rAb"). En algunas realizaciones Z' es dAb-dAb o rAb-rAb.

15 En algunas realizaciones Z y/o Z' comprenden una o más unidades estructurales de hidrocarburo, opcionalmente (CH₂)₃-Pi (denominado aquí "C3Pi"). En algunas realizaciones Z y/o Z' es C3Pi-C3Ps; C3Pi-C3OH; o C3Pi-C3Pi.

En realizaciones adicionales Z y/o Z' son opcionalmente C3Pi-rAb. En una realización particular sólo Z está presente y es C3Pi-C3Ps; C3Pi-C3OH; C3Pi-C3Pi.

20 En las realizaciones de las Estructuras antes mencionadas, el compuesto comprende al menos un excedente de 3' (Z y o Z') que comprende al menos una unidad estructural no nucleótido. Z y Z' comprenden independientemente una unidad estructural no nucleótido y uno o más nucleótidos modificados o no modificados unidos covalentemente o unidad estructural no convencional, por ejemplo dT invertido o dA; dT, LNA, nucleótido espejo y similares. El ARNip en el que Z y/o Z' está presente tiene actividad y/o estabilidad mejoradas y/o actividad fuera de diana y/o respuesta inmune reducida cuando se compara con un ARNip en el que Z y/o Z' están ausentes o en los que Z y/o Z' es dTdT.

25 En ciertas realizaciones para todas las Estructuras mencionadas anteriormente, el compuesto comprende uno o más nucleótidos de fosfonocarboxilato y/o fosfinocarboxilato (nucleótidos PACE). En algunas realizaciones, los nucleótidos PACE son desoxirribonucleótidos y los nucleótidos de fosfinocarboxilato son nucleótidos de fosfinoacetato. Ejemplos de nucleótidos y análogos de PACE se describen en las Patentes US No. 6,693,187 y 7,067,641.

30 En ciertas realizaciones para todas las estructuras mencionadas anteriormente, el compuesto comprende uno o más ácidos nucleicos bloqueados (LNA) también definidos como ácidos nucleicos puenteados o nucleótidos bicíclicos. Ejemplos de ácidos nucleicos bloqueados incluyen 2'-O, 4'-C-etilen nucleósidos (ENA) o 2'-O,4'-C-metilen nucleósidos. Otros ejemplos de nucleótidos LNA y ENA se divulgan en los documentos WO 98/39352, WO 00/47599 y WO 99/14226.

35 En ciertas realizaciones para todas las Estructuras mencionadas anteriormente, el compuesto comprende uno o más monómeros de alritol (nucleótidos), también definidos como 1,5 anhidro-2-desoxi-D-alritro-hexitol (véase, por ejemplo, Allart, et al., 1998. Nucleosides & Nucleótidos 17:1523-1526; Herdewijn et al., 1999. Nucleosides & Nucleótidos 18:1371-1376; Fisher et al., 2007, NAR 35(4):1064-1074).

40 La presente invención excluye explícitamente los compuestos de doble cadena en los que cada uno de N y/o N' es un desoxirribonucleótido (dA, dC, dG, dT). En ciertas realizaciones (N)x y (N')y pueden comprender independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más desoxirribonucleótidos.

45 En ciertas realizaciones se proporciona aquí un compuesto en el que cada uno de N es un ribonucleótido no modificado y el nucleótido terminal 3' o nucleótidos consecutivos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 en el terminal 3' de (N')y son desoxirribonucleótidos. En aún otras realizaciones, cada uno de N es un ribonucleótido no modificado y el nucleótido terminal 5' o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 nucleótidos consecutivos en el terminal 5' de (N')y son desoxirribonucleótidos. En realizaciones adicionales, el nucleótido terminal 5' o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 nucleótidos consecutivos en el terminal 5' y 1, 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N)x son desoxirribonucleótidos y cada uno de N' es un ribonucleótido no modificado. En aún realizaciones adicionales (N)x comprende ribonucleótidos no modificados y 1 o 2, 3 o 4 desoxirribonucleótidos consecutivos independientemente en cada uno de los terminales 5' y 3' y 1 o 2, 3, 4, 5 o 6 desoxirribonucleótidos consecutivos en posiciones internas; y

50 cada uno de N' es un ribonucleótido no modificado. En ciertas realizaciones, el nucleótido terminal 3 o nucleótidos consecutivos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 13 o 14 en el terminal 3' de (N')y el nucleótido terminal 5' o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 13 o 14 nucleótidos consecutivos en el terminal 5' de (N)x son desoxirribonucleótidos. En algunas

realizaciones el nucleótido terminal 5' de N o 2 o 3 consecutivos de N y 1,2, o 3 de N' es un desoxirribonucleótido. Ciertos ejemplos de quimeras de ARNip de ADN/ARN activo se divulgan en la publicación de patente US 2005/0004064 y Ui-Tei, 2008 (NAR 36 (7): 2136-2151).

5 Un enlace covalente se refiere a un enlace internucleótido que une un nucleótido monómero con un monómero nucleótido adyacente. Un enlace covalente incluye, por ejemplo, un enlace fosfodiéster, un enlace fosforotioato, un enlace P-alcoxi, un enlace P-carboxilo y similares. El enlace internucleósido normal de ARN y ADN es un enlace fosfodiéster en 3' a 5'. En ciertas realizaciones, un enlace covalente es un enlace fosfodiéster. El enlace covalente abarca enlaces internucleósidos que no contienen fósforo, tales como los divulgados en el documento WO
10 2004/041924, entre otros. A menos que se indique otra cosa, en realizaciones de las estructuras discutidas aquí, el enlace covalente entre cada N o N' consecutivos es un enlace fosfodiéster.

Para todas las estructuras anteriores, en algunas realizaciones la secuencia oligonucleótido de (N)_x es completamente complementaria a la secuencia oligonucleótido de (N')_y. En otras realizaciones (N)_x y (N')_y son sustancialmente complementarios. En ciertas realizaciones (N)_x es totalmente complementario a una secuencia diana. En otras realizaciones (N)_x es sustancialmente complementario a una secuencia diana.

15 Definiciones

Por conveniencia, se describen aquí ciertos términos empleados en la especificación, ejemplos y reivindicaciones.

Debe tenerse en cuenta que, tal como se utilizan aquí, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen formas plurales a menos que el contenido indique claramente otra cosa.

20 Cuando se describen aspectos o realizaciones de la invención en términos de grupos de Markush u otro grupo de alternativas, los expertos en la técnica reconocerán que la invención también se describe de este modo en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo.

Lo que se denomina aquí como la "en sentido " o "cadena en sentido" o "cadena pasajera" de un compuesto ARNip de doble cadena o dúplex, se refiere a un oligonucleótido que tiene identidad con un ácido nucleico diana, por ejemplo ARN diana que incluye ARNm diana. Lo que se hace referencia aquí como "antisentido" o "cadena antisentido" o
25 "cadena guía" se refiere a un oligonucleótido que tiene complementariedad con un ácido nucleico diana, por ejemplo ARNm diana. Sin pretender estar ligado a la teoría, el antisentido, o cadena guía, se incorpora en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) y dirige el silenciamiento de genes posttranscriptional, que se produce cuando los pares de bases de cadena guía con una secuencia complementaria de una molécula de ARN mensajero y media la escisión del ARNm por Argonaute, el componente catalítico del complejo RISC.

30 Un "polipéptido proapoptótico" se refiere a un polipéptido codificado por cualquiera de los genes enumerados anteriormente, incluyendo variantes de empalme, isoformas, ortólogos o parálogos y similares.

Un inhibidor es un compuesto que es capaz de reducir la expresión de un gen o la actividad del producto de tal gen en una extensión suficiente para conseguir un efecto biológico o fisiológico deseado. El término "inhibidor", tal como se utiliza aquí, se refiere a uno o más de un inhibidor de oligonucleótidos, incluyendo siARN, shARN, miARN y
35 ribozimas. La inhibición también puede denominarse como subregulación o, para ARNi, silenciamiento.

El término "inhibir", tal como se utiliza aquí, se refiere a la reducción de la expresión de un gen o la actividad del producto de tal gen en una extensión suficiente para conseguir un efecto biológico o fisiológico deseado. La inhibición puede ser completa o parcial.

40 Como se usa aquí, los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" pueden usarse indistintamente y se refieren a secuencias de nucleótidos que comprenden ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). Los términos también deben entenderse que incluyen, como equivalentes, análogos de ARN o ADN hechos a partir de análogos de nucleótidos. A lo largo de esta solicitud, las secuencias de ARNm se exponen como representando el objetivo de sus genes correspondientes. Los términos "secuencia polinucleótido de ARNm" y ARNm se usan indistintamente.

45 "Oligonucleótido" u "oligómero" se refiere a una secuencia de desoxirribonucleótido o ribonucleótido de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 nucleótidos. Cada nucleótido de ADN o ARN puede ser independientemente natural o sintético, y o modificado o no modificado. Las modificaciones incluyen cambios en la unidad estructural de azúcar, la unidad estructural base y/o los enlaces entre nucleótidos en el oligonucleótido. Los compuestos aquí divulgados abarcan moléculas que comprenden desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos modificados, ribonucleótidos modificados y combinaciones de los mismos. Como se usa en el
50 presente documento, los términos "análogo de nucleótido que no se empareja" significan un análogo de nucleótidos que comprende una unidad estructural de emparejamiento no base que incluye pero no se limita a: 6 desamino adenosina (Nebularina), 4 Me-indol, 3-nitropirrol, 5-nitroindol, Ds, Pa, N3-Me ribo U, N3-Me riboT, N3-Me dC, N3-Me-

dT, N1-Me-dG, N1-Me-dA, N3-ethyl-dC, N3-Me dC,. En algunas realizaciones, el análogo de nucleótidos de emparejamiento no base es un ribonucleótido. En otras realizaciones es un desoxirribonucleótido.

Se proporcionan aquí composiciones para uso en métodos para inhibir la expresión de un gen diana in vivo. En general, el método incluye la administración de oligorribonucleótidos, en particular ARNs de interferencia pequeña (es decir, ARNip) o un material de ácido nucleico que genera ARNip en una célula, para dirigir un ARNm de mamífero en una cantidad suficiente para subregular la expresión de un gen diana por un mecanismo de interferencia de ARN. En particular, el método es útil para inhibir la expresión del gen para el tratamiento de un sujeto que sufre de una enfermedad relacionada con la expresión de ese gen. Como se divulga aquí, las moléculas de ARNip o inhibidores del gen diana se usan como fármacos para tratar diversas patologías.

10 "Compuesto de siARN" y "molécula de ácido nucleico" se pueden usar indistintamente aquí.

"Nucleótido" pretende abarcar un compuesto que consiste en un nucleósido (un azúcar, usualmente ribosa o desoxirribosa, y una base de purina o pirimidina) y un enlazador fosfo; tal como un desoxirribonucleótido y un ribonucleótido, que pueden ser naturales o sintéticos, y estar modificados o no modificados. Las modificaciones incluyen cambios y sustituciones de la unidad estructural de azúcar, la unidad estructural base y/o de los enlaces internucleótidos.

Una unidad estructural "basado en fosfato" incluye fosfato inorgánico (Pi) y fosforotioato (Ps).

Pueden emplearse todos los análogos de, o modificaciones a, un nucleótido/oligonucleótido con las moléculas divulgadas aquí, siempre que dicho análogo o modificación no afecte sustancialmente de manera adversa la función del nucleótido/oligonucleótido. Las modificaciones aceptables incluyen modificaciones de la unidad estructural de azúcar, modificaciones de la unidad estructural base, modificaciones en los enlaces internucleótidos y combinaciones de los mismos.

A lo que a veces se hace referencia como un "nucleótido abásico" o "análogo de nucleótido abásico" se denomina más bien un pseudonucleótido o una unidad estructural no convencional. Un nucleótido es una unidad monomérica de ácido nucleico, que consiste en un azúcar ribosa o desoxirribosa, un fosfato y una base (adenina, guanina, timina o citosina en el ADN, adenina, guanina, uracilo o citosina en el ARN). Un nucleótido modificado comprende una modificación en uno o más de los azúcares, fosfatos y/o bases. El pseudonucleótido abásico carece de una base, y por lo tanto no es estrictamente un nucleótido. La unidad estructural desoxirribosa abásico incluye, por ejemplo, desoxirribosa-3'-fosfato abásico; 1,2-didesoxi-D-ribofuranosa-3-fosfato; 1,4-anhidro-2-desoxi-D-ribitol-3-fosfato. La unidad estructural desoxirribosa abásico invertido incluye desoxirriboabásico invertido; 3',5' desoxiabásico invertido 5'-fosfato. En general, una unidad estructural abásica invertida está unida covalentemente a un nucleótido terminal 3' a través de un enlace 3'-3'; una unidad estructural abásica invertida está unida covalentemente a un nucleótido terminal 5' a través de un enlace 5'-5'; una unidad estructural abásica invertida está unida de manera general covalentemente a una unidad estructural abásica invertida a través de un enlace 5'-3'.

El término "unidad estructural de cubrimiento" (z) tal como se usa aquí incluye una unidad estructural que puede estar unida covalentemente al terminal 5' de (N')y que incluye una unidad estructural de ribosa abásico, una unidad estructural de desoxirribosa abásico, ribosa abásico modificado y unidades estructurales de desoxirribosa abásicos incluyendo modificaciones de 2' O alquilo, ribosa abásica invertido y unidades estructurales de desoxirribosa abásico y sus modificaciones, C6-imino-Pi, un nucleótido espejo que incluye L-ADN y L-ARN, 5'OMe nucleótido y análogos de nucleótidos que incluyen 4',5'-nucleótido de metileno, nucleótido de 1-(β-D-eritrofuranosilo), nucleótido 4'-tio, nucleótido carbocíclico, fosfato de 5'-amino-alquilo, fosfato de 1,3-diamino-2-propilo, fosfato de 3-aminopropilo, fosfato de 6-aminohexilo; fosfato de 12-aminododecilo, fosfato de hidroxipropilo, nucleótido de 1,5-anhidrohexitol, alfa-nucleótido, nucleótido de treo-pentofuranosilo, nucleótido de 3',4'-seco acíclico, nucleótido de 3,4-dihidroxibutilo, nucleótido de 3,5-dihidroxipentilo, unidad estructural 5'-5'-abásico invertido, fosfato de 1,4-butanodiol, 5'-amino y metilfosfonato puente y no puente y las unidades estructurales 5'-mercapto.

Ciertas unidades estructurales de cubrimiento son unidades estructurales de ribosa abasicos o desoxirribosa abásicos; ribosa abásica invertida o unidades estructurales de desoxirribosa abásicos; C6-amino-Pi; un nucleótido espejo que incluye L-ADN y L-ARN. Los compuestos de la presente invención pueden sintetizarse utilizando uno o más nucleótidos invertidos, por ejemplo timidina invertida o adenina invertida (por ejemplo, véase Takei et al., 2002. JBC 277 (26): 23800-06.

El término "unidad estructural no nucleótido" se refiere a una unidad estructural que no es un nucleótido, es decir, no incluye todos los componentes de un nucleótido: un azúcar. una base y un enlazante.

El término "unidad estructural no convencional" tal como se utiliza aquí se refiere a las unidades estructurales no nucleótidos que incluyen una unidad estructural abásica, una unidad estructural abásica invertida, una unidad estructural de hidrocarburo (alquilo) y un fosfato inorgánico e incluye además un desoxirribonucleótido, un

- desoxirribonucleótido modificado, un nucleótido espejo (L-ADN o L-ARN), un análogo de nucleótido de emparejamiento no base y un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace fosfato internucleótido 2'-5' (también conocido como nucleótido 2'5'); ácidos nucleicos puenteados que incluyen LNA y ácidos nucleicos puenteados con etileno, modificados por enlace (por ejemplo, PACE) y nucleótidos modificados en la base así como unidades estructurales adicionales explícitamente divulgadas aquí como unidades estructurales no convencionales.
- 5 Cuando se usa en referencia a los excedentes, una "unidad estructural alquilo" o una "unidad estructural de hidrocarburo" se refiere a una unidad estructural alquilo C2, C3, C4, C5 o C6 de cadena lineal o ramificada, incluyendo por ejemplo C2 (etilo), C3 (propil) . Cuando se utiliza en referencia a los excedentes, un "derivado" de una unidad estructural alquilo o hidrocarburo se refiere a una unidad estructural alquilo C2, C3, C4, C5 o C6 de cadena lineal o
- 10 ramificada que comprende un grupo funcional que puede seleccionarse entre, inter alia, alcoholes, fosfodiéster, fosforotioato, fosfonoacetato, aminas, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas y aldehídos.
- Cuando se utiliza en referencia a la modificación de la unidad estructural ribosa o desoxirribosa, se pretende que el término "alquilo" incluya estructuras de hidrocarburo saturadas lineales, ramificadas o cíclicas y combinaciones de las mismas. "Alquilo inferior", cuando se usa en referencia a la modificación de la unidad estructural ribosa o desoxirribosa,
- 15 se refiere específicamente a grupos alquilo de 1 a 6 átomos de carbono. Ejemplos de grupos alquilo inferiores incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, s- y t-butilo, y similares. Los grupos alquilo preferidos son los de C20 o menos. Cicloalquilo es un subconjunto de alquilo e incluye grupos hidrocarburo saturados cíclicos de 3 a 8 átomos de carbono. Ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen c-propilo, c-butilo, c-pentilo, norbornilo, adamantilo y similares
- "Grupo funcional terminal" incluye grupos halógeno, alcohol, amina, carboxílico, éster, amida, aldehído, cetona, éter.
- 20 En el contexto de la presente invención, un nucleótido "espejo" (también denominado Spiegelmer) es un análogo de nucleótidos con quiralidad inversa al nucleótido de origen natural o comúnmente empleado, es decir, una imagen espejo del nucleótido de origen natural o comúnmente empleado. El nucleótido espejo es un ribonucleótido (L-ARN) o un desoxirribonucleótido (L-ADN) y puede comprender además al menos una modificación de azúcar o base y/o una modificación de esqueleto, tal como una unidad estructural fosforotioato o fosfonato. La Patente US No. 6,602,858
- 25 divulga catalizadores de ácido nucleico que comprenden al menos una sustitución de L-nucleótido. El nucleótido espejo incluye, por ejemplo, L-ADN (L-desoxirriboadenosina-3'-fosfato (espejo dA), L-desoxirribocitidina-3'-fosfato (espejo dC), L-desoxirriboguanosina-3'-fosfato (espejo dG); desoxirribotimidina-3'-fosfato (imagen espejo dT)) y L-ARN (L-riboadenosina-3'-fosfato (espejo rA); L-ribocitidina-3'-fosfato (espejo rC), L-riboguanosina-3'-fosfato (espejo rG), L-riburacilo-3'-fosfato (espejo dU).
- 30 El desoxirribonucleótido modificado incluye, por ejemplo, ADN de 5'OMe (5-metil-desoxirriboguanosina-3'-fosfato) que puede ser útil como un nucleótido en la posición terminal 5' (posición número 1); PACE (desoxirriboadenina 3' fosfonoacetato, desoxirribocitidina 3' fosfonoacetato, desoxirriboguanosina 3' fosfonoacetato, desoxirribotimidina 3' fosfonoacetato.
- 35 Las unidades estructurales no convencionales incluyen ácidos nucleicos puenteados que incluyen LNA (adenosina 3' monofosfato de ácido nucleico puenteado con 2'-O, 4'-C-metileno, 5-metil-citidina 3' monofosfato de ácido nucleico puenteado con 2'-O,4'-C-metileno, guanosina 3' monofosfato de ácido nucleico puenteado en 2'-O, 4'-C-metileno, 5-metil-uridina (o timidina) 3' monofosfato); y ENA (adenosina 3' monofosfato de ácido nucleico puenteado con 2'-O, 4'-C-etileno, 5-metil-citidina 3' monofosfato de ácido nucleico puenteado en 2'-O,4'-etileno, guanosina 3' monofosfato de ácido nucleico puenteado en 2'-O,4'-C-etileno, 5-metil-uridina (o timidina) 3' monofosfato)
- 40 En algunas realizaciones de la invención, la unidad estructural no convencional es una unidad estructural de ribosa abásico, una unidad estructural de desoxirribosa abásico, un desoxirribonucleótido, un nucleótido espejo y un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace fosfato internucleótido 2'-5'.
- Los nucleótidos se seleccionan de bases modificadas de origen natural o sintéticas. Las bases de origen natural incluyen adenina, guanina, citosina, timina y uracilo. Las bases modificadas de nucleótidos incluyen inosina, xantina,
- 45 hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo, 2-propilo y otras alquil-adeninas, 5-halo uracilo, 5-halo citosina, 6-aza citosina y 6-azatimina, pseudo uracilo, 4-tiouracilo, 8-halo adenina, 8-aminoadenina, 8-tiol adenina, 8-tiolalquil adeninas, 8-hidroxil adenina y otras adeninas sustituidas en 8, 8-halo guaninas, 8-amino guanina, 8-tiol guanina, 8-tioalquil guaninas, 8-hidroxil guanina y otras guaninas sustituidas, otras adeninas aza y desaza, otras guaninas aza y desaza, 5-trifluorometil uracilo y 5-trifluoro citosina. Los compuestos de ARNip que comprenden uno o más pseudonucleótidos abásicos están abarcados por la presente invención. Un monómero de nucleótidos que comprende una base
- 50 modificada, que incluye monómeros de pseudo nucleótidos abásicos, puede estar sustituido por uno o más ribonucleótidos del oligonucleótido. Se puede incluir un monómero de pseudonucleótido abásico en una o más de las posiciones terminales o como un cubrimiento terminal 5'. Un cubrimiento terminal 5' también se puede seleccionar entre un análogo de pseudonucleótido abásico invertido, un nucleótido de L-ADN y un fosfato de C6-imina.

Además, se preparan análogos de polinucleótidos en donde la estructura de uno o más nucleótidos se altera fundamentalmente y se adapta mejor como reactivos terapéuticos o experimentales. Un ejemplo de un análogo de nucleótidos es un ácido nucleico peptídico (PNA) en el que el esqueleto de fosfato de desoxirribosa (o ribosa) en el ADN (o ARN comprende con un esqueleto de poliamida que es similar al encontrado en péptidos. Los análogos de PNA han demostrado ser resistentes a la degradación enzimática y a tener vidas prolongadas in vivo e in vitro.

Las posibles modificaciones del residuo de azúcar son múltiples e incluyen 2'-O alquilo, 2'-halo (por ejemplo, 2' desoxi flúor), ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico de glicol (GNA), ácido nucleico de treosa (TNA), arabinósido; altritol (ANA) y otros azúcares de 6 miembros incluyendo morfolinolinos y ciclohexinilos. Las posibles modificaciones en la unidad estructural 2' del residuo de azúcar incluyen amino, flúor, metoxialcoxi, alquilo, amino, flúor, cloro, bromo, CN, CF, imidazol, carboxilato, tioato, C1 a C10 alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo o aralquilo, OCF₃, OCN, O-, S-, o N- alquilo; O-, S, o Nalqueno; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂, N₃; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino o sililo sustituido, como, entre otros, se describe en las patentes europeas EP 0 586 520 B1 o EP 0 618 925 B1. Uno o más desoxirribonucleótidos también se toleran en los compuestos de la presente invención. En algunas realizaciones (N') comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 unidades estructurales de ADN.

Los compuestos LNA se divulgan en las Publicaciones de Patentes Internacionales Nos. WO 00/47599, WO 99/14226 y WO 98/39352. Ejemplos de compuestos de ARNip que comprenden nucleótidos de LNA se divulgan en Elmen et al., (NAR 2005. 33 (1): 439-447) y en la Publicación de Patente Internacional No. WO 2004/083430. Se divulgan análogos de nucleótidos de anillo de seis miembros en Allart et al (Nucleosides & Nucleótidos, 1998, 17: 1523-1526, y Perez-Perez, et al., 1996, Bioorg y Medicinal Chem Letters 6: 1457-1460) Los oligonucleótidos que comprenden análogos de nucleótidos de anillo de 6 miembros incluyendo hexitol y monómeros de nucleótidos de altritol se describen en la publicación de solicitud de patente internacional No. WO 2006/047842.

Las modificaciones de esqueleto, también conocidas como modificaciones de enlace internucleótido, tales como etilo (que da como resultado un triéster de fosfoetilo); propilo (que da como resultado un triéster de fosfo-propilo); y butilo (que da como resultado un triéster de fosfo-butilo) también son posibles. Otras modificaciones del esqueleto incluyen esqueletos de polímero, esqueletos cíclicos, esqueletos acíclicos, esqueletos de tiosfato-D-ribosa, amidatos, derivados de fosfonoacetato. Ciertas estructuras incluyen compuestos de ARNip que tienen una o una pluralidad de enlaces internucleótidos 2'-5' (puentes o esqueleto).

En algunas realizaciones, ni (N)x ni (N')y son fosforilados en los terminales 3' y 5'. En otras realizaciones, uno o ambos (N)x y (N')y se fosforilan en el terminal 3' (3' Pi). En aún otra realización, uno o ambos (N)x y (N')y son fosforilados en los terminales 3' con grupos fosfato no escindibles. En aún otra realización, uno o ambos (N)x y (N')y se fosforilan en la posición de terminales de terminal 2' utilizando grupos fosfato escindibles o no escindibles. Además, las moléculas de ácido nucleico inhibitoras de la presente invención pueden comprender una o más brechas y/o una o más muescas y/o una o más no coincidencias. Sin desear quedar limitados por la teoría, las brechas, las muescas y las no coincidencias tienen la ventaja de desestabilizar parcialmente el ácido nucleico/siARN, de tal manera que puede ser más fácilmente procesado por maquinaria celular endógena tal como DICER, DROSHA o RISC en sus componentes inhibidores.

En el contexto de la presente invención, una brecha en un ácido nucleico se refiere a la ausencia de uno o más nucleótidos internos en una cadena, mientras que una muesca en un ácido nucleico se refiere a la ausencia de un enlace internucleótido entre dos nucleótidos adyacentes en una cadena. Cualquiera de las moléculas de la presente invención puede contener una o más brechas y/o una o más muescas.

Oligonucleótidos

En un ejemplo no limitativo, las Tablas B (B1-B74), Tablas C (C1-C4) y Tablas D (D1-D34) de la Publicación de la Solicitud de Patente PCT No. WO 2009/044392, asignadas al cesionario de la presente invención, comprenden secuencias de ácido nucleico de oligómeros en sentido y correspondientes antisentido, útiles en la preparación de compuestos de ARNip de acuerdo con la presente solicitud. Los compuestos se usan como compuestos modificados química y estructuralmente.

La selección y síntesis de ARNip que corresponde a genes conocidos ha sido ampliamente reportado; véase por ejemplo Ui-Tei et al., J Biomed Biotechnol. 2006; 65052; Chalk et al., BBRC. 2004, 319(1):264-74; Sioud & Leirdal, Met. Mol Biol. 2004, 252:457-69; Levenkova et al., Bioinform. 2004, 20(3):430-2; Ui-Tei et al., NAR. 2004, 32(3):936-48. Para ejemplos del uso y producción de ARNip modificado véase por ejemplo, Braasch et al., Biochem. 2003, 42(26):7967-75; Chiu et al., RNA. 2003, 9(9):1034-48; Las Publicaciones PCT Nos WO 2004/015107 y WO 02/44321 y las Patentes US Nos. 5,898,031 y 6,107,094.

La presente invención proporciona oligonucleótidos de doble cadena (por ejemplo, ARNip), que subregulan la expresión de un gen deseado. Un ARNip de la invención es un oligorribonucleótido dúplex en el que la cadena en sentido se deriva de la secuencia de ARNm del gen deseado y la cadena antisentido es al menos sustancialmente

complementaria a la cadena en sentido. En general, se tolera cierta desviación de la secuencia de ARNm diana sin comprometer la actividad del ARNip (véase, por ejemplo, Czauderna et al., NAR. 2003, 31(11):2705-2716). Un ARNip de la invención inhibe la expresión génica en un nivel post-transcripcional con o sin destruir el ARNm. Sin estar limitado por la teoría, el ARNip puede dirigirse al ARNm para la escisión y degradación específicas y/o puede inhibir la traducción del mensaje direccionado.

En otras realizaciones, al menos una de las dos cadenas puede tener un excedente de al menos un nucleótido en el terminal 5'; el excedente puede consistir en al menos un desoxirribonucleótido. La longitud del dúplex de ARN es de aproximadamente 16 a aproximadamente 40 ribonucleótidos, preferiblemente 19 ribonucleótidos. Además, la longitud de cada cadena puede tener independientemente una longitud seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 16 a aproximadamente 40 bases, preferiblemente 18 a 23 bases y más preferiblemente 19 ribonucleótidos.

En ciertas realizaciones la complementariedad entre dicha primera cadena y el ácido nucleico diana es perfecta. En algunas realizaciones, las cadenas son sustancialmente complementarias, es decir, tienen uno, dos o hasta cinco no coincidencias entre dicha primera cadena y el ARNm diana o entre la primera y la segunda cadenas. Sustancialmente complementario se refiere a la complementariedad de más de aproximadamente 70% y menos de 100% con otra secuencia. Por ejemplo, en una región dúplex que consiste de 19 pares de bases, una no coincidencia da como resultado una complementariedad del 94,7%, dos no coincidencias dan como resultado una complementariedad de aproximadamente 89,5%, 3 no coincidencias dan como resultado una complementariedad de aproximadamente 84,2%, 4 no coincidencias dan como resultado una complementariedad del 79% y 5 no coincidencias dan como resultado aproximadamente 74% de complementariedad, haciendo que la región dúplex sea sustancialmente complementaria. Por consiguiente, sustancialmente idéntico se refiere a identidad de más de aproximadamente 70%, con otra secuencia.

La primera cadena y la segunda cadena pueden estar unidas por una estructura de bucle, que puede estar constituida por un polímero de ácido no nucleico, tal como, inter alia, polietilenglicol. Alternativamente, la estructura de bucle puede estar constituida por un ácido nucleico, incluyendo ribonucleótidos modificados y no modificados y desoxirribonucleótidos modificados y no modificados.

Además, el terminal 5' de la primera cadena del ARNip puede estar unido al terminal 3' de la segunda cadena, o el terminal 3' de la primera cadena puede estar unido al terminal 5' de la segunda cadena, siendo dicho enlace mediante un enlace de ácido nucleico que tiene típicamente una longitud entre 2-100 nucleobases, preferiblemente aproximadamente 2 a aproximadamente 30 nucleobases.

En algunas realizaciones de los compuestos de la invención que tienen ribonucleótidos alternativos modificados en al menos una de las cadenas antisentido y en sentido del compuesto, para los oligómeros de 19 mer y 23 mer, los ribonucleótidos en los terminales 5' y 3' de la cadena antisentido son modificados en sus residuos de azúcar, y los ribonucleótidos en los terminales 5' y 3' de la cadena en sentido no están modificados en sus residuos de azúcar. Para oligómeros de 21 mer, los ribonucleótidos en los terminales 5' y 3' de la cadena en sentido se modifican en sus residuos de azúcar, y los ribonucleótidos en los extremos 5' y 3' de la cadena antisentido no están modificados en sus residuos de azúcar o pueden tener una modificación adicional opcional en el terminal 3'. Como se ha mencionado anteriormente, en algunas realizaciones el nucleótido medio de la cadena antisentido no está modificado.

De acuerdo con una realización de la invención, las cadenas antisentido y en sentido del oligonucleótido/ARNip se fosforilan sólo en el terminal 3' y no en el terminal 5'. De acuerdo con otra realización de la invención, las cadenas antisentido y en sentido no están fosforiladas. De acuerdo con otra realización de la invención, el 5' más ribonucleótido en la cadena en sentido se modifica para eliminar cualquier posibilidad de fosforilación en 5' in vivo.

Se prepara cualquier secuencia de ARNip descrita aquí que tenga cualquiera de las modificaciones/estructuras divulgadas aquí. La combinación de secuencia más estructura es novedosa y es útil usada en el tratamiento de las condiciones dicitadas aquí.

Composiciones farmacéuticas

Aunque puede ser posible administrar los compuestos de la presente invención como el producto químico en bruto, es preferible presentarlos como una composición farmacéutica. Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más de los compuestos de la invención; y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede comprender una mezcla de dos o más oligonucleótidos/ARNip diferentes.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de la invención unido covalentemente o no covalentemente a uno o más compuestos de la invención en una cantidad efectiva para inhibir uno o más genes como se ha divulgado anteriormente; y un vehículo farmacéuticamente

aceptable. El compuesto puede ser procesado intracelularmente por complejos celulares endógenos para producir uno o más oligorribonucleótidos de la invención.

5 La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y uno o más de los compuestos de la invención en una cantidad efectiva para subregular la expresión en una célula de un ARN diana, incluyendo genes diana y ARNm diana y/o proteína diana, comprendiendo el compuesto una secuencia que tiene complementariedad con la secuencia de (N)_x. En ciertas realizaciones, el gen diana es un gen viral, bacteriano o de mamífero. En diversas realizaciones, el gen diana es un gen de mamífero, preferiblemente un gen humano.

10 Adicionalmente, la invención proporciona un método para inhibir la expresión de un gen diana, al menos en un 50% en comparación con un control, que comprende poner en contacto un transcrito de ARNm del gen diana con uno o más de los compuestos de la invención. En algunas realizaciones, un compuesto de ARNip activo inhibe la expresión génica a un nivel de al menos 50%, 60% o 70% en comparación con el control. En ciertas realizaciones la inhibición está a un nivel de al menos 75%, 80% o 90% en comparación con el control. En algunas realizaciones, el gen diana es un gen proapoptótico como se divulga aquí.

15 En una realización, el oligorribonucleótido inhibe uno o más de los genes proapoptóticos de la presente invención, por lo que la inhibición se selecciona del grupo que comprende la inhibición de la función génica, la inhibición del polipéptido y la inhibición de la expresión del ARNm.

20 En una realización, el compuesto inhibe la expresión de un polipéptido codificado por un gen diana, por lo que la inhibición se selecciona del grupo que comprende la inhibición de la función (que puede examinarse mediante un ensayo enzimático o un ensayo de unión con un interactor conocido del gen/polipéptido nativo, inter alia), la inhibición de la proteína (que puede examinarse mediante transferencias Western, ELISA o inmunoprecipitación, inter alia) e inhibición de la expresión de ARNm (que puede examinarse mediante transferencia Northern, RT-PCR cuantitativa, hibridación in situ o hibridación de microarreglos, inter alia).

25 En realizaciones adicionales, la invención proporciona las moléculas de la invención para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que sufre de una enfermedad acompañada de un nivel elevado de los genes proapoptóticos de la presente invención, comprendiendo el método administrar al sujeto un compuesto de la invención en una dosis terapéuticamente efectiva tratando de este modo al sujeto.

Suministro

30 En algunas realizaciones, las moléculas de ARNip de la presente invención deben administrarse al tejido diana mediante la aplicación directa de las moléculas desnudas preparadas con un vehículo o un diluyente.

El término "ARNip desnudo" se refiere a moléculas de ARNip que están libres de cualquier vehículo de suministro que actúa para ayudar, promover o facilitar la entrada a la célula, incluyendo secuencias virales, partículas virales, formulaciones de liposomas, lipofectina o agentes precipitantes y similares. Por ejemplo, ARNip en PBS es "ARNip desnudo".

35 Sin embargo, en algunas realizaciones las moléculas de ARNip de la invención se suministran en formulaciones de liposomas o lipofectinas y similares y se preparan por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales métodos se describen, por ejemplo, en las Patentes US números 5,593,972, 5,589,466 y 5,580,859.

40 Se han desarrollado sistemas de suministro dirigidos específicamente al suministro potenciado y mejorado de ARNip en células de mamífero, (véase, por ejemplo, Shen et al FEBS Let. 2003, 539:111-114; Xia et al., Nat. Biotech. 2002, 20:1006-1010; Reich et al., Mol. Vision 2003, 9: 210-216; Sorensen et al., J. Mol. Biol. 2003. 327: 761-766; Lewis et al., Nat. Gen. 2002, 32: 107-108 y Simeoni et al., NAR 2003, 31,11: 2717-2724). El ARNip se ha utilizado recientemente con éxito para la inhibición de la expresión génica en primates (véase, por ejemplo, Tolentino et al., Retina 24 (4): 660.

45 Los portadores, solventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables, así como portadores de implantes, se refieren generalmente a agentes de relleno, diluyentes o materiales encapsulantes sólidos o líquidos inertes, no tóxicos que no reaccionan con los ingredientes activos de la invención e incluyen liposomas y microesferas. Ejemplos de sistemas de suministro útiles en la presente invención incluyen las Patentes US Nos. 5,225,182; 5,169,383; 5,167,616; 4,959,217; 4,925,678; 4,487,603; 4,486,194; 4,447,233; 4,447,224; 4,439,196; y 4,475,196. Muchos otros tales implantes, sistemas de suministro y módulos son bien conocidos por los expertos en la técnica. En una realización específica de esta invención pueden seleccionarse formulaciones tópicas y transdérmicas.

50 Los ARNip o composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran y dosifican de acuerdo con una buena práctica médica, teniendo en cuenta la condición clínica del paciente individual, la enfermedad que se va a tratar, el sitio y el método de administración, la programación de la administración, la edad del paciente, sexo, peso corporal y otros factores conocidos por los médicos.

- 5 La "dosis terapéuticamente efectiva" para los propósitos de la presente invención se determina así mediante consideraciones tales como las que se conocen en la técnica. La dosis debe ser efectiva para conseguir mejoras, incluyendo, pero sin limitarse a, una mejora de la tasa de supervivencia o una recuperación más rápida, o la mejora o eliminación de los síntomas y otros indicadores que se seleccionan como medidas apropiadas por los expertos en la técnica.
- En general, la dosificación puede ser de 0.01 mg a 1 g por kg de peso corporal (por ejemplo, 0.1 mg, 0.25 mg, 0.5 mg, 0.75 mg, 1 mg, 2.5 mg, 5 mg, 10 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg, 250 mg, 500 mg, 1 mg, 2,5 mg, 5 mg, 10 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg, 250 mg, o 500 mg por kg).
- 10 Una unidad de dosificación adecuada de moléculas de ácido nucleico puede estar en el rango de 0.001 a 0.25 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor por día, o en el rango de 0.01 a 20 microgramos por kilogramo de peso corporal por día, o en el rango de 0.01 a 10 microgramos por kilogramo de peso corporal por día, o en el rango de 0.10 a 5 microgramos por kilogramo de peso corporal al día, o en el rango de 0.1 a 2.5 microgramos por kilogramo de peso corporal por día.
- 15 Se pueden administrar cantidades adecuadas de moléculas de ácido nucleico y estas cantidades pueden determinarse empíricamente usando métodos estándar. Las concentraciones efectivas de especies de moléculas individuales de ácido nucleico en el ambiente de una célula pueden ser de aproximadamente 1 femtomolar (fmolar), aproximadamente 50 femtomolar, 100 femtomolar, 1 picomolar, 1.5 picomolar, 2.5 picomolar, 5 picomolar, 10 picomolar, 25 picomolar, 50 picomolar, 100 picomolar, 500 picomolar, 1 nanomolar, 2.5 nanomolar, 5 nanomolar, 10 nanomolar, 25 nanomolar, 50 nanomolar, 100 nanomolar, 500 nanomolar, 1 micromolar, 2,5 micromolar, 5 micromolar, 10 micromolar, 100 micromolar o más.
- 20 La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los materiales portadores para producir una forma de dosificación única varía dependiendo del huésped tratado y del modo particular de administración. Las formas unitarias de dosificación contienen generalmente entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 500 mg de un ingrediente activo.
- 25 Se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto particular depende de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que se somete a terapia.
- 30 Las composiciones farmacéuticas que incluyen la molécula de ácido nucleico divulgada aquí pueden administrarse una vez al día, qid, tid, bid, QD, o en cualquier intervalo y durante cualquier duración que sea médicamente apropiada. Sin embargo, el agente terapéutico también se puede dosificar en unidades de dosificación que contienen dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas a intervalos apropiados a lo largo del día. En ese caso, las moléculas de ácido nucleico contenidas en cada subdosis pueden ser correspondientemente más pequeñas con el fin de alcanzar la unidad de dosificación diaria total. La unidad de dosificación también se puede combinar para una dosis única durante varios días, por ejemplo, usando una formulación de liberación sostenida convencional que proporcione una liberación sostenida y consistente del ARNbc durante un período de varios días. Las formulaciones de liberación sostenida son bien conocidas en la técnica. La unidad de dosificación puede contener un múltiplo correspondiente de la dosis diaria. La composición se puede combinar de tal manera que la suma de las unidades múltiples de un ácido nucleico juntos contiene una dosis suficiente.
- 35
- 40 Kits y recipientes
- También se proporcionan kits, recipientes y formulaciones que incluyen una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de siAN) como se proporciona aquí para reducir la expresión de un gen diana para administrar la molécula de ácido nucleico a un sujeto. En algunas realizaciones, un kit incluye al menos un recipiente y al menos una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados a partir de una variedad de materiales tales como vidrio, metal o plástico. Los kits pueden incluir además indicaciones y/o direcciones asociadas; se pueden incluir también reactivos y otras composiciones o herramientas utilizadas para tal fin.
- 45 El recipiente puede mantener alternativamente una composición que sea efectiva para tratar, diagnosticar, pronosticar o para someter a profilaxis una condición y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Los agentes activos en la composición pueden ser una molécula de ácido nucleico capaz de unirse específicamente a un gen diana y/o modular la función de un gen diana.
- 50 Un kit puede incluir además un segundo recipiente que incluye un regulador farmacéuticamente aceptable, tal como solución regulada con fosfato, solución de Ringer y/o solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales

deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros reguladores, diluyentes, filtros, agitadores, agujas, jeringas y/o insertos de paquete con indicaciones y/o instrucciones de uso.

5 Las ampollas de dosificación unitaria o recipientes multidosis, en los que las moléculas de ácido nucleico se empaquetan antes de su uso, pueden incluir un recipiente herméticamente sellado que encierra una cantidad de moléculas de ácido nucleico o solución que contiene moléculas de ácido nucleico adecuadas para una dosis farmacéuticamente efectiva de las mismas o múltiplos de una dosis efectiva. Las moléculas de ácido nucleico se empaquetan como una formulación estéril, y el recipiente herméticamente sellado está diseñado para preservar la esterilidad de la formulación hasta su uso.

10 El recipiente que comprende las moléculas de ácido nucleico puede incluir un empaque que está etiquetado y la etiqueta puede portar una notificación en la forma prescrita por una agencia gubernamental, por ejemplo la Administración de Alimentos y Fármacos, cuyo aviso refleja la aprobación por la agencia bajo la ley Federal, de la fabricación, uso o venta del material polinucleótido en el mismo para administración humana.

15 La ley Federal o Nacional requiere que el uso de composiciones farmacéuticas en la terapia de humanos sea aprobado por una agencia del gobierno Federal o Nacional. En los Estados Unidos, la aplicación es responsabilidad de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), la cual emite regulaciones para asegurar tal aprobación, detalladas en 21 U.S.C. § 301-392. La aprobación similar es requerida por la mayoría de los países extranjeros y los procedimientos únicos son bien conocidos por los expertos en la técnica y las composiciones y métodos proporcionados aquí se ajustan preferiblemente en consecuencia.

20 La dosificación que se va a administrar depende en gran medida de la condición y tamaño del sujeto que se está tratando, así como de la frecuencia del tratamiento y de la ruta de administración. Los regímenes para la terapia continua, incluyendo la dosis y la frecuencia pueden ser guiados por la respuesta inicial y el juicio clínico.

25 Los compuestos de ácido nucleico divulgados aquí deben administrarse por cualquiera de las rutas convencionales de administración. Debe observarse que el compuesto se ha de administrar como el compuesto per se, o como una sal farmacéuticamente aceptable y se ha de administrar solo o como ingrediente activo en combinación con portadores, solventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos se deben administrar oralmente, tópicamente, subcutáneamente o parenteralmente, incluyendo administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal e intranasal, por inhalación, a transtímpano así como técnicas intratecal y de infusión. Los implantes de los compuestos son también útiles. Pueden prepararse formas líquidas para inyección, incluyendo el término vías subcutánea, transdérmica, intravenosa, intramuscular, intratecal y otras vías parentales de administración. Las composiciones líquidas incluyen soluciones acuosas, con y sin cosolventes orgánicos, suspensiones acuosas u oleosas, emulsiones con aceites comestibles, así como vehículos farmacéuticos similares. En una realización particular, la administración comprende la administración intravenosa. En otra realización, la administración comprende administración tópica o local. En algunas realizaciones la administración tópica incluye administración tópica al canal auditivo del mamífero. En algunas realizaciones la administración tópica incluye la administración tópica a la superficie de un ojo del mamífero.

Además, en ciertas realizaciones las composiciones para uso en los novedosos tratamientos de la presente invención pueden formarse como aerosoles, por ejemplo para administración intranasal.

40 En ciertas realizaciones, las composiciones orales (tales como tabletas, suspensiones, soluciones) pueden ser efectivas para la administración local a la cavidad oral tal como la composición oral adecuada para el enjuague bucal para el tratamiento de la mucositis oral.

En realizaciones, el sujeto que se trata es un animal de sangre caliente y, en particular, mamíferos incluyendo humanos.

En una realización adicional, la modificación es una modificación de la unidad estructural fosfato, por lo que la unidad estructural fosfato modificado se selecciona del grupo que comprende fosforotioato o carencia de un grupo fosfato.

45 Las moléculas de la presente invención comprenden siARN, siAN, ARNip sintéticos, shARN sintéticos y miARN.

50 En algunas realizaciones, los compuestos de ácido nucleico son útiles para el diagnóstico. Sin desear estar ligado a la teoría, una molécula de ácido nucleico de doble cadena que comprende un no nucleótido de terminal 3' puede administrarse eficientemente a células y tejidos específicos y es un indicio útil de trastornos en la célula o tejido específico. En concordancia, las modificaciones finales incluyen unidades estructurales detectables que incluyen agentes colorígenos, unidades estructurales radiomarcadas y agentes enzimáticos. En algunas realizaciones, el agente detectable es un grupo de biotina. Dicho grupo de biotina puede estar unido preferiblemente a cualquiera de los más nucleótidos en 5' de la cadena en sentido o el más nucleótido en 3' de la cadena antisentido o a ambos de estos extremos.

Las diversas modificaciones de extremo como se divulgan aquí están situadas preferiblemente en la unidad estructural ribosa de un nucleótido del ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Más particularmente, la modificación del extremo puede estar unida a o reemplaza cualquiera de los grupos OH de la unidad estructural ribosa, incluyendo, pero sin limitarse a, la posición 2'OH, 3'OH y 5'OH, con la condición de que el nucleótido así modificado sea un nucleótido terminal, preferiblemente un nucleótido terminal 5' de la cadena en sentido. Debe entenderse que las moléculas de ácido nucleico divulgadas aquí, o cualquier molécula de ARN de doble cadena larga (típicamente 25-500 nucleótidos de longitud) que son procesadas por complejos celulares endógenos (tales como DICER véase más arriba) para formar las moléculas de ARNip divulgadas aquí, o moléculas que comprenden las moléculas de ARNip divulgadas aquí, se incorporan en las moléculas de la presente invención para formar moléculas novedosas adicionales y se emplean en el tratamiento de las enfermedades o trastornos descritos aquí.

En particular, se prevé que un oligonucleótido largo puede suministrarse en un portador, preferiblemente un portador farmacéuticamente aceptable, y puede ser procesado intracelularmente por complejos celulares endógenos (por ejemplo, por DROSHA y DICER como se ha descrito más arriba para producir uno o más oligonucleótidos de doble cadena más pequeños (ARNip) que son oligonucleótidos de la invención. Este oligonucleótido se denomina constructo de shARN en tándem. Se prevé que este oligonucleótido largo sea un oligonucleótido de cadena sencilla que comprenda una o más estructuras de tallo y bucle, en donde cada región de tallo comprende una secuencia de ARNip en sentido y antisentido correspondiente. Son particularmente deseables cualesquiera moléculas, tales como, por ejemplo, moléculas de ADN antisentido que comprendan las secuencias inhibitoras divulgadas aquí (con las modificaciones apropiadas de ácido nucleico) y pueden usarse en la misma capacidad que sus correspondientes ARNs/ARNip para todos los usos y métodos descritos aquí.

Esqueleto

Las subunidades nucleósidas de las moléculas de ácido nucleico divulgadas aquí pueden estar unidas entre sí mediante enlaces fosfodiéster. El enlace fosfodiéster 5'3' estándar puede estar opcionalmente sustituido con otros enlaces. Por ejemplo, las entidades fosforotioato, tiofosfato-D-ribosa, triéster, tioato, esqueleto puenteado en 2'-5' (también se puede denominar como 5'-2' o 2'5'), PACE, 3'-(o 5')desoxi-3'-(o -5')tio- fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenatos, 3'-(o -5')desoxifosfinatos, borano fosfatos, 3'-(o -5')desoxi-3'-(o -5'-)amino fosforamidatos, fosfonatos de hidrógeno, fosfonatos, ésteres de borano fosfato, fosfonatos de alquilo o arilo y modificaciones de fosfotriéster tales como alquilfosfotriésteres, enlaces fosfotriéster fosforoso, 5'-etoxifosfodiéster, P-alquilofoxifosfotriéster, metilfosfonato y enlaces que no contienen fósforo por ejemplo, enlaces carbonato, carbamato, sililo, azufre, sulfonato, sulfonamida, formacetal, tioformacético, oxima, metilenoimino, metilenoimilimino, metilenoimidazolo, metilendimetilhidrazo y metilenooximetilimino. Además, pueden prepararse análogos de polinucleótidos en los que la estructura del nucleótido está fundamentalmente alterada y que son más adecuados como reactivos terapéuticos o experimentales. Un ejemplo de un análogo de nucleótidos es un ácido nucleico peptídico (PNA) en el que el esqueleto de fosfato de desoxirribosa (o ribosa) en el ADN (o ARN comprende un esqueleto de poliamida que es similar al encontrado en los péptidos. Se ha demostrado que los análogos de PNA son resistentes a la degradación por enzimas y tienen vidas prolongadas in vivo e in vitro. Además, se ha demostrado que los PNA se unen más fuertes a una secuencia de ADN complementaria que a una molécula de ADN. Esta observación se atribuye a la carencia de repulsión de carga entre la cadena de PNA y la cadena de ADN Otros monómeros modificados útiles para sintetizar los oligonucleótidos incluyen unidades estructurales que tienen esqueletos de polímero, esqueletos cíclicos o esqueletos acíclicos.

Métodos de tratamiento

En otro aspecto, la presente invención se refiere a las moléculas de la invención para uso en un método para el tratamiento de un sujeto que necesita tratamiento para una enfermedad o trastorno asociado con la expresión anormal de un gen diana, que comprende administrar al sujeto una cantidad de un inhibidor que reduce o inhibe la expresión del gen.

En ciertas realizaciones, el sujeto que se trata es un animal de sangre caliente y, en particular, mamíferos incluyendo humanos.

Los métodos comprenden administrar al sujeto uno o más compuestos inhibidores que subregulan la expresión de un gen; y en particular ARNip en una dosis terapéuticamente efectiva para tratar de este modo al sujeto.

El término "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en las que el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) un trastorno como se enumera aquí. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la enfermedad o condición, aquellos que son propensos a tener la enfermedad o condición y aquellos en los que se debe prevenir la enfermedad o condición. Los compuestos de la invención deben administrarse antes, durante o subsecuente al inicio de la enfermedad o condición o síntomas asociados con la misma. En los casos en los que el tratamiento es con propósitos de prevención, la presente descripción se refiere a un método para retrasar el inicio de o evitar el desarrollo de la enfermedad o trastorno.

La presente invención se refiere al uso de compuestos que subregulan la expresión de los genes proapoptóticos de la invención en particular a novedosos ARN de interferencia pequeños (ARNip), en el tratamiento de las siguientes enfermedades o condiciones en las que la inhibición de la expresión de los genes proapoptóticos es beneficioso: pérdida auditiva, insuficiencia renal aguda (ARF), glaucoma, síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) y otras lesiones pulmonares y respiratorias agudas, lesión isquémica por perfusión tras trasplante de pulmón, trasplante de órganos incluyendo trasplante de pulmón, hígado, corazón, de médula ósea, páncreas, córnea y riñón que incluye DGF; lesión de la médula espinal, úlceras por presión, degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), síndrome de ojo seco, condiciones isquémicas oculares incluyendo ION y NAION; mucositis oral y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD). Otras indicaciones incluyen nefrotoxicidad inducida por productos químicos y neurotoxicidad inducida por productos químicos, por ejemplo toxicidad inducida por cisplatino y compuestos similares al cisplatino, por los aminoglucósidos, por diuréticos de bucle y por hidroquinona y sus análogos.

Métodos, moléculas y composiciones que inhiben los genes proapoptóticos de la invención se discuten en la presente invención en detalle, y cualquiera de dichas moléculas y/o composiciones se pueden emplear de manera beneficiosa en el tratamiento de un sujeto que padezca cualquiera de dichas condiciones.

En un aspecto adicional, se proporciona un artículo de fabricación que incluye material de empaque que comprende una composición de oligonucleótido de acuerdo con la invención que es terapéuticamente efectiva en el tratamiento de un sujeto que sufre de cualquiera de las indicaciones aquí divulgadas, e instrucciones de uso.

Se divulga aquí un método de preparación de una molécula de ARN de doble cadena capaz de inhibición específica al objetivo o subregular la expresión de un gen diana en el que cada cadena de ARN tiene una longitud de 19 a 25 nucleótidos, en donde al menos una cadena tiene una unidad estructural no nucleótido unida covalentemente en una posición 3' o 2' del residuo de azúcar en su extremo terminal 3', que comprende (a) sintetizar dos cadenas de ARN que tienen cada una una longitud de 19 a 25 nucleótidos, en donde dichas cadenas de ARN son capaces de formar una molécula de ARN de doble cadena, (b) combinar las cadenas de ARN sintetizadas bajo condiciones, en donde se forma una molécula de ARN de doble cadena, en donde dicha molécula de ARN de doble cadena consiste en una única región de doble cadena y al menos una región de cadena sencilla que comprende una unidad estructural no nucleótido unida covalentemente en una posición 3' o 2' del residuo de azúcar en el extremo terminal 3' de la cadena en donde está presente; en donde la unidad estructural no nucleótido se selecciona de propanol, una unidad estructural C3 alquilo unida a un fosfodiéster, una unidad estructural C3 alquilo unida a un fosforotioato, una unidad estructural desoxirribobásico o una unidad estructural ribobásico y una combinación de los mismos.

Se proporciona aquí un proceso para preparar una composición farmacéutica, que comprende:

proporcionar uno o más compuestos divulgados aquí; y

mezclar dicho compuesto con un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente descripción también proporciona un proceso para preparar una composición farmacéutica, que comprende mezclar uno o más compuestos de la presente invención con un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización, el compuesto usado en la preparación de una composición farmacéutica se mezcla con un portador en una dosis farmacéuticamente efectiva. En una realización particular, el compuesto de la presente invención se conjuga con un esteroide o con un lípido o con otra molécula adecuada, por ejemplo con colesterol.

Síntesis de compuestos modificados

Los compuestos de la presente invención se pueden sintetizar mediante cualquiera de los métodos que son bien conocidos en la técnica para la síntesis de oligonucleótidos ribonucleicos (o desoxirribonucleicos). Tal síntesis se describe, entre otros, en Beaucage and Iyer, *Tetrahedron* 1992; 48:2223-2311; Beaucage and Iyer, *Tetrahedron* 1993; 49: 6123-6194 and Caruthers, et. al., *Methods Enzymol.* 1987; 154: 287-313; la síntesis de tioatos es, entre otros, descrita en Eckstein, *Annu. Rev. Biochem.* 1985; 54: 367-402, la síntesis de moléculas de ARN se describe en Sproat, en *Humana Press* 2005 editada por Herdewijn P.; Kap. 2: 17-31 y sus respectivos procesos corriente abajo se describen, entre otros, en *IRL Press* 1989 editada por Oliver R.W.A.; Kap. 7: 183-208.

Otros procedimientos sintéticos son conocidos en la técnica, por ejemplo los procedimientos descritos en Usman et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109:7845; Scaringe et al., *NAR*, 1990, 18:5433; Wincott et al., *NAR* 1995, 23:2677-2684; and Wincott et al., *Methods Mol. Bio.*, 1997, 74:59, y estos procedimientos pueden hacer uso de grupos protectores y de acoplamiento de ácidos nucleicos comunes, tales como dimetoxitritilo en el extremo 5', y fosforamiditas en el extremo 3'. Los nucleótidos modificados (por ejemplo, 2'-O-metilados) y los nucleótidos no modificados se incorporan como se desee.

Los oligonucleótidos de la presente invención se pueden sintetizar por separado y unirse conjuntamente post-sintéticamente, por ejemplo, por ligación (Moore et al., Science 1992, 256: 9923, Publicación de Patente Internacional No. WO 93/23569, Shabarova et al. NAR 1991, 19: 4247, Bellon et al., Nucleosides & Nucleótidos, 1997, 16: 951, Bellon et al., Bioconjugate Chem 1997, 8: 204), o por hibridación después de la síntesis y/o desprotección.

5 Se observa que se puede usar una máquina comercialmente disponible (disponible, inter alia, de Applied Biosystems); los oligonucleótidos se preparan de acuerdo con las secuencias divulgadas aquí. Los pares solapantes de fragmentos sintetizados químicamente pueden ser ligados usando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, véase la Patente US No. 6,121,426). Las cadenas se sintetizan por separado y luego se fusionan entre sí en el tubo. Luego, los siRNA de doble cadena se separan de los oligonucleótidos de cadena sencilla que no se fusionaron (por ejemplo debido al exceso de uno de ellos) por HPLC. En relación con los siRNAs o fragmentos de ARNip de la presente invención, dos o más de tales secuencias pueden ser sintetizadas y enlazadas entre sí para su uso en la presente invención.

15 Los compuestos de la invención también se pueden sintetizar mediante la metodología de síntesis en tándem, como se describe por ejemplo en la Publicación de Patente US No. 2004/0019001 (McSwiggen), en donde ambas cadenas de ARNip se sintetizan como un solo fragmento de oligonucleótido contiguo o cadena separada por un enlazador escindible que se escinde subsiguientemente para proporcionar fragmentos o cadenas separadas de ARNip que hibridan y permiten la purificación del dúplex siARN. El enlazador se selecciona de un enlazador polinucleótido o un enlazador no nucleótido.

20 El término "enlace covalente" tal como se utiliza aquí se refiere al enlace químico que se caracteriza por compartir pares de electrones entre átomos.

25 El término "enlace no covalente" tal como se utiliza aquí se refiere a una variedad de interacciones que no son covalentes en naturaleza entre moléculas o partes de moléculas que proporcionan fuerza para mantener juntas las moléculas o partes de moléculas, usualmente en una orientación o conformación específica. Estas interacciones no covalentes incluyen: enlaces iónicos, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y enlaces dipolo-dipolo.

ARNip e interferencia de ARN

30 La interferencia de ARN (ARNi) es un fenómeno que involucra el silenciamiento posttranscripcional específico de genes de doble cadena (ds) dependientes de ARN. Los intentos iniciales para estudiar este fenómeno y manipular experimentalmente células de mamíferos se vieron frustrados por un mecanismo de defensa antiviral activo, no específico, que se activó en respuesta a moléculas largas de ARNbc (Gil et al., Apoptosis, 2000, 5: 107-114). Posteriormente, se descubrió que los dúplex sintéticos de ARN de 21 nucleótidos podrían mediar ARNi específicos de genes en células de mamíferos, sin estimular los mecanismos de defensa antivirales genéricos (véase Elbashir et al., Nature 2001, 411: 494-498 y Caplen et al., PNAS USA 2001, 98: 9742-9747). Como resultado, los ARN de interferencia pequeña (ARNip) se han convertido en herramientas poderosas en el intento de entender la función génica.

35 La interferencia de ARN (ARNi) en mamíferos está mediada por ARNs de interferencia pequeña (ARNip) (Fire et al, Nature 1998, 391: 806) o microARNs (miARNs) (Ambros, Nature 2004, 431 (7006) 350-355; Bartel, Cell 2004, 116 (2): 281-97). El proceso correspondiente en las plantas se conoce comúnmente como silenciamiento génico post-transcripcional específico (PTGS) o silenciamiento de ARN y también se conoce como sofocamiento en hongos.

40 Un ARNip es un ARN de doble cadena o una molécula de ARN modificada que subregula o silencia (previene) la expresión de un gen/ARNm de su equivalente (celular) endógeno.

La selección y síntesis de ARNip correspondiente a genes conocidos ha sido ampliamente reportado; (véase por ejemplo Ui-Tei et al., J Biomed Biotech, 2006, 2006, 65052, Chalk et al., BBRC, 2004, 319 (1): 264-74, Sioud y Leirdal, Met. Mol Biol., 2004, 252: 457-69, Levenkova et al., Bioinform., 2004, 20 (3): 430-2, Ui-Tei et al., NAR, 2004, 32 (3): 936-48).

45 Para ejemplos del uso y la producción de ARNip modificado véase, por ejemplo, Braasch et al., Biochem. 2003, 42 (26): 7967-75; Chiu et al., ARN, 2003, 9 (9): 1034-48; Publicaciones PCT WO 2004/015107 (atugen AG) y WO 02/44321 (Tuschl et al.). Las Patentes US Nos. 5,898,031 y 6,107,094, enseñan oligómeros químicamente modificados. Las Publicaciones de Patente de US Nos. 2005/0080246 y 2005/0042647 se refieren a compuestos oligoméricos que tienen un motivo alternante y compuestos de ARNbc que tienen enlaces internucleósidos modificados químicamente, respectivamente.

50 Se han divulgado otras modificaciones. Se demostró que la inclusión de una unidad estructural 5'-fosfato potencia la actividad de ARNip en embriones de Drosophila (Boutla, et al., Curr. Biol., 2001, 11: 1776-1780) y se requiere para la función ARNip en células HeLa humanas (Schwarz et al., Mol. Cell, 2002, 10: 537-48). Amarzguioui et al., (NAR, 2003,

- 31 (2): 589-95) mostraron que la actividad de ARNip dependía del posicionamiento de las modificaciones con 2'-O-metil (2'OMe). Holen et al. (NAR. 2003, 31 (9): 2401-07) informan que un ARNip que tiene un pequeño número de nucleósidos modificados con 2'OMe dio una buena actividad comparada con el tipo silvestre, pero que la actividad disminuyó a medida que los números de nucleósidos modificados con 2'OMe se incrementó. Chiu and Rana (RNA, 2003, 9: 1034-48) enseñan que la incorporación de nucleósidos modificados con 2'OMe en la cadena en sentido o antisentido (cadenas completamente modificadas) redujo gravemente la actividad de ARNip en relación con el ARNip no modificado. Se indicó que la colocación de un grupo 2'OMe en el terminal 5' en la cadena antisentido limita severamente la actividad mientras que la colocación en el terminal 3' del antisentido y en ambos terminales de la cadena en sentido se toleró (CzaudeARN et al., NAR, 2003, 31 (11): 2705-16, WO 2004/015107).
- 5
- 10 Varios estudios han revelado que los ARNip terapéuticos son eficaces in vivo tanto en mamíferos como en humanos. Bitko et al., han demostrado que las moléculas de ARNip específicas dirigidas contra el gen N de la nucleocápsida del virus sincitial respiratorio (RSV) son efectivas en el tratamiento de ratones cuando se administran por vía intranasal (Nat. Med. 2005, 11(1):50-55. Las revisiones recientes que discuten la terapuetuca de ARNip están disponibles (Barik, et al., J. Mol. Med 2005, 83:764-773; Dallas and Vlassov, Med. Sci. Monitor 2006, 12(4):RA67-74; Chakraborty, Current Drug Targets 2007, 8(3):469-82; Dykxhoorn et al., Gene Therapy 2006. 13:541-552).
- 15
- Mucke (IDrugs 2007 10 (1): 37-41) presenta una revisión de la terapéutica actual, incluyendo ARNip a diversos objetivos, para el tratamiento de enfermedades oculares, por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y glaucoma.
- 20 Recientemente se han publicado varias solicitudes PCT relacionadas con el fenómeno del ARNi. Estas incluyen: la publicación PCT WO 00/44895; la publicación PCT WO 00/49035; la publicación PCT WO 00/63364; la publicación PCT WO 01/36641; la publicación PCT WO 01/36646; la publicación PCT WO 99/32619; la publicación PCT WO 00/44914; la publicación PCT WO 01/29058; y la publicación PCT WO 01/75164.
- 25 La interferencia de ARN (ARNi) se basa en la capacidad de las especies de ARNbc para entrar en un complejo de proteína citoplásmica, donde es entonces dirigida al ARN celular complementario y específicamente degradarlo. La respuesta de interferencia de ARN presenta un complejo de endonucleasa que contiene un siARN, comúnmente denominado como un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que media la escisión de ARN de cadena sencilla que tiene una secuencia complementaria a la cadena antisentido del dúplex de siARN. La escisión del ARN diana puede tener lugar en el centro de la región complementaria a la cadena antisentido del dúplex de ARNip (Elbashir et al., Genes Dev., 2001, 15 (2): 188-200). En mayor detalle, los ARNbc más largos se digieren en fragmentos de ARNbc cortos (17-29 pb) (también denominados ARNs inhibidores cortos, "siARN") por ARNs de tipo III (DICER, DROSHA, etc., Bernstein et al., Nature, 2001, 409 (6818): 363-6, Lee et al., Nature, 2003, 425 (6956): 415-9). El complejo proteico RISC reconoce estos fragmentos y ARNm complementario. El proceso completo se culmina con la escisión por endonucleasa del ARNm diana (McManus y Sharp, Nature Rev Genet, 2002, 3 (10): 737-47, Paddison y Hannon, Curr Opin Mol Ther. 2003, 5 (3): 217-24). (Para información adicional sobre estos términos y mecanismos propuestos, véase, por ejemplo, Bernstein et al., ARN 2001, 7 (11): 1509-21, Nishikura, Cell 2001, 107 (4): 415-8 y la publicación PCT WO 01/36646).
- 30
- 35
- Estructuras de siARN
- La selección y síntesis de ARNip correspondiente a genes conocidos ha sido ampliamente informada; (véase por ejemplo Ui-Tei et al., J Biomed Biotech. 2006; 2006: 65052; Chalk et al., BBRC. 2004, 319(1): 264-74; Sioud & Leirdal, Met. Mol Biol.; 2004, 252:457-69; Levenkova et al., Bioinform. 2004, 20(3):430-2; Ui-Tei et al., NAR. 2004, 32(3):936-48).
- 40
- Para ejemplos del uso de, y producción de ARNip modificado véase, por ejemplo, Braasch et al., Biochem. 2003, 42 (26): 7967-75; Chiu et al., ARN, 2003, 9 (9): 1034-48; Publicaciones PCT WO 2004/015107 (atugen AG) y WO 02/44321 (Tuschl et al.). Las Patentes US Nos. 5,898,031 y 6,107,094, enseñan oligómeros químicamente modificados. Las Publicaciones de Patente US Nos. 2005/0080246 y 2005/0042647 se refieren a compuestos oligoméricos que tienen un motivo alternante y compuestos de ARNbc que tienen enlaces internucleósidos modificados químicamente, respectivamente.
- 45
- Se han divulgado otras modificaciones. Se demostró que la inclusión de una unidad estructural 5'-fosfato potencia la actividad de ARNip en embriones de Drosophila (Boutla, et al., Curr. Biol., 2001, 11: 1776-1780) y se requiere para la función de ARNip en células HeLa humanas (Schwarz et al., Mol. Cell, 2002, 10: 537-48). Amarguioui et al., (NAR, 2003, 31 (2): 589-95) mostraron que la actividad de ARNip dependía del posicionamiento de las modificaciones con 2'-O-metilo (2'OMe). Holen et al. (NAR. 2003, 31(9): 2401-07) informan que un ARNip que tiene un pequeño número de nucleósidos modificados con 2'OMe dio una buena actividad comparada con el tipo silvestre, pero que la actividad disminuyó a medida que los números de nucleósidos modificados con 2'OMe se incrementó. Chiu and Rana (RNA, 2003, 9: 1034-48) enseñan que la incorporación de nucleósidos modificados con 2'OMe en la cadena en sentido o
- 50
- 55

antisentido (cadenas completamente modificadas) redujo gravemente la actividad de ARNip en relación con el ARNip no modificado. Se informó que la colocación de un grupo 2'OMe en el terminal 5' en la cadena antisentido limita severamente la actividad mientras que la colocación en el terminal 3' del antisentido y en ambos terminales de la cadena en sentido se toleró (CzaudeARN et al., NAR, 2003, 31 (11): 2705-16, WO 2004/015107).

- 5 Las moléculas de ARN de doble cadena divulgadas aquí poseen un excedente no nucleótido 3' sobre la cadena antisentido y opcionalmente dos excedentes 3', uno en cada una de las cadenas en sentido y antisentido.

Las moléculas aquí divulgadas ofrecen una ventaja en que son no tóxicas y son útiles en la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos.

- 10 La Solicitud de Patente PCT No. PCT/IL2007/001278 (Publicación PCT No. WO 2008/050329) y la US Serie No. 11/978,089 al cesionario de la presente invención se refieren a inhibidores de genes pro-apoptóticos.

La presente invención se refiere en general a compuestos que subregulan la expresión de diversos genes, en particular a novedosos ARNs de interferencia pequeña (siARN), y al uso de estos novedosos ARNip en el tratamiento de un sujeto que sufre de diversas condiciones médicas.

- 15 Las moléculas y composiciones se discuten aquí en detalle, y cualquiera de dichas moléculas y/o composiciones se pueden emplear de manera beneficiosa en el tratamiento de un sujeto que sufre cualquiera de dichas condiciones.

Los compuestos de ARNip de la presente invención poseen estructuras y modificaciones que pueden, por ejemplo, aumentar la actividad, aumentar la estabilidad y/o minimizar la toxicidad; las modificaciones novedosas de los ARNip de la presente invención se aplican de manera beneficiosa al ARN de doble cadena útil para prevenir o atenuar la expresión del gen diana, en particular los genes diana aquí discutidos.

- 20 De acuerdo con un aspecto divulgado aquí, son compuestos de oligonucleótidos inhibidores que comprenden nucleótidos no modificados y/o modificados. Una cadena del compuesto comprende al menos un excedente 3' que comprende al menos una unidad estructural no nucleótido, preferiblemente dos unidades estructurales no nucleótidos. Los compuestos divulgados aquí comprenden preferiblemente ribonucleótidos sin modificar y ribonucleótidos modificados y/o una o más unidades estructurales no convencionales. En algunas realizaciones, al menos uno de N o N' se selecciona del grupo que consiste en una modificación de azúcar, una modificación de base y una modificación de enlace internucleótido. En algunas realizaciones los compuestos divulgados aquí incluyen al menos un nucleótido modificado que incluye ADN, LNA (ácido nucleico bloqueado) que incluye ENA (ácido nucleico puenteado con etileno, PNA (ácido nucleico peptídico), arabinósido, PACE (fosfonoacetato y derivados de los mismos), o nucleótidos con un análogo de azúcar de 6 miembros (por ejemplo, hexosa o morfolino).
- 25

- 30 En una realización, el compuesto comprende al menos un ribonucleótido modificado que tiene una modificación 2' en la unidad estructural de azúcar ("modificación de azúcar en 2' "). En ciertas realizaciones, el compuesto comprende 2'O-alquilo o 2'-fluoro o 2'O-alilo o cualquier otra modificación de azúcar en 2', opcionalmente en posiciones alternativas. Una modificación 2' posible es 2' O-metilo (2' metoxi, 2'OMe).

- 35 También son posibles otras modificaciones de estabilización (por ejemplo, nucleótidos modificados añadidos a un terminal 3' o 5' de un oligómero). En algunas realizaciones, el esqueleto de los oligonucleótidos está modificado y comprende entidades fosfato-D-ribosa, pero también puede contener entidades tiofosfato-D-ribosa, entidades fosfodiéster L-ribosa, triéster, tioato, esqueleto puenteado en 2'-5' (también puede ser denominado como 5'-2'), un enlace internucleótido modificado con PACE o cualquier otro tipo de modificación.

- 40 La invención ha sido descrita de una manera ilustrativa, y debe entenderse que la terminología usada tiene la intención de ser en la naturaleza de palabras de descripción más que de limitación.

Obviamente, son posibles muchas modificaciones y variaciones de la presente invención a la luz de las enseñanzas anteriores. Por lo tanto, debe entenderse que dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la invención se puede poner en práctica de otra manera que la descrita específicamente. La presente invención se ilustra en detalle a continuación con referencia a ejemplos, pero no se debe interpretar que está limitada a los mismos.

- 45 La cita de cualquier documento aquí no pretende ser una admisión de que tal documento es pertinente en la técnica anterior, o se considera material para la patentabilidad de cualquier reivindicación de la presente solicitud. Cualquier declaración en cuanto al contenido o la fecha de cualquier documento se basa en la información disponible al solicitante en el momento de la presentación y no constituye una admisión sobre la corrección de tal declaración.

Ejemplos

Sin elaboración adicional, se cree que un experto en la técnica puede, utilizando la descripción anterior, utilizar la presente invención en toda su extensión. Por lo tanto, las siguientes realizaciones específicas se deben interpretar como meramente ilustrativas y no limitativas de la invención reivindicada de ninguna manera.

- 5 Los protocolos de biología molecular estándar conocidos en la técnica no descritos específicamente aquí se siguen generalmente esencialmente como en Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New-York (1989, 1992), y en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1988), y como en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989) y como en Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley & Sons, New York (1988), y como en Watson et al., Recombinant DNA, Scientific American Books, New York y en Birren et al (eds)
- 10 Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, Vols. 1-4 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998) y la metodología establecida en las patentes US Nos. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 y 5,272,057. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo generalmente como en los Protocolos de PCR: A Guide To Methods And Applications, Academic Press, San Diego, CA (1990). La PCR in situ (en la célula) en combinación con Citometría de Flujo es útil para la detección de células que contienen secuencias de ADN y ARNm específicas (Testoni y col., Blood 1996, 87: 3822). Los métodos de realización de RT-PCR son también bien conocidos en la técnica.

Listado de secuencias

El Listado de Secuencias presentada electrónicamente adjunto es parte de la solicitud (Nombre del archivo: 217_PCT2_ST25.txt; Fecha de creación: enero 6 2011; Tamaño del archivo: 6.00 Kb.)

Ejemplo 1 Generación de moléculas de ácido nucleico y prueba in vitro de compuestos de ARNip modificados

- 20 Usando algoritmos propietarios y la secuencia conocida de un nucleótido diana, por ejemplo el ARNm de un gen diana, se generan las secuencias en sentido y antisentido de muchas moléculas potenciales de ácido nucleico siARN. Las moléculas de ácido nucleico se representan en orientación 5' a 3', y las secuencias en sentido y antisentido complementarias se representan en la misma línea en las tablas, a menos que se indique otra cosa.

- 25 La Tabla A proporciona secuencias de ácidos nucleicos de ejemplo, no limitantes, útiles en la generación de moléculas de ácido nucleico divulgadas aquí.

Tabla A:

	En sentido 5'>3'	SEQ ID NO	Antisentido 5'>3'	SEQ ID NO
CASP2_4	GCCAGAAUGUGGAACUCCU	1	AGGAGUCCACAUUCUGGC	2
MYD88_11	GAAUGUGACUCCAGACCA	3	UGGUCUGGAAGUCACAUUC	4
RAC1_2	GAGUCCUGCAUCAUUUGAA	5	UUCAAAUGAUGCAGGACUC	6
RHOA_29	UCGACAGCCCUGAUAGUUU	7	AAACUAUCAGGGCUGUCGA	8
RHOA_48	CAGAAGUCAUCUUGCUACA	9	UGUAGCAAGAUGACUUCUG	10
RHOA_50	GUGGCAGAGUACAGUUCA	11	UGAACUGUAACUCUGCCAC	12
RHOA_58	GUGGCAGAGUACAGUUCU	13	AGAACUGUAACUCUGCCAC	14
RHOA_60	CAUCGACAGCCCUGAUAGA	15	UCUAUCAGGGCUGUCGAUG	16
RHOA_61	GAUCUUCGGAAUGAUGAGA	17	UCUCAUCAUCCGAAGAUC	18
RHOA_70	CAUCGACAGCCCUGAUAGU	19	ACUAUCAGGGCUGUCGAUG	20
RHOA_75	UCGACAGCCCUGAUAGUUA	21	UAACUAUCAGGGCUGUCGA	22
TLR2_37	GGUGGAGAACCUUAUGGUC	23	GACCAUAAGGUUCUCCACC	24
TLR2_46	AGAUAUAUGAACACCAAGAC	25	GUCUUGGUGUUCAUUAUCU	26
CASP2_25	GAAUGUGGAACUCCUCAAC	27	GUUGAGGAGUCCACAUUC	28

Actividad:

5 Los oligonucleótidos de cadena sencilla (cadena en sentido y cadena antisentido) se sintetizan usando procedimientos de síntesis estándar. DMT-propano-Diol fosforamidita ChemGenes; CLP-9908) se acopla a una concentración de 0,05 M. Los dúplex se generan mediante fusión de oligonucleótidos de cadena sencilla complementarios. En una campana de flujo laminar, se prepara una solución madre de ~500 µM de oligonucleótido de cadena sencilla diluyendo en WFI (agua para inyección, Norbrook). Las concentraciones reales de ssARN se determinan diluyendo cada 500 µM de ssARN 1: 200 usando WFI, y midiendo la OD usando Nano Drop. El procedimiento se repite 3 veces y se calcula la concentración promedio. La solución madre se diluyó entonces hasta una concentración final de 250 µM. Las cadenas sencillas complementarias se fusionaron calentando a 85°C y dejando enfriar hasta temperatura ambiente durante al menos 45 minutos. Los dúplex se probaron para el fusiónado completo mediante la prueba de 5 µl en un gel de poliacrilamida al 20% y tinción. Las muestras se almacenaron a -80°C.

10 Las moléculas de ácido nucleico de doble cadena divulgadas aquí se probaron en cuanto a la actividad de la siguiente manera: aproximadamente 1.5-2 x 10⁵ células probadas (células HeLa y/o células 293T para ARNi dirigidas a genes humanos y células NRK52 (células normales de túbulos proximales de riñón de rata) y/o células NMuMG (línea de células epiteliales mamarias de ratón) para el ARNi dirigido al gen de rata/ratón) se sembraron por pozo en placas de 6 pozos (confluentes en 70-80%).

15 Aproximadamente 24 horas más tarde, las células se transfectaron con compuestos de ARNi modificados usando el reactivo Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) a concentraciones finales de 0.001 nM a aproximadamente 50 nM. Las células se incubaron a 37 °C en un incubador de CO₂ durante 72 h.

20 Como control positivo para la transfección se usaron compuestos de ARNi modificados marcados con PTEN-Cy3. Los compuestos de ARNi de GFP se usan como control negativo para la actividad de siARN.

A las 72 horas después de la transfección se recolectan las células y se extrae ARN de las células. La eficiencia de la transfección se prueba mediante microscopía de fluorescencia.

El porcentaje de inhibición de la expresión génica usando estructuras de ARNi específicas preferidas se determina usando el análisis qPCR de un gen diana en células que expresan el gen endógeno.

25 El valor de IC₅₀ de la actividad de ARNi probada se determina construyendo una curva de respuesta a la dosis usando los resultados de actividad obtenidos con las diversas concentraciones finales de siARN. La curva de respuesta a la dosis se construye trazando la cantidad relativa de ARNm objetivo residual versus el logaritmo de la concentración de ARNi transfectada. La curva se calcula ajustando la mejor curva sigmoide a los datos medidos. El método para el ajuste sigmoide también se conoce como un ajuste de curva de 3 puntos.

$$Y = Bot + \frac{100 - Bot}{1 + 10^{(LogIC50 - X) \times HillSlope}}$$

30 donde Y es la respuesta de ARNm objetivo residual, X es el logaritmo de la concentración de ARNi transfectada, Bot es el valor de Y en la meseta inferior, LogIC₅₀ es el valor X cuando Y está a medio camino entre las mesetas inferior y superior y *HillSlope* es la inclinación de la curva.

35 Experimentos de estabilidad en suero

Las moléculas de ácido nucleico de doble cadena se probaron para determinar la estabilidad dúplex en suero humano o extracto de tejido humano, como sigue:

40 Las moléculas de ARNi a una concentración final de 7 µM se incuban a 37 °C en suero humano al 100% (Sigma Cat # H4522). (reserva de ARNi 100µM diluido en suero humano 1:14.29 o extracto de tejido humano de diversos tipos de tejidos). Se añaden cinco ul (5 µl) a 15ul de regulador de carga 1,5xTBE en diferentes puntos temporales (por ejemplo 0, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 8 h, 10 h, 16 h y 24 h). Las muestras se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantienen a -20 °C.

Cada muestra se carga sobre un gel de acrilamida al 20% no desnaturalizante, preparado de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Los oligos se visualizan con bromuro de etidio bajo luz UV.

En general, los ARNip que tienen secuencias específicas que se seleccionan para pruebas in vitro son específicos para humanos y una segunda especie, tales como genes de rata o de conejo.

Estabilidad a las exonucleasas

5 Para estudiar el efecto de estabilización de las unidades estructurales 3' no nucleótidos sobre una molécula de ácido nucleico, se incuban la cadena en sentido, la cadena antisentido y el dúplex de ARNip fusionado en extractos citosólicos preparados a partir de diferentes tipos celulares. A continuación se proporciona un protocolo para probar la estabilidad en células HCT116.

Extracto: extracto citosólico HCT116 (12 mg/ml).

Extract: HCT116 cytosolic extract (12mg/ml).

10 Regulador de extracto: Hepes 25 mM pH-7.3 a 37 °C; MgCl 8 mM; NaCl 150 mM con DTT 1 mM se añadió fresco inmediatamente antes de su uso.

15 Método: Se mezclaron 3.5 ml de ARNip de prueba (100 mM) con 46.5 ml contienen 120 mg de extracto citosólico de HCT116. Los 46.5 ml consisten en 12 ml de extracto de HCT116 y 34.5 ml del regulador de extracto suplementado con DTT y cóctel de inhibidores de proteasa/100 (Calbiochem, setIII-539134). La concentración final del ARNip en el tubo de incubación es de 7 mM. La muestra se incubó a 37°C, y en el momento indicado se movieron 5 ml a un tubo nuevo, se mezclaron con 15 ml de regulador de carga de 1XTBE-50% de glicerol y se congelaron instantáneamente en N2 líquido. La concentración final del ARNip en el regulador de carga es de 1.75 mM (21 ng de siARN/ml). Para análisis por PAGE nativo y tinción con EtBr se cargan 50 ng por línea. Para los análisis de Northern se cargaron 1ng de ARNip probado por línea. Otros tipos de células incluyen HeLa y células estrelladas hepáticas (HSC).

20 Los solicitantes han mostrado que las moléculas de ácido nucleico que incluyen el alquilo de terminal 3'; o excedente de derivados de alquilo presentan una estabilidad mejorada en comparación con las moléculas de ácido nucleico de extremos romos y moléculas de ácido nucleico que comprenden excedentes de nucleótidos 3'.

Compuestos ed ejemplo

25 Los compuestos de ARNip que comprenden unidades estructurales no nucleótidos unidas covalentemente al terminal 3' se sintetizaron y probaron como se ha descrito anteriormente. La Figura 2 proporciona una tabla de compuestos útiles en ARNi que comprende secuencias y modificaciones divulgadas aquí. Se sigue la leyenda de las modificaciones: un prefijo "z" indica una unidad estructural (nucleótido o no nucleótido) unida covalentemente al nucleótido terminal 3' o 5'. Por ejemplo, zdT se refiere a un excedente dT; zdT;zdT se refiere a un excedente dTdT. Un prefijo "y" indica una sustitución de nucleótidos, por ejemplo yLdA se refiere a una L-desoxirriboadenina sustituida por un ribonucleótido en la cadena en sentido o cadena antisentido; ydT se refiere a una desoxirribotimidina sustituida por un ribonucleótido en el oligonucleótido en sentido o antisentido. Un prefijo "m" se refiere a un ribonucleótido modificado con azúcar 2'OMe. Los códigos adicionales se exponen a continuación en la Tabla B.

30

Tabla B

Código	Descripción
Ra	riboadenosina-3'-fosfato; ácido 3'-adenílico
RC	ribocitidina-3'-fosfato; ácido 3'-citidílico
RG	riboguanosina-3'-fosfato; ácido 3'-guanílico
RU	ribouridina-3'-fosfato; ácido 3'-uridílico
mA	2'-O-metiladenosina-3'-fosfato; ácido 2'-O-metil-3'-adenílico
mC	2'-O-metilcitidina-3'-fosfato; ácido 2'-O-metil-3'-citidílico
mG	2'-O-metilguanosina-3'-fosfato; ácido 2'-O-metil-3'-guanílico
mU	2'-O-metiluridina-3'-fosfato; ácido 2'-O-metil-3'-uridílico
dA	desoxirriboadenosina-3'-fosfato; ácido 2'-desoxirribo-3'-adenílico
dC	desoxirribocitidina-3'-fosfato; ácido 2'-desoxirribo-3'-citidílico

ES 2 640 091 T3

Código	Descripción
dG	desoxirriboGuanosina-3'-fosfato; ácido 2'-desoxirribo-3'-guanílico
dT	timidina-3'-fosfato; ácido 3'-timidílico
rA2p	riboAdenosina-2'-fosfato; ácido 2'-adenílico
rC2p	ribocitidina-2'-fosfato; ácido 2'-citidílico
rG2p	riboguanosina-2'-fosfato; ácido 2'-guanílico
rU2p	ribouridina-2'-fosfato; ácido 2'-uridílico
LdA	L-desoxirriboAdenosina-3'-fosfato (imagen espejo dA)
LdC	L-desoxirribocitidina-3'-fosfato (imagen espejo dC)
LdG	L-desoxirriboGuanosina-3'-fosfato (imagen espejo dG)
LdT	L-desoxirribotimidina-3'-fosfato (imagen espejo dT)
DB	desoxirribosa-3'-fosfato abásico; 1,2-didesoxi-D-ribofuranosa-3-fosfato; 1,4-anhidro-2-desoxi-D-ribitol-3-fosfato
zidB	desoxirribosa-5'-fosfato abásico invertido en terminal; 5' = 5'-5' idAb; At 3' = 3'-3' idAb
P	5' fosfato
S	5' fosforotioato
\$	que carece de un enlazador 3' (utilizado junto con los nucleótidos anteriores en el extremo 3' de la secuencia)
3mN2p	3'-O-metil ribo-nucleótido-2'-fosfato
yC3p	sustituye un ribonucleótido con 3-Hidroxiopropano-1-fosfato
vdA	sustituye un ribonucleótido con desoxirriboAdenosina-3'-fosfato;
ydT	sustituye un ribonucleótido con desoxirriboTimidina-3'-fosfato;
ydU	sustituye un ribonucleótido con desoxiUridina
vLdA	sustituye un ribonucleótido con L-desoxirriboAdenosina-3'-fosfato
vLdC	sustituye un ribonucleótido con L-desoxirriboCitidina-3'-fosfato
yLdG	sustituye un ribonucleótido con L-desoxirriboGuanosina-3'-fosfato
ymA	sustituye un ribonucleótido con 2'-O-metilAdenosina-3'-fosfato;
ymC	sustituye un ribonucleótido con 2'-O-metilCitidina-3'-fosfato;
ymU	sustituye un ribonucleótido con 2'-O-metilUridina-3'-fosfato;
yrA	sustituye un ribonucleótido con riboAdenosina-3'-fosfato;
yrC	sustituye un ribonucleótido con riboCitidina-3'-fosfato;
yrG	sustituye un ribonucleótido con riboGuanosina-3'-fosfato;
yrU	sustituye un ribonucleótido con riboUridina-3'-fosfato;
zC3p	(CH ₂) ₃ -Pi= 3-Hidroxiopropano-1-fosfato (C3Pi)
zC3p;zC3p	(CH ₂) ₃ -Pi x2; =3-Hidroxiopropano-1-fosfato; (C3Pi-C3Pi)

ES 2 640 091 T3

Código	Descripción
zc3p;zc3p;zc3p	(CH ₂) ₃ -Pi x3; =3-Hidroxipropano-1-fosfato;(C3Pi-C3Pi-C3Pi)
zc3p;zc3ps	(CH ₂) ₃ -Pi; (CH ₂)-3'fosforotioato (C3Pi-C3Ps)
zC3p;zrB	(CH ₂) ₃ -Pi; ribo-Abásico-3'-Pi
zC3p;zrG	(CH ₂) ₃ -Pi_rG
zC6Np	Amino-C6-Fosfato
zC6Np;zrC;zrA	Amino-C6-Fosfato_rCrA
zdB;zdB	abasic desoxirribosa-3'-fosfato x2 (dAb-dAb)
ZdT	Desoxi-Timidina-3'-Fosfato
zdT;zdT	dTdT excedente en 3'
ZidB	desoxirribosa-5'-fosfato abásico invertido; At 5' = 5'-5' idAb; At 3' = 3'-3' idAb
ZidT	Desoxi-Timidina-5'-Fosfato Invertido
ZiLd	L-ADN invertido
ZirB	ribosa-5'-fosfato abásico invertido
zirB;zirB	ribosa-5'-fosfato x2 abásico invertido
zirB;zrC;zrA	ribosa-3'-fosfato_rCrA abásico invertido
ZLdA	L-desoxirriboAdenosina-3'-fosfato
ZLdC	L-desoxirriboCitidina-3'-fosfato
ZLdT	L-desoxirriboTimidina-3'-fosfato
ZmC	2'-O-metilcitidina-3'-etoxiFosfato
ZmU	2'-O-metiluridina-3'-etoxiFosfato
ZOle	Oleic acid
zrA;zrG	rArG
zrB;zrB	ribosa-3'-fosfato abásico x2
zrC;zrA	rC;rA
zrU;zrG	rUrG
zrU;zrU	rUrU

En las siguientes tablas, los códigos usados en la columna etiquetada "En sentido 5->3 Antisentido 5->3" son los códigos mostrados en la Tabla B. Las columnas etiquetadas como "modificaciones en sentido" y "modificaciones antisentido" proporcionan una breve descripción de las modificaciones de posición utilizadas en cada una de las cadenas en sentido y antisentido, por ejemplo 20-C3; C3 se refiere a un excedente de terminal 3' C3Pi-C3OH y 20-dTdT se refiere a un excedente de terminal 3' dTdT (comenzando en la posición 20 sobre un 19 -mer), 2,4,6,8,10,12,14,16,18-2'-OMe se refiere a ribonucleótidos modificados con azúcar 2'OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18.

5

Tabla 1

No.	Nombre del compuesto	Estabilidad en extracto de hHSC	En sentido 5->3 Antisentido 5->3	Modificaciones en sentido	Modificaciones antisentido
1	RAC1_2 _S710	<3h	rG;rA;rG;rU;rC;rC;rU;rG;r C;rA;rU;rC;rA;rU;rU;rU;r G;rA;rA\$	-	-
			rU;rU;rC;rA;rA;rA;rU;rG;r A;rU;rG;rC;rA;rG;rG;rA;r C;rU;rC\$		
2	RAC1_2 _S1231	6h-12h	rG;rA;rG;rU;rC;rC;rU;rG;r C;rA;rU;rC;rA;rU;rU;rU;r G;rA;rA;zc3p;zc3p\$	20-C3;C3	20-C3;C3
			rU;rU;rC;rA;rA;rA;rU;rG;r A;rU;rG;rC;rA;rG;rG;rA;r C;rU;rC;zc3p;zc3p\$		
3	RAC1_2 _S709	6h-12h	rG;rA;rG;rU;rC;rC;rU;rG;r C;rA;rU;rC;rA;rU;rU;rU;r G;rA;rA;zdT;zdT\$	20-dTdT	20-dTdT
			rU;rU;rC;rA;rA;rA;rU;rG;r A;rU;rG;rC;rA;rG;rG;rA;r C;rU;rC;zdT;zdT\$		
4	RAC1_2 _S1759	6h-12h	rG;rA;rG;rU;rC;rC;rU;rG;r C;rA;rU;rC;rA;rU;rU;rU;r G;rA;rA;zmU;zmU\$	20-mU;mU	20-mU;mU
			rU;rU;rC;rA;rA;rA;rU;rG;r A;rU;rG;rC;rA;rG;rG;rA;r C;rU;rC;zmU;zmU\$		

Los datos presentados en la Tabla 1 muestran que el excedente de terminal 3' C3Pi-C3OH (2) mejora la resistencia a la nucleasa de siRNA en extractos celulares en comparación con siRNA no modificado como (1). El efecto estabilizador del C3-C3 es similar a los excedentes de terminales 3' dTdT (3) and 2'OMe U (4). Las secuencias RAC1_2 se exponen en las SEQ ID NOS: 5 y 6.

5

Tabla 2

No	Nombre del compuesto	Estabilidad de la cadena en sentido en HCT116	En sentido 5->3 Antisentido 5->3 de patente	Modificaciones en sentido	Modificaciones antisentido
1	CAP2_4 _S1152	24h	rG;rC;rC;rA;rG;rA;rA;rU;rG;rU; rG;rG;rA;rA;rC;rU;rC;rC;rU;zc3 p;zc3p\$ rA;rG;rG;rA;rG;rU;rU;rC;rC;rA;	20-C3;C3	-(no modificado)

ES 2 640 091 T3

			rC;rA;rU;rU;rC;rU;rG;rG;rC\$		
2	CAP2_4 _S1153	24h	zidB;rG;rC;rC;rA;rG;rA;rA;rU;r G;rU;rG;rG;rA;rA;rC;rU;rC;rC;r U;zidB\$	0,20- cubrimiento- idAb	
			rA;rG;rG;rA;rG;rU;rU;rC;rC;rA; rC;rA;rU;rU;rC;rU;rG;rG;rC\$		
3	CAP2_4 _S710	1h	rG;rC;rC;rA;rG;rA;rA;rU;rG;rU; rG;rG;rA;rA;rC;rU;rC;rC;rU\$ rA;rG;rG;rA;rG;rU;rU;rC;rC;rA; rC;rA;rU;rU;rC;rU;rG;rG;rC\$	-	-

Los datos de la Tabla 2 muestran que el excedente terminal 3' C3-C3 (1) y una cadena que comprende unidades estructurales desoxi abásicas invertidas 5' y 3' (2) mejoran la resistencia a la nucleasa de la cadena en el extracto celular cuando se compara con la cadena no modificada (3). Las secuencias CASP2_4 se exponen en las SEQ ID NOS: 1 y 2.

5

Tabla 3

No.	Nombre del compuesto	IC50, nM	Estabilidad en extracto celular, horas (Fig 4)	En sentido 5->3 antisentido 5->3	Modificaciones en sentido	Modificaciones antisentido
1	RAC1_2_ S73	0.207		rG;mA;rG;mU;rC;m C;rU;mG ;rC ;mA;rU;mC;rA;mU; rU;m U;rG;m A;rA\$ mU;rU;mC;rA;mA;r A;mU;rG; m A;rU;mG;rC;mA;rG ;mG;rA; mC; rU;mC\$	2,4,6,8,10,12, 14,16,18-2'- OMe- 3'-Pi	1,3,5,7,9,11,13 15,17,19-2'- OMe-3'-Pi
2	RAC1_2_ S1005	0.067		rG;mA;rG;mU;rC;m C;rU;mG ;rC ;mA;rU;mC;rA;mU; rU;m U;rG;m A;rA;zidB\$ mU;rU;mC;rA;mA;r A;mU;rG; m A;rU;mG;rC;mA;rG ;mG;rA; mC; rU;mC;zidB\$	2,4,6,8,10,12, 14,16,18-2'- OMe- 3'-Pi;20- cubrimiento-idAb	1,3,5,7,9,11,13 15,17,19-2'- OMe-3'-Pi;20- cubrimiento- idAb

ES 2 640 091 T3

3	RAC1_2_S1154	0.082		rG;mA;rG;mU;rC;m C;rU;mG ;rC ;mA;rU;mC;rA;mU; rU;m U;rG;m A;rA;zc3p;zc3p\$ mU;rU;mC;rA;mA;r A;mU;rG; m A;rU;mG;rC;mA;rG ;mG;rA; mC; rU;mC;zc3p;zc3p\$	2,4,6,8,10,12, 14,16,18-2'- OMe- 3'-Pi;20-C3;C3	1,3,5,7,9,11,13 15,17,19-2'- OMe-3'-Pi;20 C3;C3
4	RAC1_2_S1156	0.174		rG;mA;rG;mU;rC;m C;rU;mG ;rC ;mA;rU;mC;rA;mU; rU;m U;rG;m A;rA\$ mU;rU;mC;rA;mA;r A;mU;rG; m A;rU;mG;rC;mA;rG ;mG;rA; mC; rU;mC;zc3p;zc3p\$	2,4,6,8,10,12, 14,16,18-2'- OMe- 3'-Pi	1,3,5,7,9,11,13 15,17,19-2'- OMe-3'-Pi;20 C3;C3
5	CASP2_4_S505	1.1	36	rG;rC;rC;rA;rG;rA;r A;rU;rG;r U; rG;rG;rA;rA;rC;rU;r C;LdC;rU\$ rA;mG;rG;mA;rG;m U;rU;mC ;rC ;rA;mC;rA;mU;rU; mC;rU ;mG;r G;mC\$	18-L-DNA-3'-Pi	2,4,6,8,11,13, 15,17,19-2'- OMe-3'-Pi
6	CASP2_4_S796	0.202		rG;rC;rC;rA;rG;rA;r A;rU;rG;r U; rG;rG;rA;rA;rC;rU;r C;LdC;rU\$ rA;mG;rG;mA;rG;m U;rU;mC ;rC ;rA;mC;rA;mU;rU; mC;rU ;mG;r G;mC;zdT;zdT\$	18-L-DNA-3'-Pi	2,4,6,8,11,13, 15,17,19-2'- OMe-3'-Pi;20- dTdT
7	CASP2_4_S800	0.169	36	rG;rC;rC;rA;rG;rA;r A;rU;rG;r U; rG;rG;rA;rA;rC;rU;r C;LdC;rU \$	18-L-DNA-3'-Pi	2,4,6,8,11,13, 15,17,19-2'- OMe-3'-Pi;20 C3;C3

				rA;mG;rG;mA;rG;mU;rU;mC ;rC ;rA;mC;rA;mU;rU;mC;rU ;mG;rG;mC;zc3p;zc3p\$		
8	CASP2__S802	0.216		rG;rC;rC;rA;rG;rA;rA;rU;rG;r U;rG;rG;rA;rA;rC;rU;rC;LdC;rU \$ rA;mG;rG;mA;rG;mU;rU;mC ;rC ;rA;mC;rA;mU;rU;mC;rU ;mG;rG;mC;zc3p;zc3p\$	18-L-DNA-3'-Pi	2,4,6,8,11,13,15,17,19-2'-OMe-3'-Pi;20-C3;rAb

5 Los datos proporcionados en la Tabla 3 muestran que 1) la introducción de unidades estructurales C3-C3 (3, 4 y 7), desoxi abásico invertido (2), C3-ribo abásico (8) en el extremo 3' de antisentido o en ambas cadenas antisentido y en sentido mejora la actividad siRNA en comparación con los compuestos de extremos romos (1 y 5) y es más activo que el mismo compuesto con excedentes 3' dTdT (6); y que 2) la actividad mejorada del compuesto que comprende el terminal 3' C3-C3 no se debe al aumento de la estabilidad en el extracto celular ya que ambos compuestos (5 y 7) son altamente estables (al menos 36 h).

Tabla 4

No.	Nombre del compuesto	concentración	% residual de ARNm diana	En sentido Antisentido 5->3	5->3 Modificaciones en sentido	Modificaciones antisentido
1	RAC1_2_S73	40 nM	25	rG;mA;rG;mU;rC;mC;rU ;mG;rC; mA;rU;mC;rA;mU;rU;m U;rG;m	2,4,6,8,10,12,14,16,18-2'-OMe-3'-Pi	1,3,5,7,9,11,13,15,17,19-2'- OMe-3'-Pi
		5nM	35	A;rA\$ mU;rU;mC;rA;mA;rA;m U;rG;m A;rU;mG;rC;mA;rG;mG; rA;mC;r U;mC\$		
2	RAC1_2_S1154	40 nM	12	rG;mA;rG;mU;rC;mC;rU ;mG;rC; mA;rU;mC;rA;mU;rU;m U;rG;m	2,4,6,8,10,12,14,16,18-2'- OMe-3'- Pi;20-C3;C3	1,3,5,7,9,11,13,15,17,19-2'- OMe-3'-Pi;20-C3;C3
		5nM	32	A;rA;zc3p;zc3p\$ mU;rU;mC;rA;mA;rA;m U;rG;m		

ES 2 640 091 T3

				A;rU;mG;rC;mA;rG;mG; rA;mC;r U;mC;zc3p;zc3p\$		
3	RAC1_2 _S1155	40 nM	32	rG;mA;rG;mU;rC;mC;rU ;mG;rC;	2,4,6,8,10,1 2,14,16,18-2'- OMe-3'- Pi;20- C3;C3	1,3,5,7,9,11,13,1 5,17,19-2'- OMe- 3'-Pi
		5nM	50	mA;rU;mC;rA;mU;rU;m U;rG;m A;rA;zc3p;zc3p\$ mU;rU;mC;rA;mA;rA;m U;rG;m A;rU;mG;rC;mA;rG;mG; rA;mC;r U;mC\$		
4	RAC1_2 _S1156	40 nM	24	rG;mA;rG;mU;rC;mC;rU ;mG;rC;	2,4,6,8,10,1 2,14,16,18-2'- OMe-3'- Pi	1,3,5,7,9,11,13,1 5,17,19-2'- OMe- 3'-Pi;20-C3;C3
		5nM	44	mA;rU;mC;rA;mU;rU;m U;rG;m A;rA\$ mU;rU;mC;rA;mA;rA;m U;rG;m A;rU;mG;rC;mA;rG;mG; rA;mC;r U;mC;zc3p;zc3p\$		

Los datos de la Tabla 4 muestran que el aumento de actividad más pronunciado se obtiene cuando C3C3 está presente en los terminales 3' de ambas cadenas antisentido y en sentido (2) comparado con el romo (1) y con C3-C3 en sólo una de las cadenas (3 o 4).

5

Tabla 5

No.	Nombre del compuesto	Concentración	% residual de ARNm diana	En sentido 5->3 Antisentido 5->3	Modificaciones en sentido	Modificaciones antisentido
1	CASP2_4_ S953	20nM	30	rG;rC;rC;rA;rG;rA;r A;rU;r	18-L-DNA-3'-Pi	2,4,6,8,11,13,1 5,17,19-2'-OMe-3'- Pi;20- C3;C3; Fosfato
		5nM	17	G;rU;rG;rG;rA;rA;r C;rU;r C;LdC;rU\$		
		1nM	13	rA;mG;rG;mA;rG;m U;rU; mC;rC;rA;mC;rA;m U;rU; mC;rU;mG;rG;mC; zc3p;zc 3p		
2	CASP2_4_ S1145	20nM	65	rG;rC;rC;rA;rG;rA;r A;rU;r	18-L-DNA-3'-Pi	2,4,6,8,11,13,1 5,17,19-2'-OMe-3'- Pi;20- C3
		5nM	43			

ES 2 640 091 T3

No.	Nombre del compuesto	Concentración	% residual de ARNm diana	En sentido 5->3 Antisentido 5->3	Modificaciones en sentido	Modificaciones antisentido
		1nM	26	G;rU;rG;rG;rA;rA;rC;rU;r C;LdC;rU\$ rA;mG;rG;mA;rG;mU;rU; mC;rC;rA;mC;rA;mU;rU; mC;rU;mG;rG;mC;zc3p\$		
3	CASP2_4_S1146	20nM	57	rG;rC;rC;rA;rG;rA;rA;rU;r	18-L-DNA-3'-Pi	2,4,6,8,11,13,15,17,19-2'-OMe-3'-Pi;20- C3;C3;C3
		5nM	43	G;rU;rG;rG;rA;rA;rC;rU;r C;LdC;rU\$		
		1nM	26	rA;mG;rG;mA;rG;mU;rU; mC;rC;rA;mC;rA;mU;rU; mC;rU;mG;rG;mC;zc3p;zc 3p;zc3p\$		
4	CASP2_4_S1147	20nM	48	rG;rC;rC;rA;rG;rA;rA;rU;r	18-L-DNA-3'-Pi	2,4,6,8,11,13,15,17,19-2'-OMe-3'-Pi;20- C3;C3-3'ps; Fosfato
		5nM	26	G;rU;rG;rG;rA;rA;rC;rU;r C;LdC;rU\$		
		1nM	13			
5	CASP2_4_S505	20nM	52	rA;mG;rG;mA;rG;mU;rU; mC;rC;rA;mC;rA;mU;rU;	18-L-DNA-3'-Pi	2,4,6,8,11,13,15,17,19-2'-OMe-3'-Pi
		5nM	48	mC;rU;mG;rG;mC;zc3p;zc 3ps		
		1nM	22	rG;rC;rC;rA;rG;rA;rA;rU;r G;rU;rG;rG;rA;rA;rC;rU;r C;LdC;rU\$ rA;mG;rG;mA;rG;mU;rU; mC;rC;rA;mC;rA;mU;rU; mC;rU;mG;rG;mC\$		

Los datos de la Tabla 5 muestran que 1) la presencia de una unidad estructural C3OH (2) o C3Pi-C3Pi-C3OH (3) en la cadena antisentido no mejora la actividad comparada con ARNip romo (5) y 2) la presencia de unidades estructurales

C3Pi-C3Pi (1) y C3Pi-C3Ps (4) en la cadena antisentido mejora la actividad en comparación con los compuestos de extremos romos y el efecto es más pronunciado con C3Pi-C3Pi.

Tabla 6

No.	Nombre del compuesto	Concentración	% residual de ARNm diana	En sentido 5->3 Antisentido 5->3	Modificaciones en sentido	Modificaciones antisentido
1	CASP2_25_ S1005	50	15	rG;mA;rA;mU;rG;mU;rG;m G;rA;	2,4,6,8,10,1 2,14,16,18-2'- OMe-3'-Pi;20- cubrimiento- idAb	1,3,5,7,9,11,13 ,15,17,19-2'- OMe-3'-Pi;20- cubrimiento- idAb
		20	35	mA;rC;mU;rC;mC;rU; mC;r A;mA; rC;zidB\$		
		5	45	mG;rU;mU;rG;mA;rG; mG;r A;mG ;rU;mU;rC;mC;rA;m C;rA;mU;rU; mC;zidB\$		
2	CASP2_25_ S1006	50	38	rG;mA;rA;mU;rG;mU;rG;m G;rA;	2,4,6,8,10,1 2,14,16,18-2'- OMe-3'-Pi;20- cubrimiento- idAb	1,3,5,7,9,11,13 ,15,17,19-2' - OMe-3'-Pi
		20	38	mA;rC;mU;rC;mC;rU; mC;r A;mA; rC;zidB\$		
		5	81	mG;rU;mU;rG;mA;rG; mG;r A;mG ;rU;mU;rC;mC;rA;m C;rA;mU;rU; mC\$		
3	CASP2_25_ S1007	50	24	rG;mA;rA;mU;rG;mU;rG;m G;rA;	2,4,6,8,10,1 2,14,16,18-2'- OMe-3'-Pi	1,3,5,7,9,11,13 ,15,17,19-2'- OMe-3'-Pi;20- cubrimiento- idAb
		20	46	mA;rC;mU;rC;mC;rU; mC;r A;mA; rC\$		
		5	96	mG;rU;mU;rG;mA;rG; mG;rA;mG ;rU;mU;rC;mC;rA;m C;rA;mU;rU; mC;zidB\$		
4	CASP2_25_ S73	50	20	rG;mA;rA;mU;rG;mU;rG;m G;rA;	2,4,6,8,10,1 2,14,16,18-2'- OMe-3'-Pi	1,3,5,7,9,11,13 ,15,17,19-2' - OMe-3'-Pi
		20	56	mA;rC;mU;rC;mC;rU; mC;r A;mA; rC\$		
		5	64	mG;rU;mU;rG;mA;rG; mG;r A;mG ;rU;mU;rC;mC;rA;m C;rA;mU;rU; mC\$		

- 5 Los datos de la tabla 6 muestran que un compuesto con una unidad estructural desoxi abásica invertida tanto en la cadena en sentido como en la de antisentido (1) era más activo que el compuesto de extremo romo (4) o un compuesto con abásico invertido en una de las cadenas (2 o 3).

Tabla 7

No.	Nombre del compuesto	Concentración	% residual de ARNm diana	En sentido 5->3 Antisentido 5->3	Descripción en sentido	Descripción Antisentido
1	CASP2_4_ S1001	50	18	rG;mC;rC;mA;rG;mA;rA; mU;rG;mU;rG;mG;rA;m A;rC; mU;rC;	2,4,6,8,10,12, 14,16,18-2'- OMe-3'- Pi;20- cubrimiento-idAb	2,4,6,8,11,13, 15,17,19-2'- OMe-3'-Pi
		20	22			
		5	43	mC;rU;zidB\$ rA;mG;rG;mA;rG;mU;rU; mC;r C;rA;mC;rA;mU;rU;mC;r U;mG; rG;mC\$		
2	CASP2 4 S1002	50	28	rG;mC;rC;mA;rG;mA;rA; mU;rG;mU;rG;mG;rA;m A;rC; mU;rC; mC;rU\$	2,4,6,8,10,12, 14,16,18-2'- OMe-3'-Pi	2,4,6,8,11,13, 15,17,19-2'- OMe-3'- Pi;20- cubrimiento- idAb
		20	35			
		5	50	rA;mG;rG;mA;rG;mU;rU; mC;rC;rA;mC;rA;mU;rU; mC;r U;mG; rG;mC;zidB\$		
3	CASP2_4_ S1000	50	16	rG;mC;rC;mA;rG;mA;rA;	2,4,6,8,10,12, 14,16,18-2'- OMe-3'- Pi;20- cubrimiento-idAb	2,4,6,8,11,13, 15,17,19-2'- OMe-3'- Pi;20- cubrimiento- idAb
		20	21	mU;rG ;mU;rG;mG;rA;m A;rC;mU;rC;mC;rU;zidB		
		5	44	rA;mG;rG;mA;rG;mU;rU; mC;rC;rA;mC;rA;mU;rU; mC;rU;mG;rG;mC;zidB\$		
4	CASP2_4_ S1003	50	11	zidB;rG;rC;rC;rA;rG;rA;r A;rU;rG;rU;rG;rG;rA;rA;r C;rU;r C;rC;r	0,20-cubrimiento- idAb	2,4,6,8,11,13, 15,17,19-2'- OMe-3'- Pi;20- cubrimiento- idAb
		20	18	U;zidB\$ rA;mG;rG;mA;rG;mU;rU; mC;rC;rA;mC;rA;mU;rU; mC;r U;mG; rG;mC;zidB\$		
		5	26			
5	CASP2_4_ S1004	50	23	zidB;rG;rC;rC;rA;rG;rA;r A;rU;rG;rU;rG;rG;rA;rA;r C;rU;r C;rC;r U;zidB\$	0,20-cubrimiento- idAb	2,4,6,8,11,13, 15,17,19-2'- OMe-3'-Pi
		20	36	rA;mG;rG;mA;rG;mU;rU; mC;rC;rA;mC;rA;mU;rU; mC;r U;mG; rG;mC\$		
		5	32			

Los datos en la Tabla 7 muestran que los compuestos de ARN de doble cadena que tienen una cobertura terminal (unidad estructural desoxiábrica invertida) tanto en el terminal 3' de la cadena antisentido como en el terminal 3' de la cadena en sentido muestran una actividad mejorada en comparación con un compuesto de ARNbc que tiene una cobertura terminal 3' unida covalentemente al terminal 3' de la cadena antisentido (comparar los compuestos 2 y 3 y los compuestos 4 y 5).

5

Tabla 8

No	Nombre del compuesto	Concentración	% residual de ARNm diana	En sentido 5->3 Antisentido 5->3	Descripción en sentido	Descripción antisentido
1	Myd88_1 1_S1262	20nM	7	rG;rA;rA;rU;rG;rU;rG;rA;rC ;rU;rU;rC;rC;rA;rG2p;rA2p ;rC2p;rC2p;rA\$	15,16,17,18-2'- 5'-puente	1,4,5,6,9,12, 13,15,17,18, 19-2'-OMe-3'- Pi;20-C3;C3
		5nM	7			
		1nM	20			
		0.5nM	16			
		0.1nM	45	mU;rG;rG;mU;mC;mU;rG; rG;mA;rA;rG;mU;mC;rA; mC;rA;mU;mU;mC;zc3p;z c3p\$		
2	Myd88_1 1_S1266	20nM	11	rG;rA;rA;rU;rG;rU;rG;rA;r C;rU;rU;rC;rC;rA;rG2p;rA	15,16,17,18,1 9-2'-5'-puente; Fosfato	1,4,5,6,9,12, 13,15,17,18, 19-2'-OMe-3'- Pi;20-C3;C3
		5nM	11	2p;rC2p;rC2p;rA2p		
		1nM	9			
		0.5nM	10			
		0.1nM	126	mU;rG;rG;mU;mC;mU;rG; rG;mA;rA;rG;mU;mC;rA; mC;rA;mU;mU;mC;zc3p;z c3p\$		
3	Myd88_1 1_S1270	20nM	5	zc3p;rG;rA;rA;rU;rG;rU;rG ;rA;rC;rU;rU;rC;rC;rA;rG2	15,16,17,18,1 9-2'-5'- puente;0- cubrimiento- C3; fosfato	1,4,5,6,9,12, 13,15,17,18, 19-2'-OMe-3'- Pi;20-C3;C3
		5nM	6	p;rA2p;rC2p;rC2p;rA2p		
		1nM	10			
		0.5nM	31			
		0.1nM	47	mU;rG;rG;mU;mC;mU;rG;		

ES 2 640 091 T3

No	Nombre del compuesto	Concentración	% residual de ARNm diana	En sentido 5->3 Antisentido 5->3	Descripción en sentido	Descripción antisentido
				rG;mA;rA;rG;mU;mC;rA; mC;rA;mU;mU;mC;zc3p;z c3p\$		
4	Myd88_1 1_S1274	20nM	6	zc6Np;rG;rA;rA;rU;rG;rU;r G;rA;rC;rU;rU;rC;rC;rA;rG 2p;rA2p;rC2p;rC2p;rA2p	15,16,17,18,1 9-2'-5'- puente;0- cubrimiento- AmC6; Fosfato	1,4,5,6,9,12, 13,15,17,18, 19-2'-OMe-3'- Pi;20-C3;C3
		5nM	8			
		1nM	15			
		0.5nM	22	mU;rG;rG;mU;mC;mU;rG;		
		0.1nM	63	rG;mA;rA;rG;mU;mC;rA; mC;rA;mU;mU;mC;zc3p;z c3p\$		
5	Myd88_1 1_S1276	20nM	11	rG;rA;rA;rU;rG;rU;rG;rA;r C;rU;rU;rC;rC;rA;rG;rA;rC ; rC;rA\$	-	1,4,5,6,9,12, 13,15,17,18, 19-2'-OMe-3'- Pi;20-C3;C3
		5nM	20			
		0.5nM	57	mU;rG;rG;mU;mC;mU;rG; rG;mA;rA;rG;mU;mC;rA; mC;rA;mU;mU;mC;zc3p;z c3p\$		
6	Myd88_1 1_S1159	20nM	12	zidB;rG;rA;rA;rU;rG;rU;rG ; rA;rC;rU;rU;rC;rC;rA;rG2 p;rA2p;rC2p;rC2p;rA\$	15,16,17,18-2'- 5'-puente;0- cubrimiento- idAb	1,4,5,6,9,12, 13,15,17,18, 19-2'-OMe-3'- Pi;20-C3;C3
		5nM	9			
		1nM				
		0.5nM	24	mU;rG;rG;mU;mC;mU;rG;		
		0.1nM	57	rG;mA;rA;rG;mU;mC;rA; mC;rA;mU;mU;mC;zc3p;z c3p\$		
7	Myd88_1 1_S1224	20nM	6	zc3p;rG;rA;rA;dT;rG;dT;r G;rA;dC;dT;dT;dC;dC;rA;r G;rA;dC;dC;rA\$	4,6,9,10,11,12 13,17,18- DNA-3'-Pi;0- cubrimiento-C3	1,4,5,6,9,12, 13,15,17,18, 19-2'-OMe-3'- Pi;20-C3;C3
		5nM	13			
		1nM	33			
		0.5nM	37	mU;rG;rG;mU;mC;mU;rG;		
		0.1nM	88	rG;mA;rA;rG;mU;mC;rA; mC;rA;mU;mU;mC;zc3p;z c3p\$		
8	RAC1_2 S1324	20nM	39	rG;mA;rG;mU;rC;mC;rU;	2,4,6,8,10,12, 14,16,18-2'- OMe-3'-Pi;20- C3;C3	1,3,5,7,9,11, 13,15,17,19- 2'-OMe-3'-
		5nM	21			
		1.25nM	9			

No	Nombre del compuesto	Concentración	% residual de ARNm diana	En sentido 5->3 Antisentido 5->3	Descripción en sentido	Descripción antisentido
		0.31nM	27	mG;rC;mA;rU;mC;rA;mU; rU;mU;rG;mA;rA;zc3p;zc3p\$ mU;rU;mC;rA;mA;rA;mU; rG;mA;rU;mG;rC;mA;rG; mG;rA;mC;rU;mC;zc3p;zc3p		Pi;20-C3;C3; Fosfato
9	RAC1_2_S1323	20nM	68	rG;mA;rG;mU;rC;mC;rU;	2,4,6,8,10,12, 14,16,18-2'- OMe-3'-Pi	1,3,5,7,9,11, 13,15,17,19- 2'-OMe-3'-
		5nM	26	mG;rC;mA;rU;mC;rA;mU; rU;mU;rG;mA;rA\$		Pi;20-C3;C3; Fosfato
		1.25nM	10	mU;rU;mC;rA;mA;rA;mU;		
		0.31nM	6	rG;mA;rU;mG;rC;mA;rG; mG;rA;mC;rU;mC;zc3p;zc3p		

Los datos de la Tabla 8 muestran que los compuestos de ARN de doble cadena que comprenden un excedente C3Pi-C3OH de terminal 3' unido covalentemente al terminal 3' de la cadena antisentido (cadena guía) (Z = dos unidades estructurales C3) muestran una actividad excelente (más del 80% de anulación a 20 nM) independientemente de las modificaciones en la cadena en sentido complementaria (véanse los compuestos 1-7).

Los compuestos 1-7 utilizan las secuencias expuestas en las SEQ ID NOS: 3 y 4 y comprenden una cadena antisentido común (SEQ ID NO: 4) que incluye dos unidades estructurales C3 de terminal 3' (C3Pi-C3OH) unidas covalentemente al nucleótido en terminal 3' y diferentes cadenas en sentido que incluyen diversas modificaciones divulgadas en la presente solicitud. La cadena en sentido del compuesto 1 incluye ribonucleótidos no modificados en las posiciones 1-14 y 19 y ribonucleótidos 2'5' en las posiciones 15-18. La cadena en sentido del compuesto 2 incluye ribonucleótidos no modificados en las posiciones 1-14 y ribonucleótidos 2' 5' en las posiciones 15-19 e incluye un fosfato terminal (P(O)3). La cadena en sentido del compuesto 3 incluye ribonucleótidos no modificados en las posiciones 1-14 y ribonucleótidos 2' 5' en las posiciones 15-19 e incluye un C3Pi de terminal 3'. La cadena en sentido del compuesto 4 incluye ribonucleótidos no modificados en las posiciones 1-14 y ribonucleótidos 2' 5' en las posiciones 15-19 e incluye una unidad estructural amino C6 de terminal 3' unida covalentemente al nucleótido en terminal 3'. La cadena en sentido del compuesto 5 incluye ribonucleótidos no modificados en las posiciones 1-19 (cada N' está sin modificar). La cadena en sentido del compuesto 6 incluye ribonucleótidos no modificados en las posiciones 1-14 y 19 y ribonucleótidos 2'5' en las posiciones 15-18 e incluye una unidad estructural abásica invertida de terminal 3' unida covalentemente al nucleótido terminal 3'. La cadena en sentido del compuesto 7 incluye ribonucleótidos no modificados en las posiciones 1-3, 5, 7-8, 14-16 y 19 y desoxirribonucleótidos en las posiciones 4, 6, 9, 10-13 y 17-18 e incluye un fosfato de terminal 3' (Pi) y una unidad estructural C3OH unida covalentemente en el terminal 5' de la unidad estructural abásica invertida unida covalentemente al nucleótido de terminal 3'.

El compuesto 9 que tiene dos unidades estructurales C3 unidas covalentemente al terminal 3' de la cadena en sentido y de la cadena antisentido es más activo que un compuesto similar (8) que tiene dos unidades estructurales C3 unidas covalentemente al terminal 3' de la cadena antisentido.

Ejemplo 2: Suministro de moléculas de ácido nucleico modificadas que direccionan CASP2 a la retina.

Evaluación del suministro de ARNip de la célula diana, actividad de anulación del gen de células diana y especificidad de la escisión de ARNm del gen diana

La anulación del gen diana se mide en tejido objetivo, por ejemplo después de inyección intravítrea en la retina de rata.

ES 2 640 091 T3

Se realizaron diferentes modificaciones estructurales de fondo en el ARNip direccionado al gen CASP2, que se someten a pruebas de resistencia a la exonucleasa. El objetivo de este estudio es examinar la distribución in vivo y la actividad de los oligonucleótidos incluyendo estas modificaciones como se describe a continuación.

S1003 inv-dAb-GCCAGAAUGUGGAACUCCU-inv-dAb

5 AGGAGUCCACAUUCUGGC-inv-dAb

S800 GCCAGAAUGUGGAACUCCU

AGGAGUCCACAUUCUGGC-C3Pi-C3OH

10 Descripción del material de prueba (S1003): dúplex de ARN con la siguiente estructura: cadena en sentido no modificado 19 mer con abásico invertido como cobertura en 5' y 3'. Cadena antisentido de 19-mer con 2'O-Me en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19 y con abásico invertido como cobertura en 3', fusionado. Cantidad suministrada: 336 µg Condiciones de almacenamiento: -80 °C

15 Descripción del material de prueba (S800): Dúplex de ARN con la siguiente estructura: Cadena en sentido 19-mer con LADN en la posición 18. Cadena antisentido 19-mer con 2'OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19 y dos (CH₂)₃ propanodiol en el terminal 3' (C3Pi-C3OH). Cantidad suministrada: 840 µg. Condiciones de almacenamiento: -80 °C

CNL: dúplex de ARN que tiene las mismas modificaciones que S800 sin una unidad estructural C3Pi-C3OH unida al terminal 3'.

Animales: Edad: 6-8 semanas de edad, ratas macho. 180-220 gr

Tamaño del grupo: n = 4/10; Número total de animales: 112

20 Cría de animales: Dieta: Se proporcionó a los animales una dieta comercial ad libitum para roedores (dieta de Harlan Teklad para roedores), y libre acceso al agua potable.

Entorno:

i) Aclimatización de al menos 5 días.

25 ii) Todos los animales estuvieron confinados en una instalación de acceso limitado con condiciones de vivienda ambientalmente controladas durante todo el período de estudio, y se mantuvieron de acuerdo con los procedimientos operativos estándar aprobados (SOPs) de HBI. Las condiciones ambientales controladas automáticamente se ajustan para mantener la temperatura entre 20 y 24 °C con una humedad relativa (RH) de 30-70%, un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad y 15-30 cambios de aire/hora en el cuarto de estudio. La temperatura, RH y el ciclo de luz fueron controlados por el ordenador de control.

30 El DISEÑO EXPERIMENTAL se proporciona en la Tabla 2-1

Grupo No.	Ruta de suministro Unilateral (LE)	Tipo de ARNip	Régimen de dosis µg/10µl/ojo	Punto en el tiempo (Días)	Tamaño del grupo
I	IVT	S1003	20 µg/10µl	1	4
II	IVT	S1003	20 µg/10µl	3	4
III	IVT	S1003	20 µg/10µl	7	4
IV	IVT	S800	20 µg/10µl	1	10
V	IVT	S800	20 µg/10µl	3	10
VI	IVT	S800	20 µg/10µl	7	10
VII	IVT	CNL	20 µg/10µl	1	10
VIII	IVT	CNL	20 µg/10µl	3	10

IX	IVT	CNL	20 µg/10µl	7	10
X	IVT	Vehicle	10µl	1	10
XI	IVT	Vehicle	10µl	3	10
XII	IVT	Vehicle	10µl	7	10
XIII	Intact	-N/A	-N/A	N/A	10

5 Diseño del estudio: Todos los animales de los grupos experimentales I-XII se inyectaron IVT unilateralmente en el Ojo Izquierdo (LE)) a dosis de 20 µg de artículo de prueba o control (CNL) en 10 µl de vehículo PBS o vehículo de 10 µl solamente. El grupo experimental XIII se utilizará como control intacto. La etapa de terminación se realizará de acuerdo con el diseño del estudio (1 día, 3 días y 7 días después del tratamiento con IVT).

10 Anestesia: Los animales se anestesiaron con un sistema de circuito especial de isoflurano (Stoelting, EE.UU.). Las pupilas se dilatarán con gotas para los ojos Mydramid (tropicamide al 0.5%). Para anestesia tópica adicional, se utilizará Localin (CLORIDRATO DE OXIBUPROCAINA al 0,4%). La solución oftálmica Lacromicina (Sulfato de Gentamicina (equivalente a base de Gentamicina al 0,3%) para prevenir o disminuir el proceso inflamatorio post-cirugía.

15 La inyección intravítrea se realizó bajo un microscopio de disección. Se utilizó una aguja de calibre 30/33 para hacer una incisión de punzón de 1 mm posterior al limbo temporal, y se insertó una aguja de jeringa (jeringa de insulina de calibre 30/33 0.3 ml, PIC 0,8 mm, Italia) a través de la incisión, 1,5 mm de profundidad, como se observa a través de la pupila dilatada.

20 Eutanasia programada Todos los animales fueron anestesiados profundamente (Equithesin 4 ml/kg I.P) y sacrificados (decapitados) de acuerdo con el diseño del estudio (Tabla, Terminación).

25 Recolección de tejidos: Ambos ojos de todos los animales fueron enucleados y almacenados en hielo. Los ojos serán disecados usando un microscopio, y las patologías macroscópicas se clasificarán de acuerdo con la escala de clasificación de la muestra (véase el apéndice 5 para la "puntuación de patología ocular"). La córnea se pinchará usando una aguja 27/30G, para eliminar el humor acuoso de la cámara anterior. Usando una cuchilla microquirúrgica, se realizará un corte a lo largo del limbo, y se retirará la córnea y la lente. El ocular restante se abrirá mediante un corte sagital a través de la esclerótica. La retina se extraerá del ocular, se enjuaga en PBS y se separa. Mediante pinzas de punta fina la retina se recogerá en el tubo de ensayo apropiado, se congelará en nitrógeno líquido y se transferirá a la Unidad de Biología Molecular para la extracción del ARN total.

30 Evaluación

La actividad de anulación del ARNip que direcciona CASP2 en la retina de rata se determinó mediante la cuantificación del nivel de expresión de CASP2 ARNm utilizando el método qPCR. El sitio de escisión CASP2_4 ARNip en el gen diana se verificará por RACE y la cuantificación de ARNip en la retina fue realizada por S&LP qPCR (qPCR de tallo y bucle).

35 Muestras de aislamiento de ARN: ARN se procesó a partir de muestras de retina de acuerdo con procedimientos estándar para el aislamiento de ARN total con EZARN, por doble extracción. Cuantificación de CASP2_4 ARNip por qPCR: El suministro de la CASP2_4 ARNip en la retina se midió por cuantificación de ARNip qPCR. qPCR se realizó de acuerdo con métodos estándar utilizando el método SYBR Green en Applied Biosystem 7300 PCR System. La escisión dirigida a CASP2_4 ARNip de ARNm CASP2 en retina de rata se determinó mediante la detección del producto de escisión utilizando el método RACE (Amplificación Rápida de Extremos de cADN) en los respectivos grupos experimentales. Si se muestra la evidencia del producto de escisión esperado, se verificará el sitio de escisión del ARNip en el gen diana mediante análisis de secuencia y opcionalmente se cuantificará el producto de escisión utilizando qPCR. Cuantificación de CASP2 ARNm por qPCR: después de cADN se prepara la anulación de CASP2 se verificará por cuantificación de CASP2 ARNm mediante qPCR. qPCR se llevará a cabo de acuerdo con métodos estándar utilizando el método SYBR Green en Applied Biosystem 7300 PCR System.

Resultados preliminares

Los resultados preliminares indican que el S800 se absorbe más eficientemente en las células de la retina que el S1003. Los resultados se muestran en la Tabla 2-2, a continuación

Tabla 2-2

ES 2 640 091 T3

Ojo	Estructura	Días	N	Media	DEst
Izquierdo	CASP2_4_S1003	1	4	3.54	5.29
	CASP2_4_S1003	3	4	0.44	0.67
	CASP2_4_S1003	7	4	0.27	0.17
	CASP2_4_S800	1	10	26.16	17.65
	CASP2_4_S800	3	10	1.52	1.93
	CASP2_4_S800	7	10	0.81	0.74
	CASP2_4_CNL	1	10	2.53	2.31
	CASP2_4_CNL	3	10	1.06	0.76
	CASP2_4_CNL	7	9	0.10	0.08
Derecho	CASP2_4_S1003	1	4	0.01	0.00
	CASP2_4_S1003	3	3	0.01	0.00
	CASP2_4_S1003	7	4	0.02	0.02
	CASP2_4_S800	1	10	0.14	0.26
	CASP2_4_S800	3	10	0.18	0.41
	CASP2_4_S800	7	10	0.10	0.09
	CASP2_4_CNL	1	10	0.05	0.07
	CASP2_4_CNL	3	10	0.01	0.01
	CASP2_4_CNL	7	9	0.01	0.01

Ejemplo 3: Suministro de moléculas de ácido nucleico modificadas que direccionan MYD88 a la retina.

Evaluación del suministro de ARNip de células diana

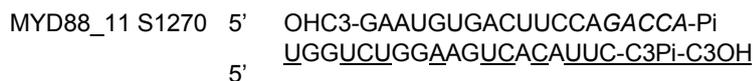
Los objetivos del estudio son:

- 5
 - 1.1 Determinar el suministro de ARNip MYD88_11 de diferentes estructuras y modificaciones a la retina de rata 4 horas, un día y tres días después de las inyecciones intravítreas (IVT) unilaterales.
 - 1.2 Determinar la actividad de anulación del ARNip de MYD88_11 de diferentes estructuras que direccionan MYD88 mediante qPCR del ARNm MYD88 después de la inyección de IVT en los ojos de rata 4 horas, un día y tres días después de las inyecciones de IVT.
- 10 Las modificaciones estructurales diferentes de fondo se realizaron en el ARNip dirigido al gen CASP2, que se someten a pruebas de resistencia a la exonucleasa. El objetivo de este estudio es examinar la distribución in vivo de oligonucleótidos de ARN de doble cadena con modificaciones como se divulga aquí, específicamente las modificaciones descritas a continuación.

MYD88_11 S505 5' GAAUGUGACUCCAGACcA
 UGGUCUGGAAGUCACAUUC
 5'

MYD88_11 S1159 5' idAb-GAAUGUGACUCCAGACCA
 UGGUCUGGAAGUCACAUUC-C3Pi-C3OH
 5'

ES 2 640 091 T3



Descripción del material de prueba S505: dúplex de ARN con la siguiente estructura: Cadena en sentido no modificado 19 mer con una unidad estructural de L-ADN en la posición 18 (minúscula en negrita).

5 Cadena antisentido 19-mer con 2'O-Me en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19 Fusionado. Condiciones de almacenamiento: -80 ° C

Descripción del material de prueba S1159: dúplex de ARN con la siguiente estructura: cadena en sentido 19-mero con abásico invertido como cobertura en 5' y ARN puenteado en 2'-5' en las posiciones 15-18. La cadena antisentido es un 19-mer con 2' O-Me en las posiciones 1, 4-6, 9, 12-13, 15, 17-19 y dos uniones constitutivas del enlace 1,3-propanodiol por enlace fosfodiéster en el extremo 3'). Fusionado. Condiciones de almacenamiento: -80 ° C.

10 Descripción del material de prueba S1270: dúplex de ARN con la siguiente estructura: Cadena en sentido 19-mer con nucleótidos 2'5' en las posiciones 15-19 y un fosfato terminal (Pi). Cadena antisentido 19-mer con 2'OMe en las posiciones 1, 4, 5, 6, 9, 12, 13, 15, 17-19 y dos (CH₂)₃ propanodiol en el extremo 3' (C3Pi-C3OH). Fusionado. Condiciones de almacenamiento: -80 ° C.

Animales: Edad: 8-10 semanas de edad ratas macho. 180-220gr

15 Tamaño del grupo: n = 4/8; Número total de animales: 104

Cria de animales: Dieta: Se proporcionó a los animales una dieta comercial ad libitum para roedores (dieta Harlan Teklad para roedores) y acceso libre al agua potable.

Entorno:

i) Aclimatización de al menos 5 días.

20 ii) Todos los animales fueron confinados en instalaciones de acceso limitado con condiciones ambientales de vivienda controladas durante todo el período de estudio y mantenidos de conformidad con los procedimientos operativos estándar (SOPs) aprobados por la HBI. Las condiciones ambientales controladas automáticamente se establecen para mantener la temperatura entre 20 y 24 °C con una humedad relativa (RH) de 30-70%, un ciclo de 12 horas luz/12 horas oscuridad y 15-30 cambios de aire/hora en el cuarto de estudio. La temperatura, RH y el ciclo de luz fueron controlados por el ordenador de control.

25

Diseño del estudio: Todos los animales de los grupos experimentales 1-12 fueron inyectados IVT unilateralmente en el Ojo Izquierdo (LE)) a una dosis de 20 µg del artículo de prueba o sólo 10 µl de vehículo PBS. El grupo experimental 13 se usó como control intacto. La etapa de terminación se realizó de acuerdo con el diseño del estudio (4 horas, 1 día y 7 días después del tratamiento con IVT).

30 El DISEÑO EXPERIMENTAL se proporciona en la Tabla 3-1

Tabla 3-1

Grupo No.	Ruta de suministro Unilateral (LE)	Tipo de ARNip	Régimen de dosis µg/10µl/ojo	Punto en el tiempo (Días)	Tamaño del grupo
1	IVT	µYD88_11_S505	20 µg/10µl	4	8
2	IVT	µYD88_11_S505	20 µg/10µl	24	8
3	IVT	µYD88_11_S505	20 µg/10µl	168	8
4	IVT	µYD88_11_S1159	20 µg/10µl	4	8
5	IVT	µYD88_11_S1159	20 µg/10µl	24	8

6	IVT	μ YD88_11_S1159	20 μ g/10 μ l	168	8
7	IVT	μ YD88_11_S1270	20 μ g/10 μ l	4	8
8	IVT	μ YD88_11_S1270	20 μ g/10 μ l	24	8
9	IVT	μ YD88_11_S1270	20 μ g/10 μ l	168	8
10	IVT	PBS	10 μ l	4	8
11	IVT	PBS	10 μ l	24	8
12	IVT	PBS	10 μ l	168	8
13	Intact	-N/A	-N/A	N/A	8

5 Diseño del estudio: Todos los animales de los grupos experimentales 1-12 fueron inyectados IVT unilateralmente en el Ojo Izquierdo (LE)) a una dosis de 20 μ g del artículo de ensayo o sólo 10 μ l de vehículo PBS. El grupo experimental 13 se usó como control intacto. La etapa de terminación se realizó de acuerdo con el diseño del estudio (4 horas, 1 día y 7 días después del tratamiento con IVT).

10 Anestesia: Los animales se anestesiaron con un sistema de circuito especial de isoflurano (Stoelting, EE.UU.). Configuración de trabajo: 3-4,5% de Isoflurano en O₂ a una tasa de flujo de 600-800 ml/min de O₂. Las pupilas se dilataron con gotas oftálmicas Mydramid (tropicamida al 0,5%). Para la anestesia tópica adicional, se utilizará Localin (CLORHIDRATO DE OXIBUPROCAINA al 0,4%). La solución oftálmica Lacromycin (Sulfato de Gentamicina (equivalente a 0,3% de Gentamicina base) para prevenir o disminuir el proceso inflamatorio post-cirugía.

15 La inyección intravítrea se realizó bajo un microscopio de disección. Se utilizó una aguja de calibre 30/33 para hacer una incisión de punzón de 1 mm posterior al limbo temporal, y se insertó una aguja de jeringa (jeringa de insulina de calibre 30/33 de 0,3 ml, PIC 0,8 mm, Italia) a través de la incisión, 1,5 mm de profundidad, como se observa a través de la pupila dilatada.

20 Eutanasia programada Todos los animales fueron anestesiados profundamente (Equithesin 4 ml/kg I.P) y sacrificados (decapitados) de acuerdo con el diseño del estudio (Tabla, Terminación).

25 Recolección de tejidos: Ambos ojos de todos los animales fueron enucleados y almacenados en hielo. Los ojos serán disecados usando un microscopio, y las patologías macroscópicas se clasificarán de acuerdo con la escala de clasificación de la muestra (véase el apéndice 5 para la "Puntuación de patología ocular"). La córnea se pinchará usando una aguja 27/30G, para eliminar el humor acuoso de la cámara anterior. Usando una cuchilla microquirúrgica, se realizará un corte a lo largo del limbo, y se retirará la córnea y la lente. El ocular restante se abrirá mediante un corte sagital a través de la esclerótica. La retina se extraerá del ocular, se enjuaga en PBS y se separa. Mediante pinzas de punta fina, la retina se recogerá en el tubo de ensayo apropiado, se congelará en nitrógeno líquido y se extraerá el ARN total.

30 Evaluación

La cuantificación de ARN_{ip} en la retina se llevará a cabo por qPCR del tallo y el bucle (S&L) y la actividad de anulación de los ARNs que dirigen MYD88 en la retina de rata se determinará por la cuantificación del nivel de expresión de MYD88 ARN_m utilizando qPCR.

35 Aislamiento de ARN: El ARN se procesó a partir de muestras de retina de acuerdo con procedimientos estándar usando el kit EZ ARN.

Cuantificación de MYDD88 ARN_{ip} por qPCR: El suministro del MYDD88 ARN_{ip} en la retina se midió mediante la cuantificación de ARN_{sc} por qPCR (S&L). qPCR se realizó de acuerdo con procedimientos estándar utilizando el método SYBR Green en Applied Biosystem 7300 PCR System.

35 Cuantificación de MYDD88 ARN_m por qPCR: cADN se preparó utilizando procedimientos estándar y la anulación de MYDD88 se verificará por cuantificación de MYD88 ARN_m por qPCR. qPCR se realizará utilizando el método SYBR Green en Applied Biosystem 7300 PCR System.

RESULTADOS PRELIMINARES se proporcionan en la Tabla 3-2, a continuación.

Tabla 3-2

retina	Estructura	Terminación	Suministro	N	Media	D.E.	Mediana	Valor p.
Izquierda	MYD88_11_S1159	4	IVT	8	174	121	148	<.0001
	MYD88_11_S1270			8	442	219	466	
	MYD88_11_S505			8	52	38	38	
	MYD88_11_S1159	24		6	9	19	2	0.2928
	MYD88_11_S1270			5	37	74	5	
	MYD88_11_S505			8	2	3	0	
	MYD88_11_S1159	168		6	2	1	1	0.0034
	MYD88_11_S1270			5	3	2	2	
	MYD88_1_S505			6	0	0	0	
Derecha	MYD88_11_S1159	4	IVT	4	2	1	1	0.0015
	MYD88_11_S1270			0	*			
	MYD88_11_S505			7	0	0	0	
	MYD88_11_S1159	24		4	14	23	2	0.3023
	MYD88_11_S1270			5	6	10	2	
	MYD88_11_S505			6	0	0	0	
	MYD88_11_S1159	168		7	6	10	1	0.2943
	MYD88_11_S1270			4	3	2	2	
	MYD88_11_S505			7	0	0	0	

El suministro de los compuestos modificados con C3C3 (S1159 y S1270) a las células ganglionares de la retina fue significativamente mayor el suministro del compuesto que tiene extremos romos (S505) (véase datos proporcionados en la columna "Mediana". Los valores se dan como femtomolar).

5 Ejemplo 4: Sistemas modelo de insuficiencia renal aguda (ARF)

El ARF es un síndrome clínico caracterizado por un rápido deterioro de la función renal que ocurre en cuestión de días. Sin estar limitado por la teoría, la lesión renal aguda puede ser el resultado de una lesión de isquemia-reperusión renal, tal como una lesión de isquemia-reperusión renal en pacientes sometidos a cirugía mayor, tal como una cirugía cardiaca mayor. La característica principal de ARF es una disminución abrupta en la tasa de filtración glomerular (GFR), lo que resulta en la retención de residuos nitrogenados (urea, creatinina). Estudios recientes, apoyan que la apoptosis en los tejidos renales es prominente en la mayoría de los casos humanos de ARF. El sitio principal de la muerte celular apoptótica es el nefrón distal. Durante la fase inicial de lesión isquémica, la pérdida de integridad del citoesqueleto de actina conduce al aplastamiento del epitelio, con pérdida del borde del cepillo, pérdida de contactos de la célula focal y subsecuente desacoplamiento de la célula del sustrato subyacente.

15 Se realizó la prueba de un compuesto activo de ARNip usando un modelo animal para ARF inducida por isquemia-reperusión, como se indica en la publicación de solicitud de patente PCT No. WO/2009/044392.

20 Un ARNip existente puede ser ventajosamente modificado y ARNip futuro puede ser diseñado y producido para proporcionar moléculas de ácido nucleico activo. En un ejemplo no limitativo, los compuestos de ARNip que utilizan los pares de oligonucleótidos expuestos en las Tablas B (B1-B74), Tablas C (C1-C4) y Tablas D (D1-D34) de la Publicación de Patente PCT No. WO/2009/044392, en particular ARNip dirigidos a genes proapoptóticos específicos, en particular a los genes TP53BP2, LRDD, CYBA, ATF3, CASP2, HRK, CIQBP, BNIP3, MAPK8, MAPK14, RAC1, GSK3B, P2RX7, TRPM2, PARG, CD38, STEAP4, BMP2, CX43, TYROBP, CTGF y SPP1) y además incluyen y al menos un excedente 3' de acuerdo con la presente invención se prueban en el sistema modelo anterior y se ha encontrado que son protectores contra la reperusión de isquemia.

25 Ejemplo 5: Sistemas modelo de llagas por presión o úlceras por presión

30 Las llagas por presión o úlceras por presión, que incluyen úlceras diabéticas, son áreas de piel y tejido dañados que se desarrollan cuando la presión sostenida (generalmente desde una cama o silla de ruedas) corta la circulación a las partes vulnerables del cuerpo, especialmente la piel de las nalgas, las caderas y los talones. La carencia de flujo sanguíneo adecuado conduce a la necrosis isquémica ya la ulceración del tejido afectado. Las llagas por presión ocurren con mayor frecuencia en pacientes con sensibilidad disminuida o ausente o que están debilitados, emaciados, paralizadas o postradas en cama. Los tejidos sobre el sacro, isquía, los trocánteres mayores, el maléolo externo y los

talones son especialmente susceptibles; otros sitios pueden estar involucrados dependiendo de la situación del paciente.

La prueba de los inhibidores activos de la invención (tales como siARN) para el tratamiento de llagas por presión, úlceras y heridas similares se realiza en el modelo de ratón como se describe en Reid et al., J Surg. Res. 116: 172-180, 2004.

Un modelo de conejo adicional se describe por Mustoe et al, JCI, 1991. 87 (2): 694-703; Ahn and Mustoe, Ann P1 Surg, 1991. 24 (1): 17-23, y se utiliza para probar los compuestos de ARNip diseñados y sintetizados como se divulga aquí. Un ARNip existente puede ser ventajosamente modificado y ARNip futuro puede ser diseñado y producido para proporcionar moléculas de ácido nucleico activo. En algunas realizaciones, los compuestos de ARNip que utilizan los pares de oligonucleótidos expuestos en las Tablas B (B1-B74), Tablas C (C1-C4) y Tablas D (D1-D34) de la publicación de solicitud de patente PCT No. WO/2009/044392 y específicamente los compuestos dirigidos a los genes CIQBP, RAC1, GSK3B, P2RX7, TRPM2, PARG, CD38, STEAP4, BMP2, CX43 o TYROBP y además incluyen y al menos un excedente no nucleótido 3' de acuerdo con la presente invención se prueban en modelos animales donde se demuestra que estos compuestos de ARNip tratan y previenen llagas y úlceras por presión.

Ejemplo 6: Sistemas modelo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD)

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) se caracteriza principalmente por enfisema, que es la destrucción permanente de los espacios aéreos periféricos, distal a los bronquiolos terminales. El enfisema también se caracteriza por la acumulación de células inflamatorias como los macrófagos y los neutrófilos en los bronquiolos y las estructuras alveolares. El enfisema y la bronquitis crónica pueden ocurrir como parte de la COPD o de forma independiente.

La prueba de los inhibidores activos de la invención (tales como siARN) para tratar la COPD/enfisema/bronquitis crónica se lleva a cabo en modelos animales tales como los divulgados a continuación:

Starcher and Williams, 1989. Lab. Animals, 23:234-240; Peng, et al., 2004.; Am J Respir Crit Care Med, 169:1245-1251; Jeyaseelan et al., 2004. Infect. Immunol, 72: 7247-56. Modelos adicionales se describen en la publicación de patente PCT WO 2006/023544 asignada al cesionario de la presente solicitud.

Un ARNip existente puede ser ventajosamente modificado y ARNip futuro puede ser diseñado y producido para proporcionar moléculas de ácido nucleico activo. En algunas realizaciones, los compuestos de ARNip que utilizan los pares de oligonucleótidos expuestos en las Tablas B (B1-B74), Tablas C (C1-C4) y Tablas D (D1-D34) de la publicación de solicitud de patente PCT No. WO/2009/044392, y en particular a ARNip a los genes CIQBP, BNIP3, GSK3B, P2RX7, TRPM2, PARG, CD38, STEAP4, BMP2, CX43, TYROBP, CTGF y DUOX1 y además incluyen y al menos un excedente 3' como se divulga aquí se prueban en estos animales, que muestran que estos compuestos de ARNip pueden tratar y/o prevenir enfisema, bronquitis crónica y COPD.

Ejemplo 7: Sistemas modelo de lesión de la médula espinal

La lesión de la médula espinal, o mielopatía, es una alteración de la médula espinal que produce pérdida de sensibilidad y/o movilidad. Los dos tipos comunes de lesión de la médula espinal se deben a trauma y enfermedad. Las lesiones traumáticas pueden deberse a accidentes automovilísticos, caídas, golpes de tiro, accidentes de buceo, inter alia, y las enfermedades que pueden afectar a la médula espinal incluyen polio, espina bífida, tumores y ataxia de Friedreich.

Un ARNip existente puede ser ventajosamente modificado y ARNip futuro puede ser diseñado y producido para proporcionar moléculas de ácido nucleico activo. En algunas realizaciones, los compuestos de ARNip que utilizan los pares de oligonucleótidos expuestos en las Tablas B (B1-B74), Tablas C (C1-C4) y Tablas D (D1-D34) de la publicación de solicitud de patente PCT No. WO/2009/044392, y en particular ARNip dirigido a los genes LRDD, CYBA, ATF3, CASP2, HRK, CIQBP, BNIP3, MAPK8, MAPK14, RAC1, GSK3B, P2RX7, TRPM2, PARG, CD38, STEAP4, BMP2, CX43, TYROBP, CTGF y RHOA y además incluyen, y al menos un excedente 3' como se divulga aquí, se prueban en este modelo animal, que muestran que estos compuestos de ARNip promueven la recuperación funcional después de la lesión de la médula espinal y por lo tanto pueden usarse para tratar la lesión de la médula espinal.

Ejemplo 8: Sistemas modelo de glaucoma

La prueba de inhibidores activos de la invención (tales como siARN) para tratar o prevenir el glaucoma se realiza en el modelo animal, por ejemplo, tal como se describe en Pease et al., J. Glaucoma, 2006, 15(6):512-9 (Manometric calibration and comparison of TonoLab and TonoPen tonometers in rats with experimental glaucoma and in normal mice).

Un ARNip existente puede ser ventajosamente modificado y ARNip futuro puede ser diseñado y producido para proporcionar moléculas de ácido nucleico activo. En algunas realizaciones, los compuestos de ARNip que utilizan los pares de oligonucleótidos expuestos en las Tablas B (B1-B74), Tablas C (C1-C4) y Tablas D (D1-D34) de la publicación de solicitud de patente PCT No. WO/2009/044392, en particular a los genes TP53BP2, LRDD, CYBA, ATF3, CASP2, HRK, BNIP3, MAPK8, MAPK14, RAC1 y RHOA y además incluyen y al menos un excedente no nucleótido 3' como se divulga aquí se prueban en este modelo animal que muestra que estos compuestos de ARNip tratan y/o previenen el glaucoma.

Ejemplo 8A: Sistemas modelo de neuropatía óptica isquémica (ION)

Se estableció un modelo animal para la neuropatía óptica isquémica en ratas Wistar adultas utilizando un protocolo de lesión por aplastamiento del nervio óptico. Siete días antes del aplastamiento del nervio óptico, las células ganglionares de la retina (RGC) se etiquetan selectivamente mediante la aplicación del trazador retrógrado FluoroGold (2%, Fluorochrome, Englewood, CO) al colículo superior. El trazador es transportado por transporte retrógrado a lo largo de los axones RGC dando lugar a un etiquetado completo y específico de todos los RGCs dentro de una semana después de la inyección del trazador fluorescente. Los animales se someten a la lesión por aplastamiento del nervio óptico 7 días después del rastreo retrógrado. El nervio óptico orbital se expone a través de un enfoque supraorbital y todos los axones en el nervio óptico se transeccionan aplastando con fórceps durante 10 segundos, a 2 mm de la lámina cribrosa. Una dosis única de 20 µg/5 ml de PBS de un compuesto de ARNip de acuerdo con la invención se microinyecta en el cuerpo vítreo 2 mm anterior a la cabeza del nervio, utilizando una micropipeta de vidrio en el momento del aplastamiento del nervio óptico. Se determina la supervivencia de RGCs 7 días después del aplastamiento del nervio óptico contando los RGCs marcados con FluoroGold en retinas montadas en plano. Los animales experimentales se perfunden transcardialmente con paraformaldehído al 4% una semana después del aplastamiento del nervio óptico. Ambas retinas se diseccionan, se fijan durante 30 minutos adicionales y se montan de forma plana sobre un portaobjetos de vidrio para la cuantificación de la capa de células ganglionares. El número de RGCs fluorescentes se cuenta en 16 áreas distintas en cada retina y el porcentaje de supervivencia de los RGC se determina en comparación con las muestras obtenidas de ratas que no sufrieron lesión por aplastamiento del nervio óptico en absoluto o muestras obtenidas de ratas a las que se les inyectó PBS, ARNip de control o ARNip de GFP junto con la lesión por aplastamiento del nervio óptico. Las células de microglia que pueden haber incorporado FluoroGold después de la fagocitosis de los RGC moribundos se distinguieron por su morfología característica y se excluyeron de los análisis cuantitativos.

Otro modelo de axotomía del nervio óptico donde toda la población de RGCs se axotomiza por transección del nervio óptico cerca del ojo es útil para probar los compuestos y composiciones de la presente invención. (Cheng L, et al. J. Neurosci. May 15, 2002 2002;22:3977-3986).

Ejemplo 9: Sistemas modelo de lesión de isquemia/reperfusión después del trasplante de pulmón en ratas

la prueba de los inhibidores activos de la invención (tales como siARN) para tratar o prevenir la lesión de isquemia/reperfusión o lesión hipóxica tras el trasplante de pulmón se realiza en uno o más de los modelos animales experimentales, por ejemplo como se describe por Mizobuchi et al., 2004. J. Heart Lung Transplant, 23:889-93; Huang, et al., 1995. J. Heart Lung Transplant. 14: S49; Matsumura, et al., 1995. Transplantation 59: 1509-1517; Wilkes, et al., 1999. Transplantation 67:890-896; Naka, et al., 1996. Circulation Research, 79: 773-783.

Un ARNip existente puede ser ventajosamente modificado y ARNip futuro puede ser diseñado y producido para proporcionar moléculas de ácido nucleico activo. En algunas realizaciones, los compuestos de ARNip que utilizan los pares de oligonucleótidos expuestos en las Tablas B (B1-B74), Tablas C (C1-C4) y Tablas D (D1-D34) de la publicación de solicitud de patente PCT No. WO/2009/044392 y en particular a TP53BP2, LRDD, CYBA, CASP2, BNIP3, RAC1 y DUOX1 y además incluyen y al menos un excedente no nucleótido 3' como se divulga aquí se prueban en estos modelos animales, que muestran que estos compuestos de ARNip tratan y/o previenen lesión por isquemia-reperfusión después del trasplante de pulmón y, por lo tanto, puede utilizarse junto con la cirugía de trasplante.

Ejemplo 10: Sistemas modelo de síndrome de dificultad respiratoria aguda

la prueba de los inhibidores activos de la invención (tales como siARN) para tratar el síndrome de dificultad respiratoria aguda se realiza en el modelo animal como se describe en Chen et al (J Biomed Sci. 2003;10(6 Pt 1):588-92. Los compuestos de ARNip de acuerdo con las Tablas B (B1-B74), Tablas C (C1-C4) y Tablas D (D1-D34) de la publicación de solicitud de patente PCT No. WO/2009/044392, en particular a los genes CYBA, HRK, BNIP3, MAPK8, MAPK14, RAC1, GSK3B, P2RX7, TRPM2, PARG, SPP1 y DUOX1 y además incluyen y al menos un excedente 3' como se divulga aquí se prueban en este modelo animal que muestra que estos ARNip tratan y/o previenen el síndrome de dificultad respiratoria aguda y por lo tanto puede usarse para tratar esta condición.

Ejemplo 11 Modelos animales de osteoartritis (OA)

La artritis inducida por colágeno (CIA): La CIA en ratones se describe en Trentham et al. (1977. J. Exp. Med. 146: 857-868). La artritis inducida por adyuvante (AA):AA se describe en Kong et al., (1999 Nature, 402: 304-308). Un modelo de menisectomía se describe en Han et al., (1999. Nagoya J Med Sci 62 (3-4): 115-26).

5 Se evalúa el efecto de diferentes inhibidores de siARN, tales como ARNip a SSP1, en diferentes parámetros relacionados con OA, tales como proliferación de condrocitos, diferenciación terminal y desarrollo de artritis, utilizando uno o más de los modelos anteriores, además de modelos in vitro conocidos en la técnica. Los compuestos de ARNip dirigidos a genes proapoptóticos específicos, en particular a SSP1, y además incluyen y al menos un excedente 3' como se divulga aquí se prueban en estos modelos animales que muestran que estos ARNip tratan y/o previenen OA y por lo tanto pueden usarse para tratar esta condición.

10 Ejemplo 12: Sistemas modelo de rata para lesión renal aguda asociada a trasplante

Isquemia en caliente - Se realiza una nefrectomía izquierda en ratas de prueba, seguida por un autotrasplante que da como resultado un período de preservación del injerto de riñón caliente de 45 minutos. Después del autotrasplante, se realiza una nefrectomía derecha en el mismo animal. El ARNip modificado químicamente a un objetivo se administra intravenosamente a través de la vena femoral ya sea antes de la recolección del injerto renal (imitando el tratamiento del donante) ("pre"), o bien después del autotrasplante renal (imitando el tratamiento del receptor) o ambos antes de la recolección y después del trasplante (tratamiento combinado de donantes y receptores) ("pre-post").

15 Isquemia en frío - Se realiza una nefrectomía izquierda en un animal donante, seguida de una conservación en frío (sobre hielo) del riñón recolectado durante un período de 5 horas. Al final de este período, la rata receptora se someterá a una nefrectomía bilateral, seguida por el trasplante del injerto renal conservado en frío. El tiempo total de isquemia en caliente (incluyendo el procedimiento quirúrgico) es de aproximadamente 30 minutos. El ARNip modificado químicamente se administra intravenosamente a través de la vena femoral, ya sea al animal donante antes de la recolección del riñón ("pre"), o al animal receptor 15 minutos ("15 min posteriores") o 4 horas (4 h posteriores) post - trasplante.

20 Para evaluar la eficacia del ARNip en la mejora de la función renal post-trasplante, los niveles de creatinina en suero se miden en los días 1, 2 y 7 después del trasplante en ambos modelos de isquemia en frío y en caliente.

25 Listado de secuencias

<110> QUARK PHARMACEUTICALS, INC. FEINSTEIN , Elena AVKIN-NACHUM, Sharon

<120> COMPUESTOS DE OLIGONUCLEÓTIDOS QUE COMPRENDEN EXCEDENTES NO NUCLEÓTIDOS

30 <130> 217/PCT2

<150> 61/292,878

<151> 2010-01-07

<150> PCT/US2010/049047

<151> 2010-09-16

35 <150> PCT/US2010/059578

<151> 2010-12-08

<160> 28

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

40 <211> 19

<212> ARN

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> Químicamente Sintetizado

<400> 1
gccagaaugu ggaacuccu 19
<210> 2
<211> 19
5 <212> ARN
<213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Químicamente Sintetizado
<400> 2
10 aggaguucca cauucuggc 19
<210> 3
<211> 19
<212> ARN
<213> ARTIFICIAL
15 <220>
<223> Químicamente Sintetizado
<400> 3
gaaugugacu uccagacca 19
<210> 4
20 <211> 19
<212> ARN
<213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Químicamente Sintetizado
25 <400> 4
uggucuggaa gucacauuc 19
<210> 5
<211> 19
<212> ARN
30 <213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Químicamente Sintetizado
<400> 5
gaguccugca ucuuugaa 19
35 <210> 6
<211> 19

<212> ARN
<213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Químicamente Sintetizado
5 <400> 6
uucaaaugau gcaggacuc 19
<210> 7
<211> 19
<212> ARN
10 <213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Químicamente Sintetizado
<400> 7
ucgacagccc ugauaguuu 19
15 <210> 8
<211> 19
<212> ARN
<213> ARTIFICIAL
<220>
20 <223> Químicamente Sintetizado
<400> 8
aaacuaucag ggcugucga 19
<210> 9
<211> 19
25 <212> ARN
<213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Químicamente Sintetizado
<400> 9
30 cagaagucan cuugcuaca 19
<210> 10
<211> 19
<212> ARN
<213> ARTIFICIAL
35 <220>
<223> Químicamente Sintetizado

- <400> 10
uguagcaaga ugacuucug 19
<210> 11
<211> 19
5 <212> ARN
<213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Químicamente Sintetizado
<400> 11
10 guggcagagu uacaguuca 19
<210> 12
<211> 19
<212> ARN
<213> ARTIFICIAL
15 <220>
<223> Químicamente Sintetizado
<400> 12
ugaacuguaa cucugccac 19
<210> 13
20 <211> 19
<212> ARN
<213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Químicamente Sintetizado
25 <400> 13
guggcagagu uacaguucu 19
<210> 14
<211> 19
<212> ARN
30 <213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Químicamente Sintetizado
<400> 14
agaacuguaa cucugccac 19
35 <210> 15
<211> 19

- <212> ARN
- <213> ARTIFICIAL
- <220>
- <223> Químicamente Sintetizado
- 5 <400> 15
caucgacagc ccugauaga 19
- <210> 16
- <211> 19
- <212> ARN
- 10 <213> ARTIFICIAL
- <220>
- <223> Químicamente Sintetizado
- <400> 16
ucuaucaggg cugucgaug 19
- 15 <210> 17
- <211> 19
- <212> ARN
- <213> ARTIFICIAL
- <220>
- 20 <223> Químicamente Sintetizado
- <400> 17
gaucuucgga augaugaga 19
- <210> 18
- <211> 19
- 25 <212> ARN
- <213> ARTIFICIAL
- <220>
- <223> Químicamente Sintetizado
- <400> 18
ucucaucauu ccgaagauc 19
- 30 <210> 19
- <211> 19
- <212> ARN
- <213> ARTIFICIAL
- 35 <220>
- <223> Químicamente Sintetizado

- <400> 19
caucgacagc ccugauagu 19
<210> 20
<211> 19
5 <212> ARN
<213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Químicamente Sintetizado
<400> 20
10 acuaucaggg cugucgaug 19
<210> 21
<211> 19
<212> ARN
<213> ARTIFICIAL
15 <220>
<223> Químicamente Sintetizado
<400> 21
ucgacagccc ugauaguua 19
<210> 22
20 <211> 19
<212> ARN
<213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Químicamente Sintetizado
25 <400> 22
uaacuaucag ggcugucga 19
<210> 23
<211> 19
<212> ARN
30 <213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Químicamente Sintetizado
<400> 23
gguggagaac cuuaugguc 19
35 <210> 24
<211> 19

<212> ARN
<213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Químicamente Sintetizado
5 <400> 24
gaccauaagg uuccacc 19
<210> 25
<211> 19
<212> ARN
10 <213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Químicamente Sintetizado
<400> 25
agauaaugaa caccaagac 19
15 <210> 26
<211> 19
<212> ARN
<213> ARTIFICIAL
<220>
20 <223> Químicamente Sintetizado
<400> 26
gucuuggugu ucauuacu 19
<210> 27
<211> 19
25 <212> ARN
<213> ARTIFICIAL
<220>
<223> Químicamente Sintetizado
<400> 27
30 gaaugggaa cuccucaac 19
<210> 28
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial
35 <220>
<223> Químicamente Sintetizado

<400> 28

guugaggagu uccacauuc 19

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico de doble cadena que comprende una cadena en sentido y una cadena antisentido, en donde la cadena antisentido comprende una unidad estructural no nucleótido seleccionada del grupo que consiste en C3Pi-C3OH (propil fosfopropanol), C3Pi-C3Pi (fosfato de propilfosfopropilo), C3Pi-C3Ps (Fosforotioato de propil fosfopropilo), unidades estructurales de C3Pi-rAb (unidad estructural de propil fosfato-riboabásico) y de C3Pi-dAb (unidad estructural propil fosfato -desoxirriboabásico) unidos covalentemente a través de un enlace de base de fosfato en una posición 3' o 2' del residuo de azúcar en el nucleótido terminal 3' .
- 5
2. La molécula de ácido nucleico de doble cadena de la reivindicación 1 que tiene la estructura (A1)
- (A1) 5' (N)x-Z 3' (cadena antisentido)
- 10 3' Z'-(N')y -z" 5' (cadena en sentido)
- en donde cada uno de N y N' es un nucleótido que puede estar no modificado o modificado, o es una unidad estructural no convencional;
- en donde cada uno de (N)x y (N')y es un oligonucleótido en el que cada N o N' consecutivo se une al siguiente N o N' mediante un enlace covalente;
- 15 en donde Z está presente y consiste en una unidad estructural no nucleótido seleccionada del grupo que consiste en C3Pi-C3OH, C3Pi-C3Pi, C3Pi-C3Ps, C3Pi-rAb y C3Pi-dAb, unidos covalentemente a través de un fosfodiéster o un enlace fosforotioato en una posición 3' o 2' del residuo de azúcar en el nucleótido terminal de la cadena antisentido;
- en donde Z' está presente o ausente, pero si está presente comprende una unidad estructural no nucleótido unida covalentemente en el terminal 3' de la cadena en sentido;
- 20 en donde z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es una unidad estructural de cubrimiento unida covalentemente en el terminal 5' de (N')y ;
- en donde cada uno de x y y es independientemente un entero entre 18 y 40;
- en donde la secuencia de (N')y tiene complementariedad con la secuencia de (N)x; y
- en donde la secuencia de (N)x tiene complementariedad con una secuencia consecutiva en un ARN diana.
- 25 3. La molécula de la reivindicación 1, en donde la cadena antisentido no es totalmente complementaria con el ARN diana, teniendo la estructura (A2) expuesta a continuación:
- (A2) 5' N1-(N)x-Z 3' (cadena antisentido)
- 3' Z'-N2-(N')y -z" 5' (cadena en sentido)
- 30 en donde cada uno de N2, N y N' es un ribonucleótido no modificado o modificado, o una unidad estructural no convencional;
- en donde cada uno de (N)x y (N')y es un oligonucleótido en el que cada N o N' consecutivo se une al N o N' adyacente mediante un enlace covalente;
- en donde cada uno de x y y es independientemente un entero entre 17 y 39;
- en donde la secuencia de (N')y tiene complementariedad con la secuencia de (N)x y (N)x tiene complementariedad con una secuencia consecutiva en un ARN diana;
- 35 en donde N1 está unido covalentemente a (N)x y no es coincidente con el ARN diana o es una unidad estructural de ADN complementario con el ARN diana;
- en donde N1 es una unidad estructural seleccionado del grupo que consiste en uridina natural o modificada, desoxirriburoidina, ribotimidina, desoxirribotimidina, adenosina o desoxiadenosina;
- 40 en donde z" puede estar presente o estar ausente, pero si está presente es una unidad estructural de cubrimiento unida covalentemente en el terminal 5' de N2-(N')y ;
- en donde Z está presente y consiste en una unidad estructural no nucleótido seleccionado del grupo que consiste en C3Pi-C3OH, C3Pi-C3Pi, C3Pi-C3Ps, C3Pi-rAb y C3Pi-dAb, unidos covalentemente a través de un fosfodiéster o un enlace fosforotioato en una posición 3' o 2' del residuo de azúcar en el nucleótido terminal de la cadena antisentido; y

en donde Z' está presente o ausente, pero si está presente comprende una unidad estructural no nucleótido unido covalentemente en el terminal 3' de la cadena en sentido.

- 5 4. La molécula de la reivindicación 2 o 3, en donde Z' está presente y comprende una o más unidades estructurales no nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en una unidad estructural abásica, una unidad estructural abásica invertida, una unidad estructural de hidrocarburo y un fosfato inorgánico.
5. La molécula de la reivindicación 2 o 3, en donde Z' está presente y es un fosfato inorgánico.
6. La molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde Z consiste en C3Pi-C3OH o C3Pi-C3Pi.
7. La molécula de la reivindicación 2, en donde $x=y=19$.
8. La molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde:
- 10 Z' está presente y comprende C3OH.
9. La molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde:
- Z' está presente y comprende C3Pi.
10. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9; y un portador farmacéuticamente aceptable.

15

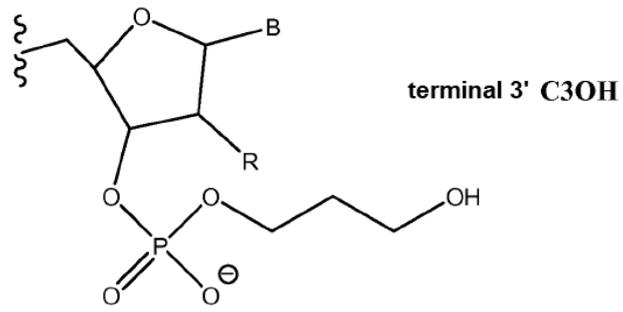


FIG.1A

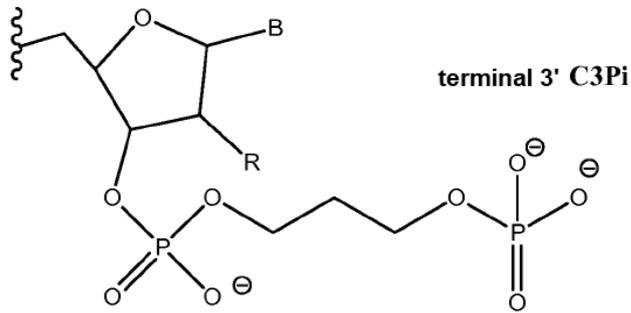


FIG.1B

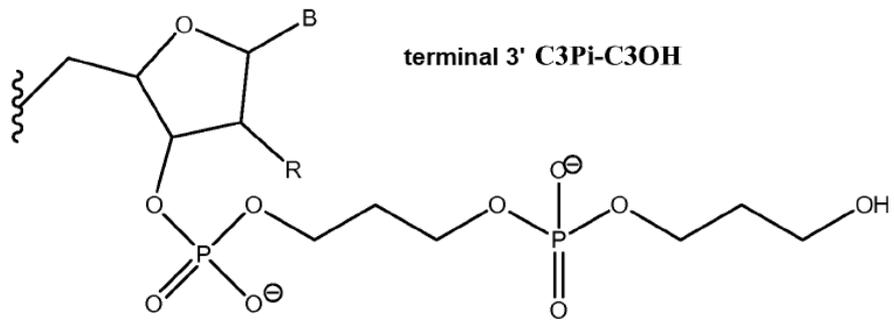


FIG.1C

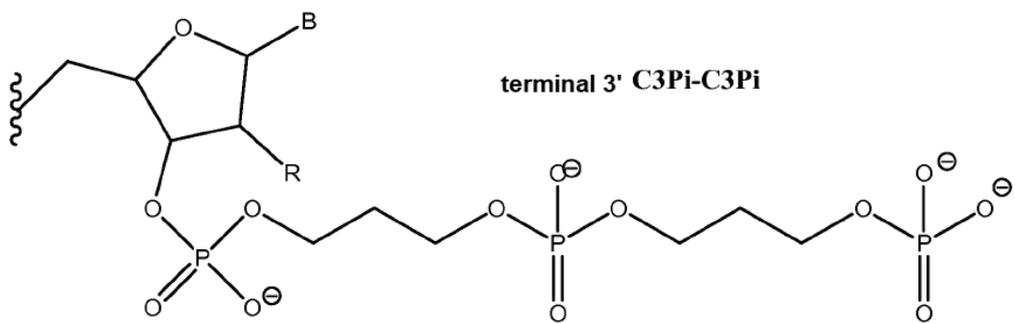
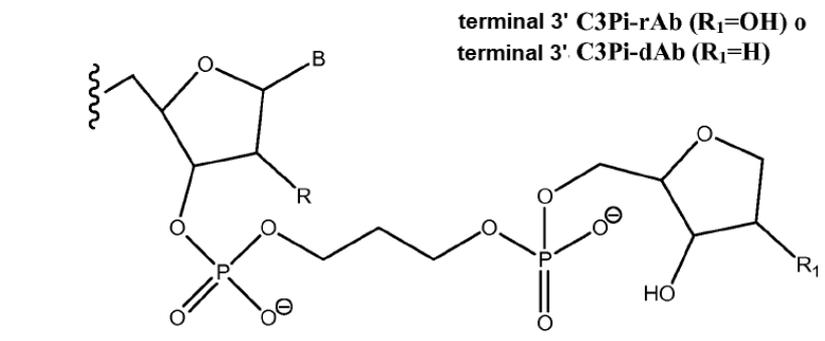
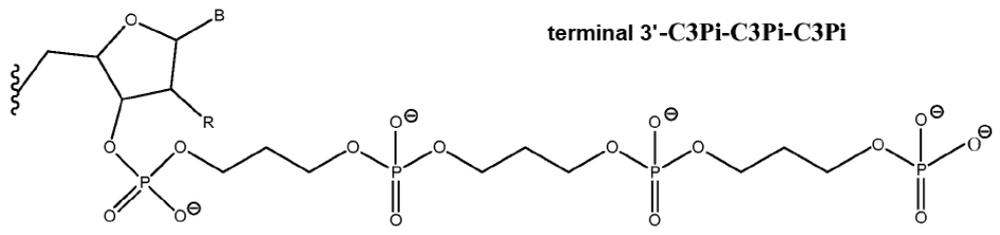
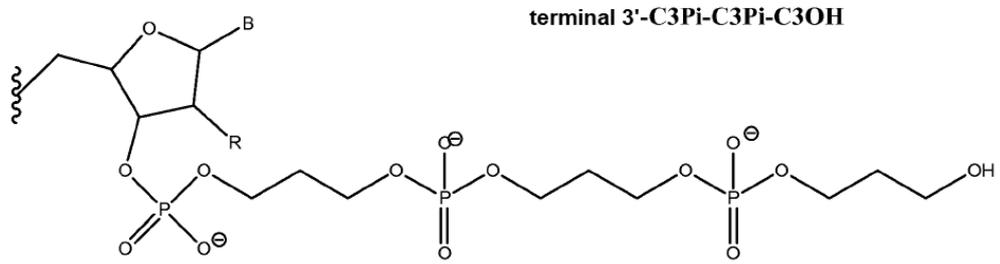


FIG.1D



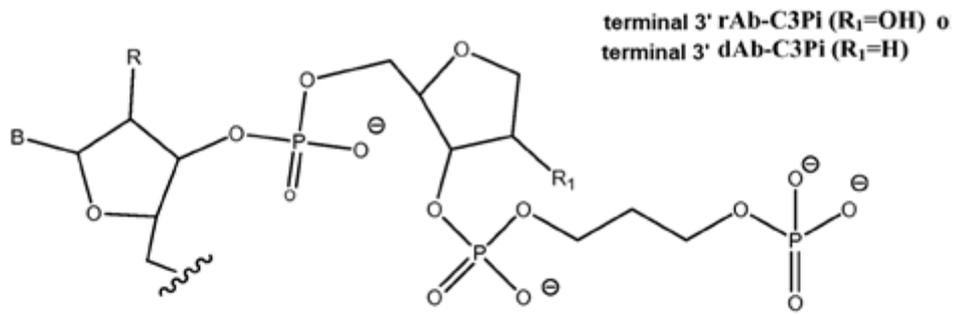


FIG. 1H

terminal 3' rAb-rAb ($R_1=R_2=OH$) o
terminal 3' dAb-rAb ($R_1=H$; $R_2=OH$) o
terminal 3' rAb-dAb ($R_1=OH$; $R_2=H$) o
terminal 3' dAb-dAb ($R_1=R_2=H$)

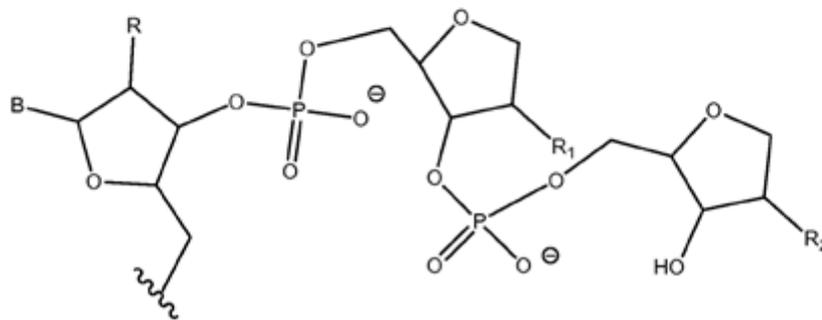


FIG. 1J

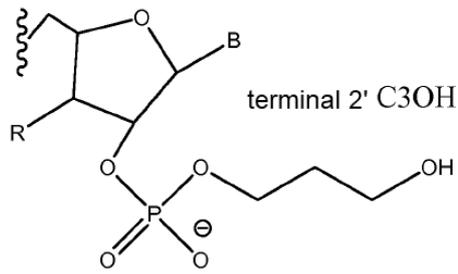


FIG. 2A

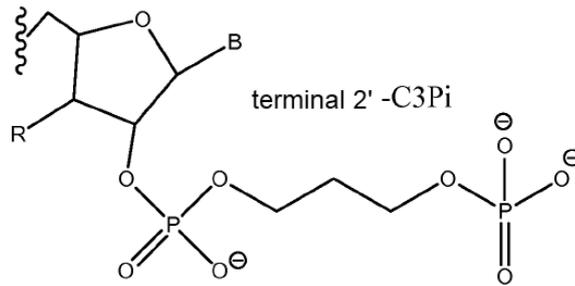


FIG. 2B

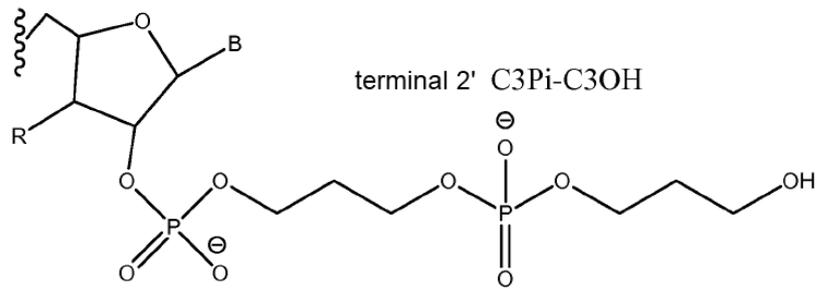


FIG. 2C

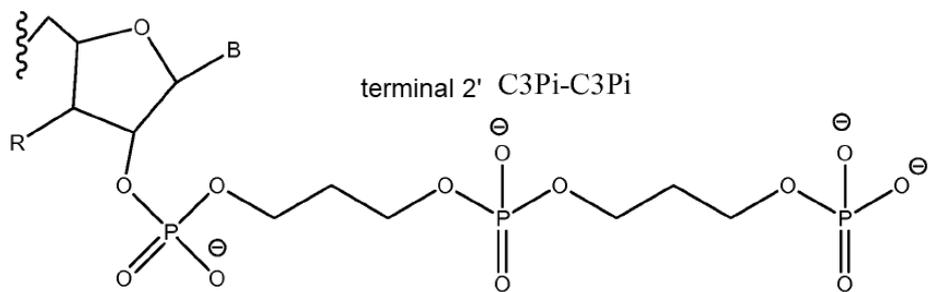
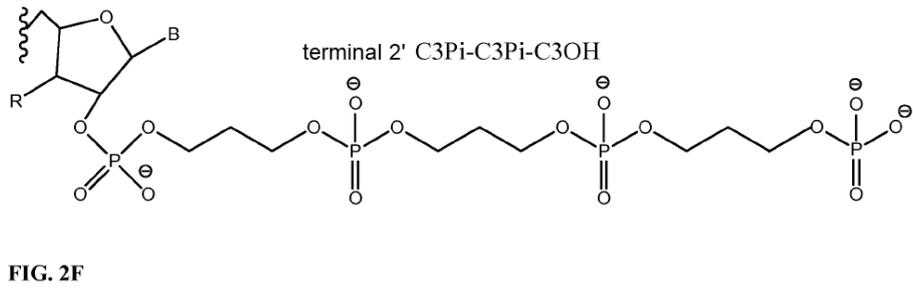
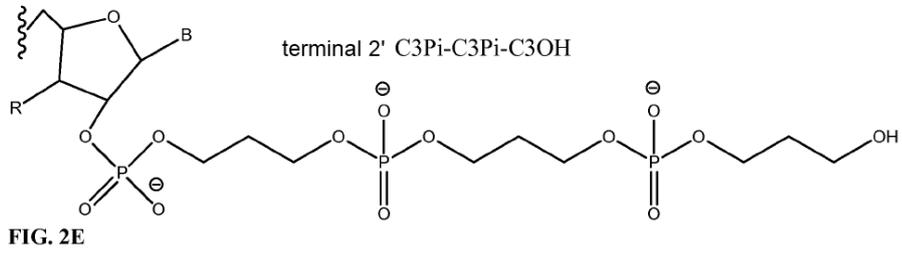


FIG. 2D



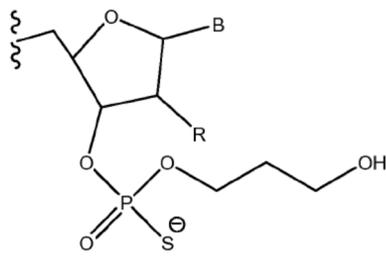


FIG. 3A

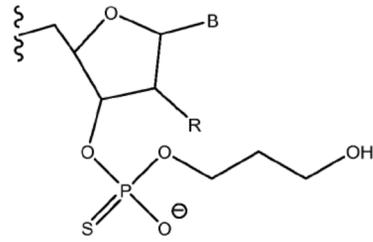


FIG. 3B

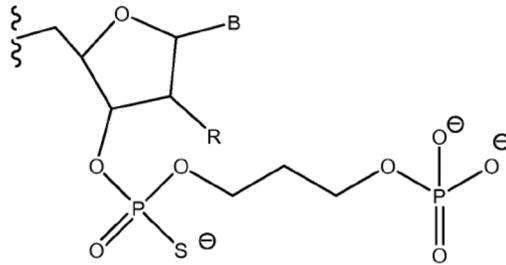


FIG. 3C

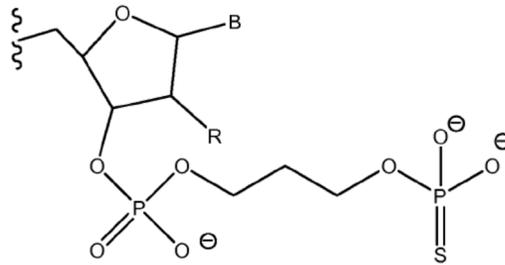


FIG. 3D

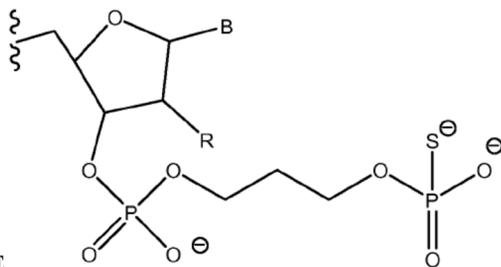


FIG. 3E

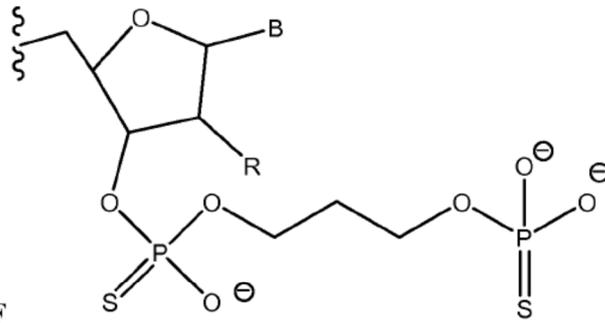


FIG. 3F

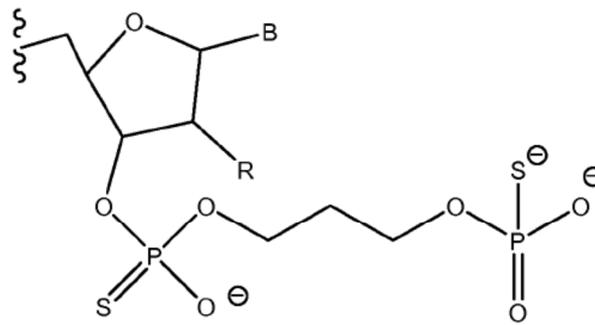


FIG. 3G

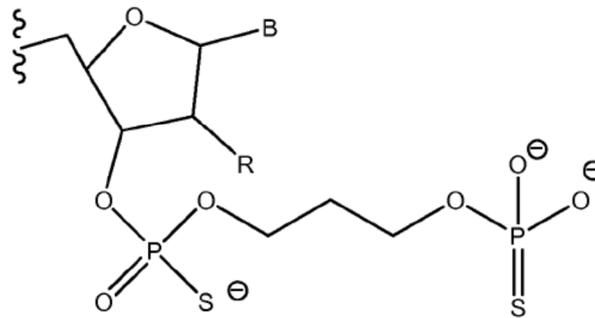


FIG. 3H

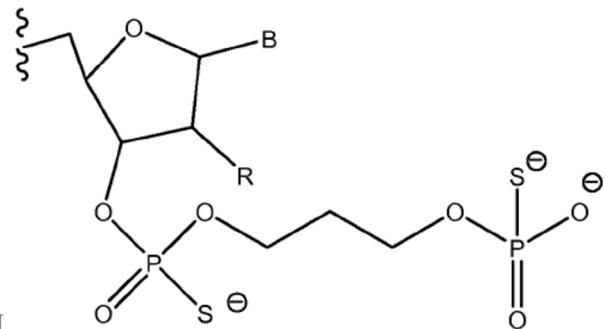


FIG. 3J

FIGURA 4

S505	5'	GCCAGAAUGUGGAACUCcU	3'
	5'	<u>AGGAGUCCACAUUCUGGC</u>	3'
S800	5'	GCCAGAAUGUGGAACUCcU	3'
	5'	<u>AGGAGUCCACAUUCUGGC</u> -C3Pi-C3OH	3'

