

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 576**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 15/11</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/713</b>	(2006.01)
<b>C07H 21/00</b>	(2006.01)
<b>C07H 21/02</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/63</b>	(2006.01)
<b>A61K 48/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2009 PCT/CA2009/000789**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2009 WO09146556**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2009 E 09757018 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2294195**

54 Título: **Dúplex oligonucleotídicos que comprenden nucleótidos de tipo ADN y de tipo ARN y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**05.06.2008 US 59186 P**  
**17.06.2008 CA 2635187**  
**19.12.2008 WO PCT/CA2008/002259**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.11.2017**

73 Titular/es:

**PALADIN LABS INC. (100.0%)**  
**100 Alexis Nihon, Suite 600**  
**St-Laurent, Quebec H4M 2P2, CA**

72 Inventor/es:

**DAMHA, MASAD J.;**  
**WATTS, JONATHAN K. y**  
**DELEAVEY, GLEN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 643 576 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

Dúplex oligonucleotídicos que comprenden nucleótidos de tipo ADN y de tipo ARN y usos de los mismos

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a oligonucleótidos, métodos para su preparación y usos de los mismos, tal como para disminuir el nivel de un ácido nucleico diana en una célula y/o silenciar la expresión de un ácido nucleico o gen de interés usando tecnologías de ARN interferente pequeño (ARNip).

10

**Antecedentes técnicos**

El silenciamiento génico, es decir, bloquear selectivamente la expresión de un gen de interés, se puede efectuar a través de la introducción de un oligonucleótido antisentido (ONA) o ARN interferente pequeño (ARNip) en un organismo (Uhlmann, E. y Peyman, A. Chem. Rev. 1990, 90: 543-84; Braasch, D. A. y Corey, D. R. Biochemistry 2002, 41: 4503-4510; Opalinska, J. B. y Gewirtz, A. M. Nat. Rev. Drug Discov. 2002, 1: 503-14; Dorsett, Y. y Tuschl, T. Nat. Rev. Drug Discov. 2004, 3: 318-329). Desafortunadamente, como con otros fármacos basados en ácido nucleico, los ARNip tienen mala estabilidad en suero, mala absorción celular, y pueden provocar efectos secundarios inespecíficos e inmuoestimuladores. Los esfuerzos para remediar estas deficiencias se han enfocado en el desarrollo de vehículos de administración para los ARNip, y en el desarrollo de oligonucleótidos químicamente modificados con perfiles de fármaco mejorados.

15

20

25

30

35

Mucho del trabajo reciente se ha enfocado en la modificación química del ARNip. Dowler y col. (Dowler, T. et al. Nucl. Acids Res. 2006, 34: 1669-1675) fueron los primeros en mostrar que ácidos 2'-desoxi-2'-arabinonucleicos (2'-F-AAN) se podrían incorporar a lo largo de la hebra sentido, incluyendo una hebra sentido completamente modificada. La modificación la extensión 3' de la hebra antisentido con 2'<1>F-AAN produjo un aumento significativo en potencia y varios de los dúplex modificados con 2'-F-AAN también han sido capaces de superar al ARNip nativo en potencia. Además, se encontró que los dúplex de ARNip con modificación 2'-F-AAN extensa tenían una semivida en suero significativamente más larga que los ARNip no modificados. Los dúplex de ARNip modificados que contenían unidades de 2'-fluoro-4'-tioarabinonucleótido (4'<1>S-FAAN también eran capaces de entrar en la ruta de iARN (Watts, J. K. et al. Nucl. Acids Res 2007, 35: 1441-1451). Uno o dos insertos internamente en cualquier hebra dio dúplex de potencia comparable a la del control. La modificación 4'-S-FAAN también fue capaz de funcionar con buena eficacia en un dúplex con una hebra sentido de ARN modificada con 2'-F-AAN, demostrando que 2'<1>F-AAN (con su preferencia para conformaciones sur y este) puede lograr sinergia con 4'S-2'-F-AAN (con su preferencia para conformaciones norte), en silenciamiento de genes por iARN.

40

2'-F-ARN es otra modificación de ARNip (Blidner, RA. et al. Chem. Biol. Drug Des. 2007, 70: 113-122), y la modificación 2'-F-ARN parcial es tolerada a lo largo de las hebras tanto sentido como antisentido, y algunos ARNip completamente modificados con 2'-F-ARN también son activos. Los dúplex de ARNip modificados con 2'-F-ARN tienen estabilidad en suero significativamente aumentada (Layzer, J. M. et al. RNA, 2004, 10: 766-771). 2'-F-ARN también aumenta la afinidad de unión del dúplex.

45

Se observó un ejemplo de un aumento en potencia para un ARNip completamente modificado hecho de una combinación de nucleótidos modificados con 2'-O-Me y 2'-F-ARN, que era 500 veces más potente que un ARN sin modificar (Allerson, CR. et al. J. Med. Chem. 2005, 48: 901-904; Koller, E. et al. Nucl. Acids Res. 2006 34: 4467-4476). Sin embargo, tal alto grado de mejora no se observó para otras secuencias.

50

Estas técnicas presentan desafíos significativos, y hay una necesidad para mejoras en, por ejemplo, eficacia, estabilidad in vivo y reducción de efectos "inespecíficos" {por ejemplo, el silenciamiento de un gen diferente de la diana pretendida}. Por tanto, hay una necesidad continuada para enfoques basados en nucleótidos mejorados.

**Compendio de la invención**

55

La invención se refiere a oligonucleótidos, métodos para su preparación y usos de los mismos, tal como para disminuir el nivel de un ácido nucleico diana en una célula, y/o silenciar la expresión de un ácido nucleico o gen de interés usando tecnologías de ARN interferente pequeño (ARNip).

60

La presente invención proporciona un ARNip químicamente modificado que comprende un dúplex oligonucleotídico que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, cada una comprende respectivamente:

- (i) Sentido: [(2'-F-AAN)<sub>3</sub>(2'-F-ARN)<sub>3</sub>]<sub>2</sub> [(2'-F-AAN)(2'-F-ARN)]<sub>3</sub> (2'-F-AAN)  
Antisentido: (ARN)<sub>19</sub>;
- (ii) Sentido: [(2'-F-AAN)<sub>3</sub>(2'-F-ARN)<sub>3</sub>]<sub>2</sub> [(2'-F-AAN)(2'-F-ARN)]<sub>3</sub> (2'-F-AAN)  
Antisentido: (2'-F-ARN)<sub>19</sub>;
- (iii) Sentido: [(2'-F-AAN) (2'-F-ARN)]<sub>9</sub> (2'-F-AAN)  
Antisentido: (ARN)<sub>19</sub>;

65

- (iv) Sentido: [(2'F-AAN) (2'F-ARN)]<sub>9</sub> (2'F-AAN)  
Antisentido: (2'F-ARN)<sub>19</sub>;
- (v) Sentido: [(2'F-AAN)<sub>3</sub>(2'F-ARN)<sub>3</sub>]<sub>3</sub> (2'F-AAN)  
Antisentido: (ARN)<sub>19</sub>; o
- (vi) Sentido: [(2'F-AAN)<sub>3</sub>(2'F-ARN)<sub>3</sub>]<sub>3</sub> (2'F-AAN)  
Antisentido: (2'F-ARN)<sub>19</sub>,

en donde el ARNip tiene actividad ARNip.

10 La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el ARNip químicamente modificado según la invención, junto con un excipiente o soporte farmacéuticamente aceptable.

15 La invención proporciona además el uso del ARNip químicamente modificado según la invención o la composición farmacéutica de la invención para degradar o disminuir el nivel de un ácido nucleico diana, o para disminuir la producción de un polipéptido codificado por dicho ácido nucleico diana, en una célula, en donde la hebra sentido del ARNip químicamente modificado comprende una secuencia de nucleobases sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleobases del ácido nucleico diana.

20 La invención proporciona además ARNip químicamente modificado según la invención o la composición farmacéutica de la invención para uso en prevenir o tratar una enfermedad o afección asociada con la expresión de un ácido nucleico diana, o de un polipéptido codificado por dicho ácido nucleico diana, en un sujeto, en donde la hebra sentido del ARNip químicamente modificado comprende una secuencia de nucleobases sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleobases del ácido nucleico diana.

25 Además, la invención proporciona un método in vitro para degradar o disminuir la expresión de un ácido nucleico diana, o de disminuir el nivel de un polipéptido codificado por dicho ácido nucleico diana, en una célula, el método comprende poner en contacto la célula con el ARNip químicamente modificado según la invención o la composición farmacéutica de la invención, en donde la hebra sentido del ARNip químicamente modificado comprende una secuencia de nucleobases sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleobases del ácido nucleico diana.

30 En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un par de oligonucleótidos que puede formar un dúplex, que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido complementaria a la hebra sentido, en donde el par de oligonucleótidos comprende: (a) uno o más arabinonucleótidos (AAN) sustituidos en 2'; y (b) (i) uno o más ribonucleótidos (ARN) sustituidos en 2', (ii) uno o más nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (ANB), o (iii) una combinación de (i) y (ii).

35 En una forma de realización, el par de oligonucleótidos mencionado anteriormente comprende uno o más AAN sustituidos en 2' y uno o más ARN sustituidos en 2'. En otra forma de realización, el par de oligonucleótidos mencionado anteriormente comprende uno o más AAN sustituidos en 2' y uno o más ANB. En otra forma de realización, el par de oligonucleótidos mencionado anteriormente comprende uno o más AAN sustituidos en 2', uno o más ARN sustituidos en 2' y uno o más ANB.

40 En una forma de realización, el sustituyente en 2' anteriormente mencionado es un halógeno. En una forma de realización adicional, el halógeno anteriormente mencionado es flúor (F).

45 En una forma de realización, la hebra sentido anteriormente mencionada comprende: (i) 2'F-AAN solo; (ii) 2'F-ARN solo; (iii) una combinación de 2'F-ARN y 2'F-AAN; (iv) ARN solo; (v) una combinación de 2'F-AAN y ARN; (vi) una combinación de 2'F-AAN, ARN y ANB; o (vii) una combinación de 2'F-AAN, 2'F-ARN y ARN.

50 En otra forma de realización, la hebra antisentido anteriormente mencionada comprende: (i) 2'F-ARN solo; (ii) ARN solo; (iii) 2'F-AAN solo; (iv) una combinación de 2'F-ARN y 2'F-AAN; (v) una combinación de 2'F-AAN y ARN; (vi) una combinación de 2'F-AAN, ARN y ANB; o (vii) una combinación de 2'F-AAN, 2'F-ARN y ARN.

55 En una forma de realización, la hebra sentido y la hebra antisentido anteriormente mencionadas tienen una longitud de 19 a 23 residuos. En una forma de realización adicional, hebra sentido y la hebra antisentido anteriormente mencionadas tienen una longitud de 21 residuos.

60 En otra forma de realización, la hebra sentido anteriormente mencionada, la hebra antisentido, o ambas, comprende una extensión en el extremo 3'. En una forma de realización adicional, la extensión anteriormente mencionada tiene de 1 a 5 residuos, en una forma de realización adicional 2 residuos.

En una forma de realización, la extensión anteriormente mencionada comprende desoxirribonucleótidos (ADN), 2'F-AAN, o una combinación de los mismos.

En una forma de realización, la hebra sentido anteriormente mencionada, la hebra antisentido, o ambas, está(n) fosforilada(s) en el extremo 5'. En una forma de realización adicional, la hebra antisentido anteriormente mencionada está fosforilada en el extremo 5'.

5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una molécula de tipo ARNip bicatenaria que comprende el par de oligonucleótidos anteriormente mencionado.

10 En una forma de realización, las hebras sentido y antisentido anteriormente mencionadas están en un oligonucleótido de 15 a 80 nucleótidos de longitud y de tal manera que el oligonucleótido o una parte del mismo es capaz de adoptar una estructura en horquilla de tipo ARNip en la que las hebras sentido y antisentido forman el tallo de la estructura en horquilla.

15 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende el par de oligonucleótidos anteriormente mencionado o la molécula de tipo ARNip bicatenaria anteriormente mencionada, y un soporte farmacéuticamente aceptable.

20 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el par de oligonucleótidos anteriormente mencionado, la molécula de tipo ARNip bicatenaria anteriormente mencionada o la composición anteriormente mencionada, para disminuir el nivel de un ácido nucleico diana, o de un polipéptido codificado por dicho ácido nucleico diana, en una célula, en donde la hebra sentido del par de oligonucleótidos comprende una secuencia de nucleobases sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleobases del ácido nucleico diana.

25 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el par de oligonucleótidos anteriormente mencionado, la molécula de tipo ARNip bicatenaria anteriormente mencionada o la composición anteriormente mencionada, para prevenir o tratar una enfermedad o afección asociada con la expresión de un ácido nucleico diana, o de un polipéptido codificado por dicho ácido nucleico diana, en un sujeto, en donde la hebra sentido del par de oligonucleótidos comprende una secuencia de nucleobases sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleobases del ácido nucleico diana.

30 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de degradar o disminuir el nivel de un ácido nucleico diana, o de disminuir la producción o el nivel de un polipéptido codificado por dicho ácido nucleico diana, en una célula, el método comprende poner en contacto la célula con el par de oligonucleótidos mencionado anteriormente, la molécula de tipo ARNip bicatenaria mencionada anteriormente, o la composición mencionada anteriormente, en donde la hebra sentido del par de oligonucleótidos comprende una secuencia de nucleobases sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleobases del ácido nucleico diana.

35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de prevenir o tratar una enfermedad o afección asociada con la expresión de un ácido nucleico diana, o de un polipéptido codificado por dicho ácido nucleico diana, en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del par de oligonucleótidos mencionado anteriormente, la molécula de tipo ARNip bicatenaria mencionada anteriormente, o la composición mencionada anteriormente, en donde la hebra sentido del par de oligonucleótidos comprende una secuencia de nucleobases sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleobases del ácido nucleico diana.

40 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso del par de oligonucleótidos mencionado anteriormente, la molécula de tipo ARNip bicatenaria mencionada anteriormente, o la composición mencionada anteriormente, para degradar o disminuir el nivel de un ácido nucleico diana, o para disminuir la producción o el nivel de un polipéptido codificado por dicho ácido nucleico diana, en una célula, en donde la hebra sentido del par de oligonucleótidos comprende una secuencia de nucleobases sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleobases del ácido nucleico diana.

45 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso del par de oligonucleótidos mencionado anteriormente, la molécula de tipo ARNip bicatenaria mencionada anteriormente, o la composición mencionada anteriormente, para la preparación de un medicamento, en donde la hebra sentido del par de oligonucleótidos comprende una secuencia de nucleobases sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleobases del ácido nucleico diana.

50 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso del par de oligonucleótidos mencionado anteriormente, la molécula de tipo ARNip bicatenaria mencionada anteriormente, o la composición mencionada anteriormente, para prevenir o tratar una enfermedad o afección asociada con la expresión de un ácido nucleico diana, o de un polipéptido codificado por dicho ácido nucleico diana, en un sujeto, en donde la hebra sentido del par de oligonucleótidos comprende una secuencia de nucleobases sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleobases del ácido nucleico diana.

55 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso del par de oligonucleótidos mencionado anteriormente, la molécula de tipo ARNip bicatenaria mencionada anteriormente, o la composición mencionada anteriormente, para la preparación de un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad o afección asociada con la expresión de un ácido nucleico diana, o de un polipéptido codificado por dicho ácido nucleico diana, en un sujeto, en donde la

hebra sentido del par de oligonucleótidos comprende una secuencia de nucleobases sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleobases del ácido nucleico diana.

5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso del par de oligonucleótidos mencionado anteriormente, la molécula de tipo ARNip bicatenaria mencionada anteriormente, o la composición mencionada anteriormente, como medicamento.

10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un kit que comprende el par de oligonucleótidos mencionado anteriormente, la molécula de tipo ARNip bicatenaria mencionada anteriormente, o la composición mencionada anteriormente. En una forma de realización, el kit mencionado anteriormente comprende además instrucciones para inhibir la expresión de un ácido nucleico diana en una célula, desgradar o disminuir el nivel del ácido nucleico diana, o para disminuir la producción o el nivel de un polipéptido codificado por el ácido nucleico diana.

### 15 Breve descripción de las figuras

En las figuras adjuntas:

20 La **figura 1** muestra la actividad ARNip de dúplex 2'-fluorados que se dirigen a los nucleótidos 1818-1836 de la luciferasa de luciérnaga. (A) Resultados iniciales (media de dos transfecciones); (B) Actividad confirmada de los dúplex más potentes de (A), a concentraciones menores (media de dos transfecciones). En (A): barras negras = 2 nM, barras grises = 10 nM y barras blancas = 40 nM. En (B) barras negras = 0,4 nM, barras grises = 2 nM y barras blancas = 10 nM;

25 La **figura 2** muestra espectros de dicroísmo circular (CD) de los dúplex oligonucleotídicos jg1-gj15. (A) jg1-jg5, en los que ambas hebras tienen la misma química; (B) jg6-jg9, en los que una de las dos hebras es una hebra química completamente modificada; (C) jg10-jg13, en los que una de las dos hebras es una hebra completamente modificada de una química única; y (D) heterodúplex completamente modificados jg14-jg15. El dúplex control jg-1 (ARN bicatenario) se incluye en todos los espectros para comparación. En (A) línea negra = jg-1, línea discontinua = jg-2, línea gris fina = jg-3, línea gris gruesa = jg-4, línea de puntos = jg-5. En (B) línea negra = jg-1, línea gris gruesa = jg-6, línea gris fina = jg-7, línea de puntos = jg-8, línea discontinua = jg-9. En (C) línea negra = jg-1, línea discontinua = jg-10, línea negra fina = jg-11, línea gris gruesa = jg-12, línea de puntos = jg-13. En (D) línea negra = jg-1, línea de puntos = jg-14, línea discontinua = jg-15;

35 La **figura 3** muestra actividad ARNip de dúplex 2'-fluorados que se dirigen a los nucleótidos 515 a 533 de luciferasa de luciérnaga. Barras negras = 40 nM, barras grises = 10 nM y barras blancas = 2 nM;

40 La **figura 4** muestra el efecto de transfecciones de ARN interferente pequeño (ARNip) en la expresión de la proteína de unión a eIF4E (4E-BP) 1 o 4E-BP2. (A) Las transfecciones de ARNip se realizaron en células HEK293T usando el reactivo Lipofectamine Plus™ en células sembradas al 70-80% de confluencia en una placa de 24 pocillos. Para cada pocillo, se mezclaron o bien 2,5 µl (1) o 5 µl de dúplex de ARNip (dúplex hibridado 20 µM) con 50 µl de OPTI-MEM™ y 1 µl del reactivo Plus™ y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente (RT). Una mezcla de 4 µl de reactivo Lipofectamine™ y 50 µl de OPTI-MEM™ se añadió después a la mezcla de ARN en precomplejo y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente antes de añadirla a las células. Cinco horas después, el medio de transfección se sustituyó por medio completo. Las células se recogieron 48 horas después de la transfección y las proteínas se extrajeron para análisis por inmunotransferencia usando anticuerpos contra 4E-BP1 y 4E-BP2 o β-actina. (B) Secuencias de los ARNip usados en (A) (también mostradas en la tabla X posteriormente);

50 La **figura 5** muestra el efecto de transfecciones de ARNip sobre la producción de IFN por células HEK293T después de estimulación con poli(I:C). Las transfecciones con ARNip se realizaron en células HEK293T usando el reactivo Lipofectamine Plus™ en células sembradas al 70-80% de confluencia en una placa de 24 pocillos. Para cada pocillo, se mezclaron 5 µl de dúplex de ARNip tanto de 4E-BP1 como 4E-BP2 (modificados H-611 o sin modificar) (dúplex hibridado 20 µM) con 75 µl de OPTI-MEM™ y 1 µl del reactivo Plus™ y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente (RT). Una mezcla de 5 µl de reactivo Lipofectamine™ y 75 µl de OPTI-MEM™ se añadió después a la mezcla de ARN en precomplejo y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente antes de añadirla a las células. 55 Cinco horas después, el medio de transfección se sustituyó por medio completo. 48 horas después de la transfección, las células o bien se dejaron sin tratar o se trataron con 1 µg/ml de poli(I:C) durante 24 horas. Los sobrenadantes de las células sin tratar y tratadas se recogieron y la cantidad de IFN se cuantificó usando HEK-Blue™ IFN-α/β Cells (InvivoGen, San Diego, EE UU) según el protocolo del fabricante;

60 La **figura 6** muestra experimentos de reducción de luciferasa usando dúplex oligonucleotídicos que comprenden hebras sentido de 2'F-AAN y hebras antisentido que contienen salientes de 2'F-AAN e insectos de ANB;

65 La **figura 7** muestra experimentos de reducción de luciferasa usando dúplex oligonucleotídicos que comprenden una hebra sentido que contiene tanto 2'F-AAN como ANB;

La **figura 8** muestra experimentos de reducción de luciferasa usando dúplex oligonucleotídicos que comprenden una hebra sentido que contiene tanto 2'F-AAN como ANB hibridada con una hebra antisentido de 2'F-ARN por completo;

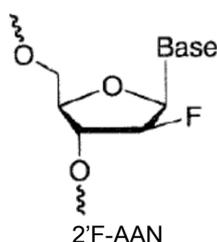
La **figura 9** muestra experimentos de reducción de c-myc usando ARNip 2'F-AAN/2'F-ARN/ANB. **(A)** % de expresión génica relativa a tratamiento control después de tratamiento con las dosis indicadas de varios ARNip. **(B)** Índice de supervivencia de células de leucemia después de tratamiento con ARNip (el eje y representa el número de células de leucemia que aún viven después de los periodos de tiempo indicados después del tratamiento con el ARNip indicado).

**10 Divulgación de la invención**

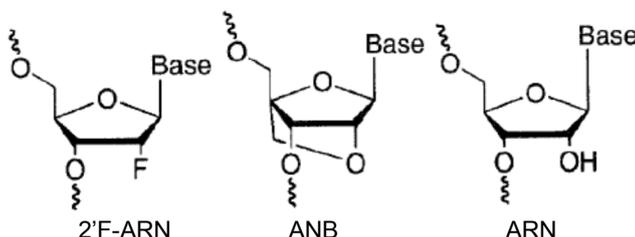
La invención se refiere a oligonucleótidos y sus usos, por ejemplo, en varios tipos de enfoques de silenciamiento de genes. En los estudios descritos en el presente documento, los inventores han mostrado que ARNip químicamente modificado, y más particularmente dúplex oligonucleotídicos que comprenden uno o más nucleótidos de tipo ADN y/o de tipo ARN son capaces de mediar silenciamiento de genes.

“Residuo de tipo ADN” como se usa en el presente documento en referencia a la conformación se refiere a una conformación de, por ejemplo, un nucleósido o nucleótido modificado que es similar a la conformación de una unidad de ADN sin modificar correspondiente. La conformación de tipo ADN se puede expresar, por ejemplo, como que tiene un valor de pseudorrotación (P) sur o este. Los nucleótidos de tipo ADN incluyen, por ejemplo, 2'-desoxirribonucleótidos, arabinonucleótidos 2'-desoxi-2'-sustituidos tal como 2'-desoxi-2'-fluoroarabinonucleótidos (2'F-AAN o FAAN), y análogos de fosforotioato correspondientes. “Residuo de tipo ARN” como se usa en el presente documento en referencia a la conformación se refiere a una conformación de, por ejemplo, un nucleósido o nucleótido modificado que es similar a la conformación de una unidad de ARN sin modificar correspondiente. La conformación de tipo ARN se puede expresar, por ejemplo, como que tiene un valor P norte. Además, las moléculas de tipo ARN tienden a adoptar una hélice de forma A mientras que las moléculas de tipo ADN tienden a adoptar una hélice de forma B. Los nucleótidos de tipo ARN incluyen, por ejemplo, nucleótidos de ARN, nucleótidos de ARN 2'-sustituidos tal como nucleótidos de 2' fluoro-ARN (2'F-ARN), nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (ANB) (también definidos como ácidos nucleicos en puente o nucleótidos bicíclicos), 2'-fluoro-4'-tioarabinonucleótido (nucleótidos 4'S-FAAN), 2'-O-alkil-ARN y análogos de fosfortiorato correspondientes.

La estructura de un residuo de tipo ADN representativo (2'F-AAN) se ilustra a continuación:



Las estructuras de ejemplos de residuos de tipo ARN (ARN, ANB y 2'F-ARN) se ilustran a continuación:



En un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un par de oligonucleótidos que pueden formar un dúplex bicatenario, por ejemplo:

45 Sentido: nucleótido(s) de tipo ADN, nucleótido(s) de tipo ARN, o ambos  
 Antisentido: nucleótido(s) de tipo ADN, nucleótido(s) de tipo ARN, o ambos

Sentido: nucleótido(s) de tipo ADN, nucleótido(s) de tipo ARN, o ambos  
 Antisentido: nucleótido(s) de tipo ARN

50 Sentido: nucleótido(s) de tipo ADN  
 Antisentido: nucleótido(s) de tipo ADN, nucleótido(s) de tipo ARN, o ambos

Sentido: nucleótido(s) de tipo ARN  
 Antisentido: nucleótido(s) de tipo ADN, nucleótido(s) de tipo ARN, o ambos

5 Sentido: nucleótido(s) de tipo ADN  
 Antisentido: nucleótido(s) de tipo ARN

10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un par de oligonucleótidos que pueden formar un dúplex que comprende una hebra sentido (por ejemplo, una primera) y una hebra antisentido (por ejemplo, una segunda) complementaria a la hebra sentido (o primera), en donde el dúplex oligonucleotídico comprende:

- (a) uno o más arabinonucleótidos sustituidos en 2' (AAN); y  
 (b) (i) uno o más ribonucleótidos (ARN) sustituidos en 2', (ii) uno o más nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (ANB), o (iii) una combinación de (i) y (ii).

15 En una forma de realización, el dúplex oligonucleotídico anteriormente mencionado comprende además cualquier combinación de residuos de tipo ADN y/o de tipo ARN.

20 Los oligonucleótidos de la invención pueden incluir los que contienen enlaces de esqueleto interazúcar tal como fosfotriésteres, metilfosfonatos, enlaces interazúcar alquilo o cicloalquilo de cadena corta o enlaces interazúcar heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta, fosforotioatos y esos con formacetal (O-CH<sub>2</sub>-O), esqueletos CH<sub>2</sub>--NH--O--CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--O--CH<sub>2</sub> (conocido como esqueleto metilén(metilimino) o MMI), CH<sub>2</sub>--O--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub> y O--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub> (donde fosfodiéster es O--PO<sub>2</sub>--O--CH<sub>2</sub>). También se pueden usar oligonucleótidos que tienen estructuras de esqueleto de morfolino (patente en EE UU No. 5.034.506). En formas de  
 25 realización alternativas, los oligonucleótidos antisentido pueden tener un esqueleto de ácido peptidonucleico (APN, algunas veces denominado "ácido proteínico nucleico"), en el que el esqueleto fosfodiéster del oligonucleótido se puede sustituir con un esqueleto de poliamida en donde las bases nucleosídicas se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza o grupos metileno en el esqueleto de poliamida (Nielsen *et al.*, *Science* 1991 **254**(5037): 1497-1500 y patente en EE UU No. 5.539.082). Los enlaces fosfodiéster se pueden sustituir con estructuras que son  
 30 quirales y enantioméricamente específicas. Los expertos en la materia serán capaces de seleccionar otros enlaces para uso en la práctica de la invención.

35 "Nucleósido" se refiere a una combinación base-azúcar, la base está unida al azúcar a través de un enlace N-glucosídico. "Nucleótido" se refiere a un nucleósido que además comprende un grupo fosfato unido a la parte azúcar del nucleósido. "Base", "base de ácido nucleico" o "nucleobase" se refiere a una fracción de base heterocíclica, que en un nucleósido o nucleótido está unida a la porción azúcar del mismo, generalmente en la posición 1' de la fracción azúcar, también conocida como posición anomérica. Este término incluye bases tanto naturales como modificadas. Las dos clases más comunes de bases naturales son purinas y pirimidinas, y comprenden, por ejemplo, guanina, citosina, timina, adenina y uracilo. Se conocen en la técnica un número de otras bases naturales,  
 40 así como bases modificadas, por ejemplo, inosina, 5-metilcitosina, 2-tiotimina, 4-tiotimina, 7-deazaadenina, 9-deazaadenina, 3-deazaadenina, 7-deazaguanina, 9-deazaguanina, 6-tioguanina, isoguanina, 2,6-diaminopurina, hipoxantina, y 6-tiohipoxantina.

45 Los oligonucleótidos de la invención también pueden incluir especies que incluyen al menos una base de nucleótido modificada. Por tanto, se pueden usar purinas y pirimidinas diferentes de las normalmente encontradas en la naturaleza. De forma similar, también se pueden efectuar modificaciones en la porción pentofuranosilo de las subunidades de nucleótido. Los ejemplos de tales modificaciones incluyen 2'-sustitución/modificación, tal como nucleótidos 2'-O-alquilo y 2'-halógeno sustituidos. Algunos ejemplos específicos de modificaciones en la posición 2' de las fracciones de azúcar que son útiles en la presente invención son OH, SH, SCH<sub>3</sub>, F, OCN, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> NH<sub>2</sub> o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> CH<sub>3</sub> donde n es desde 1 hasta aproximadamente 10; alquilo inferior de C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub>, alquilo inferior sustituido, alcarilo o aralquilo; Cl; Br; CN; CF<sub>3</sub>; OCF<sub>3</sub>; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; SOCH<sub>3</sub>; SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; ONO<sub>2</sub>; NO<sub>2</sub>; N<sub>3</sub>; NH<sub>2</sub>; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo que corta ARN; un grupo indicador; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen  
 50 propiedades similares. Se pueden sustituir uno o más grupos pentafuranosilo por otro azúcar, por un azúcar acíclico, por un imitador de azúcar tal como ciclobutilo o por otra fracción que toma el lugar del azúcar tal como la hexosa de seis carbonos o el oxapano de siete carbonos.

60 ANB generalmente se refiere a biclónucleótidos e incluye, por ejemplo, β-D y α-L biclónucleótidos, biclónucleótidos tal como ácidos nucleicos xilo-bloqueados (patente en EE UU No. 7.084.125), ácidos nucleicos L-ribo-bloqueados (patente en EE UU No. 7.053.207), ácidos nucleicos 1'-2' bloqueados (patentes en EE UU No. 6.734.291 y 6.639.059), ácidos nucleicos 3'-5' bloqueados (patente en EE UU No. 6.083.482), así como ácidos nucleicos 2'-4' bloqueados.

65 En algunas formas de realización, los oligonucleótidos según esta invención pueden comprender desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 100 unidades de nucleótidos, en formas de realización adicionales

- desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 100, desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 30, desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 30, desde aproximadamente 18 hasta aproximadamente 27, desde aproximadamente 19 hasta aproximadamente 27, desde aproximadamente 18 hasta aproximadamente 25, desde aproximadamente 19 hasta aproximadamente 25, o desde aproximadamente 19 hasta aproximadamente 23 unidades de nucleótidos, tal como 19, 21 o 23 unidades de nucleótidos. Como se apreciará, una unidad de nucleótido es una combinación base-azúcar (o una combinación de estructuras análogas) adecuadamente unidas a una unidad de nucleótido adyacente a través de enlaces fosfodiéster u otros formando una estructura esqueleto.
- La fracción de base heterocíclica de cualquier nucleótido descrito en el presente documento puede ser una de las bases canónicas de ADN o ARN, por ejemplo, adenina, citosina, guanina, timina o uracilo. En otras formas de realización de la invención, algunas de las fracciones de bases heterocíclicas pueden estar hechas de bases modificadas o no canónicas, por ejemplo, inosina, 5-metilcitosina, 2-tiotimina, 4-tiotimina, 7-deazaadenina, 9-deazaadenina, 3-deazaadenina, 7-deazaguanina, 9-deazaguanina, 6-tioguanina, isoguanina, 2,6-diaminopurina, hipoxantina, y 6-tiohipoxantina.
- En otras formas de realización de la invención, el oligonucleótido comprende uno o más de los siguientes enlaces internucleotídicos: a) enlaces fosfodiéster; b) enlaces fosfotriéster; c) enlaces fosforotioato; d) enlaces metilfosfonato; e) enlaces boranofosfato; o f) enlaces 2'-5'-fosfodiéster. En formas de realización, los enlaces internucleotídicos son enlaces fosfodiéster, enlaces fosforotioato o una combinación de los mismos.
- En otra forma de realización, el par o dúplex de oligonucleótidos anteriormente mencionado comprende uno o más AAN sustituidos en 2' y uno o más ARN sustituidos en 2' (en una o ambas hebras).
- En una forma de realización el par o dúplex de oligonucleótidos anteriormente mencionado comprende uno o más AAN sustituidos en 2' y uno o más ANB (en una o ambas hebras).
- En otra forma de realización, el par o dúplex de oligonucleótidos anteriormente mencionado comprende uno o más AAN sustituidos en 2', uno o más ARN sustituidos en 2' y uno o más ANB (en una o ambas hebras).
- En formas de realización, los residuos de tipo ADN y de tipo ARN están en segmentos alternantes en una hebra, tal como de una manera irregular (por lo cual puede haber diferencias en el número de residuos por segmento) o una manera regular (por lo cual cada segmento tiene el mismo número de residuos), o combinaciones de las mismas. En una forma de realización, cada segmento alternante comprende un residuo (denominado diseño o configuración altímero 1-1). En otra forma de realización, cada segmento alternante comprende dos residuos (denominado diseño altímero 2-2). En otra forma de realización, cada segmento alternante comprende tres residuos (denominado diseño altímero 3-3). En aun otra forma de realización, los segmentos alternantes anteriormente mencionados están en la hebra sentido.
- En una forma de realización, el dúplex de oligonucleótidos anteriormente mencionado comprende (en una o ambas hebras) al menos un residuo 2'-F-ARN. En una forma de realización adicional, el residuo 2'-F-ARN anteriormente mencionado es una 2'-F-ARN pirimidina. En otra forma de realización, el anteriormente mencionado al menos un residuo 2'-F-ARN está en la hebra antisentido.
- En una forma de realización adicional, el par o dúplex de oligonucleótidos anteriormente mencionado está completamente modificado con uno o más residuos 2'-F-ARN o 2'-F-AAN. En otra forma de realización, el dúplex de oligonucleótidos anteriormente mencionado comprende (en una o ambas hebras) una combinación de una o más 2'-F-ARN pirimidinas y 2'-F-AAN purinas. En otra forma de realización, el dúplex de oligonucleótidos anteriormente mencionado comprende (en una o ambas hebras) uno o más segmentos alternantes de residuos de 2'-F-ARN y residuos de 2'-F-AAN (altímeros), de una manera regular o irregular. En una forma de realización adicional, cada segmento comprende de 1 a 5 residuos. En una forma de realización adicional, cada segmento comprende un residuo (diseño de altímero 1-1). En otra forma de realización, cada segmento comprende tres residuos (diseño de altímero 3-3). En otra forma de realización, el dúplex de oligonucleótidos anteriormente mencionado comprende una mezcla de diseños de altímero 1-1 y 3-3. En otra forma de realización, los segmentos alternantes anteriormente mencionados de residuos 2'-F-ARN y residuos 2'-F-AAN (altímeros) están en la hebra sentido.
- En otra forma de realización, el par o dúplex de oligonucleótidos anteriormente mencionado está completamente modificado con uno o más residuos de 2'-F-ARN, residuos de 2'-F-AAN y residuos de ANB. En una forma de realización, el uno o más residuos de ANB están tanto en la hebra sentido como en la hebra antisentido. En otra forma de realización, el uno o más residuos de ANB están en la hebra antisentido. En otra forma de realización, el uno o más residuos de ANB están en la hebra sentido.
- En una forma de realización, la hebra sentido anteriormente mencionada comprende (i) 2'-F-AAN; (ii) 2'-F-ARN; (iii) ARN; (iv) ANB; (v) ADN; o (vi) cualquier combinación de (i) a (v).
- En una forma de realización, la hebra antisentido anteriormente mencionada comprende (i) 2'-F-AAN; (ii) 2'-F-ARN; (iii) ARN; (iv) ANB; (v) ADN; o (vi) cualquier combinación de (i) a (v).

En una forma de realización, la hebra sentido anteriormente mencionada comprende:

- 5 (i) 2'F-AAN solo;
- (ii) 2'F-ARN solo;
- (iii) una combinación de 2'F-ARN y 2'F-AAN;
- (iv) ARN solo;
- (v) una combinación de 2'F-AAN y ARN;
- 10 (vi) una combinación de 2'F-AAN, 2'F-ARN y ARN;
- (vii) una combinación de 2'F-AAN, ARN y ANB.

En una forma de realización adicional, la hebra sentido anteriormente mencionada consiste en:

- 15 (i) 2'F-AAN solo;
- (ii) 2'F-ARN solo;
- (iii) una combinación de 2'F-ARN y 2'F-AAN;
- (iv) ARN solo;
- (v) una combinación de 2'F-AAN y ARN;
- 20 (vi) una combinación de 2'F-AAN, 2'F-ARN y ARN; o
- (vii) una combinación de 2'F-AAN, ARN y ANB.

En otra forma de realización, la hebra antisentido anteriormente mencionada comprende:

- 25 (i) 2'F-ARN solo;
- (ii) ARN solo;
- (iii) 2'F-AAN solo;
- (iv) una combinación de 2'F-ARN y 2'F-AAN;
- (v) una combinación de ARN y ANB; o
- 30 (vi) una combinación de 2'F-AAN, ARN y ANB.

En una forma de realización adicional, la hebra antisentido anteriormente mencionada consiste en:

- 35 (i) 2'F-ARN solo;
- (ii) ARN solo;
- (iii) 2'F-AAN solo;
- (iv) una combinación de 2'F-ARN y 2'F-AAN;
- (v) una combinación de ARN y ANB; o
- (vi) una combinación de 2'F-AAN, ARN y ANB.

40 En otra forma de realización, el par o dúplex de oligonucleótidos anteriormente mencionado comprende:

- (a) Sentido: una combinación de 2'F-ARN y 2'F-AAN  
Antisentido: ARN solo;
- 45 (b) Sentido: una combinación de 2'F-ARN pirimidinas y 2'F-AAN purinas  
Antisentido: ARN solo;
- (c) Sentido: una combinación de 2'F-ARN y 2'F-AAN en diseño de altímero 1-1  
Antisentido: ARN solo;
- (d) Sentido: 2'F-AAN solo  
Antisentido: 2'F-ARN solo;
- 50 (e) Sentido: una combinación de 2'F-ARN y 2'F-AAN en diseño de altímero 3-3  
Antisentido: ARN solo;
- (f) Sentido: una combinación de 2'F-ARN + 2'F-AAN en diseños de altímero 3-3 y 1-1  
Antisentido: ARN solo;
- 55 (g) Sentido: una combinación de 2'F-AAN y ARN  
Antisentido: 2'F-ARN solo;
- (h) Sentido: una combinación de 2'F-ARN y 2'F-AAN en diseño de altímero 3-3  
Antisentido: 2'F-ARN solo;
- (i) Sentido: una combinación de 2'F-ARN y 2'F-AAN en diseños de altímero 3-3 y 1-1  
Antisentido: 2'F-ARN solo;
- 60 (j) Sentido: una combinación de 2'F-ARN y 2'F-AAN en diseño de altímero 1-1  
Antisentido: 2'F-ARN solo;
- (k) Sentido: 2'F-AAN solo  
Antisentido: una combinación de ARN y ANB;
- (l) Sentido: una combinación de 2'F-AAN y ARN  
Antisentido: una combinación de ARN y ANB;
- 65 (m) Sentido: una combinación de 2'F-AAN, ARN y ANB

- (n) Antisentido: ARN solo;  
Sentido: una combinación de 2'F-AAN, ARN y ANB  
Antisentido: una combinación de ARN y ANB; o  
(o) Sentido: una combinación de 2'F-AAN, ARN y ANB  
Antisentido: 2'F-ARN solo.

En una forma de realización adicional, en el caso de una hebra sentido que comprende un núcleo de 19 residuos (con o sin extensión adicional), la hebra sentido comprende residuos de ANB en las posiciones 3, 11, 16 y/o 17. En una forma de realización adicional, en el caso de una hebra antisentido que comprende un núcleo de 19 residuos (con o sin extensión adicional), la hebra antisentido comprende residuos de ANB en la posición 19 (leído de 5' a 3').

En una forma de realización adicional, el par o dúplex de oligonucleótidos anteriormente mencionados comprende:

- (a) Sentido:  $(2'F-ARN \text{ pirimidinas})_x (2'F-AAN \text{ purinas})_y$   
Antisentido:  $(ARN)_z$   
en donde x es el número de pirimidinas e y es el número de purinas en la hebra sentido, y en donde  $x + y = z$ . En una forma de realización  $z = 19$ .
- (b) Sentido:  $[(2'F-AAN)(2'F-ARN)]_9 (2'F-AAN)$   
Antisentido:  $(ARN)_{19}$
- (c) Sentido:  $(2'F-AAN)_{19}$   
Antisentido:  $(2'F-ARN)_{19}$
- (d) Sentido:  $[(2'F-AAN)_3(2'F-ARN)_3]_3 (2'F-AAN)$   
Antisentido:  $(ARN)_{19}$
- (e) Sentido:  $[(2'F-AAN)_3(2'F-ARN)_3]_2 [(2'F-AAN)(2'F-ARN)]_3 (2'F-AAN)$   
Antisentido:  $(ARN)_{19}$
- (f) Sentido:  $(2'F-AAN)_{14}(ARN)_5$   
Antisentido:  $(2'F-ARN)_{19}$
- (g) Sentido:  $[(2'F-AAN)_3(2'F-ARN)_3]_3 (2'F-AAN)$   
Antisentido:  $(2'F-ARN)_{19}$
- (h) Sentido:  $[(2'F-AAN)_3(2'F-ARN)_3]_2 [(2'F-AAN)(2'F-ARN)]_3 (2'F-AAN)$   
Antisentido:  $(2'F-ARN)_{19}$
- (i) Sentido:  $[(2'F-AAN)(2'F-ARN)]_9 (2'F-AAN)$   
Antisentido:  $(2'F-ARN)_{19}$
- (j) Sentido:  $(2'F-AAN)_{19}$   
Antisentido:  $(ANB) (ARN)_{18}$
- (k) Sentido:  $(2'F-AAN)_{19}$   
Antisentido:  $(ANB) (ARN) (ANB) (ARN)_{16}$
- (l) Sentido:  $(2'F-AAN)_{19}$   
Antisentido:  $(ARN)_{11} (ANB)_2 (ARN)_{16}$
- (m) Sentido:  $(2'F-AAN)(ARN)(ANB)(ARN)(2'F-AAN)_4(ARN)_2(ANB)(ARN)_2(2'F-AAN)_2(ANB)(ARN)(2'F-AAN)_2$   
Antisentido:  $(ARN)_{19}$
- (n) Sentido:  $(2'F-AAN)(ARN)(ANB)(ARN)(2'F-AAN)_4(ARN)_2(ANB)(ARN)_2(2'F-AAN)(ARN)(2'F-AAN)(ANB)(2'F-AAN)(ARN)$   
Antisentido:  $(ARN)_{19}$
- (o) Sentido:  $(2'F-AAN)(ARN)(ANB)(ARN)(2'F-AAN)_4(ARN)_2(ANB)(ARN)_2(2'F-AAN)(ARN)_5$   
Antisentido:  $(ARN)_{19}$
- (p) Sentido:  $(2'F-AAN)(ARN)(ANB)(ARN)(2'F-AAN)_4(ARN)_2(ANB)(ARN)_2(2'F-AAN)_2(ANB)(ARN)(2'F-AAN)_2$   
Antisentido:  $(ANB) (ARN)_{18}$
- (q) Sentido:  $(2'F-AAN)(ARN)(ANB)(ARN)(2'F-AAN)_4(ARN)_2(ANB)(ARN)_2(2'F-AAN)(ARN)(2'F-AAN)(ANB)(2'F-AAN)(ARN)$   
Antisentido:  $(ANB) (ARN)_{18}$
- (r) Sentido:  $(2'F-AAN)(ARN)(ANB)(ARN)(2'F-AAN)_4(ARN)_2(ANB)(ARN)_2(2'F-AAN)_2(ARN)_2(2'F-AAN)_2$   
Antisentido:  $(ANB) (ARN)_{18}$
- (s) Sentido:  $(2'F-AAN)(ARN)(ANB)(ARN)(2'F-AAN)_4(ARN)_2(ANB)(ARN)_2(2'F-AAN)(ARN)(2'F-AAN)(ARN)(2'F-AAN)(ARN)$   
Antisentido:  $(ANB) (ARN)_{18}$
- (t) Sentido:  $(2'F-AAN)(ARN)(ANB)(ARN)(2'F-AAN)_4(ARN)_2(ANB)(ARN)_2(2'F-AAN)(ARN)_5$   
Antisentido:  $(ANB) (ARN)_{18}$
- (u) Sentido:  $(2'F-AAN)(ARN)(ANB)(ARN)(2'F-AAN)_4(ARN)_2(ANB)(ARN)_2(2'F-AAN)_2(ANB)(ARN)(2'F-AAN)_2$   
Antisentido:  $(2'F-ARN)_{19}$
- (v) Sentido:  $(2'F-AAN)(ARN)(ANB)(ARN)(2'F-AAN)_4(ARN)_2(ANB)(ARN)_2(2'F-AAN)(ARN)(2'F-AAN)(ANB)(2'F-AAN)(ARN)$   
Antisentido:  $(2'F-ARN)_{19}$

- (w) Sentido: (2'F-AAN)(ARN)(ANB)(ARN)(2'F-AAN)<sub>4</sub>(ARN)<sub>2</sub>(ANB)(ARN)<sub>2</sub>(2'F-AAN)<sub>2</sub>(ARN)<sub>2</sub>(2'F-AAN)<sub>2</sub>  
 Antisentido: (2'F-ARN)<sub>19</sub>
- (x) Sentido: (2'F-AAN)(ARN)(ANB)(ARN)(2'F-AAN)<sub>4</sub>(ARN)<sub>2</sub>(ANB)(ARN)<sub>2</sub>(2'F-AAN)(ARN)(2'F-AAN)(ARN)(2'F-AAN)(ARN)  
 Antisentido: (2'F-ARN)<sub>19</sub> o
- (y) Sentido: (2'F-AAN)(ARN)(ANB)(ARN)(2'F-AAN)<sub>4</sub>(ARN)<sub>2</sub>(ANB)(ARN)<sub>2</sub>(2'F-AAN)(ARN)<sub>5</sub>  
 Antisentido: (2'F-ARN)<sub>19</sub>.

En una forma de realización, el dúplex de oligonucleótidos anteriormente mencionado comprende una extensión (por ejemplo, extensión 5' y/o 3', en una hebra o en ambas hebras). En una forma de realización adicional, la extensión anteriormente mencionada es una extensión de 1 a 5 residuos (por ejemplo, nucleótidos o nucleótidos modificados). En una forma de realización adicional, la extensión anteriormente mencionada es una extensión de 2 residuos (por ejemplo, nucleótidos o nucleótidos modificados). Por ejemplo, una hebra sentido y/o hebra antisentido de 19 residuos puede comprender una extensión de 1 a 5 residuos adicionales. En tal ejemplo, una extensión de 2 residuos en ambas hebras produciría hebras sentido y antisentido de 21 residuos cada una, 19 de los cuales participan en emparejamiento de bases para formar el dúplex (los restantes 2 residuos en cada caso representan las extensiones).

En otra forma de realización, la extensión anteriormente mencionada comprende residuos de ADN, 2'F-AAN y/o 2'F-ARN. En una forma de realización adicional, la extensión anteriormente mencionada comprende dos residuos de 2'F-AAN. En una forma de realización adicional, la extensión anteriormente mencionada que comprende dos residuos de 2'F-AAN está en la hebra sentido.

En otra forma de realización, la extensión anteriormente mencionada comprende dos residuos de 2'F-ARN. En una forma de realización adicional, la extensión anteriormente mencionada que comprende dos residuos de 2'F-ARN está en la hebra antisentido.

En otra forma de realización, la extensión anteriormente mencionada es una extensión 3'.

En otra forma de realización, el par o dúplex de oligonucleótidos anteriormente mencionado está fosforilado en 5' en una o ambas hebras. En una forma de realización adicional, el par o dúplex de oligonucleótidos anteriormente mencionado está fosforilado en 5' en la hebra antisentido.

En formas de realización, la complementariedad de secuencia (por ejemplo, nucleobases) entre la hebra sentido y la hebra antisentido, o la identidad de secuencia (por ejemplo, nucleobases) entre la hebra sentido y un ácido nucleico diana (por ejemplo, ARNm), o una parte del mismo, puede ser "perfecta" o "completa" (100% de complementariedad o identidad).

En formas de realización, la complementariedad entre la hebra sentido y la hebra antisentido, o la identidad entre la hebra sentido y un ácido nucleico diana (por ejemplo, ARNm), o una parte del mismo, es sustancial, por ejemplo, mayor de aproximadamente el 70%. Por ejemplo, para una región dúplex que consiste en 19 pares de bases, un mal emparejamiento produce el 94,7% de complementariedad, dos malos emparejamientos producen aproximadamente el 89,5% de complementariedad, 3 malos emparejamientos producen aproximadamente el 84,2% de complementariedad, 4 malos emparejamientos producen aproximadamente el 79% de complementariedad y 5 malos emparejamientos producen aproximadamente el 74% de complementariedad. Según esto, como se usa en el presente documento, "complementariedad" se refiere tanto a complementariedad perfecta como complementariedad sustancial entre dos secuencias, por ejemplo, a complementariedad mayor de aproximadamente el 70% entre las secuencias. En una forma de realización, la hebra sentido tiene un identidad de al menos 12 nucleótidos, en una forma de realización adicional de al menos 12 nucleótidos contiguos, a al menos una parte de un ácido nucleico diana (por ejemplo, ARNm). En una forma de realización, la hebra sentido tiene una identidad de al menos 13 nucleótidos, en formas de realización adicionales de al menos 14, 15, 16, 17 o 18 nucleótidos (contiguos o no), a al menos una parte de un ácido nucleico diana. En otra forma de realización, la hebra sentido tiene identidad completa a una parte del ARNm diana, con la excepción de los nucleótidos que sobresalen (extensión 3').

Además, complementariedad e identidad como se usan en el presente documento se refiere a complementariedad e identidad de las fracciones de nucleobases (por ejemplo, A, C, G, T o U), comúnmente denominados "emparejamiento de bases", y es independiente de, por ejemplo, modificaciones de la fracción azúcar, tal como las descritas en el presente documento. Por ejemplo, un residuo de nucleósido de guanina que tiene cualquier fracción de azúcar (es decir, modificado o no) puede emparejarse con un residuo de nucleósido de citosina que tiene similarmente cualquier fracción de azúcar.

"Identidad" se refiere a similitud de secuencia entre dos péptidos o dos moléculas de ácido nucleico. La identidad se puede determinar comparando cada posición en las secuencias alineadas. Un grado de identidad entre secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos es una función del número de nucleótidos o aminoácidos idénticos o coincidentes en posiciones compartidas por las secuencias. Como se usa el término en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico es "sustancialmente idéntica" a otra secuencia si la actividad funcional de las secuencias se conserva.

Dos secuencias de ácido nucleico se consideran sustancialmente idénticas si, cuando se alinean de forma óptima (con huecos permitidos), comparten al menos aproximadamente el 70% de similitud o identidad de secuencia, o si las secuencias comparten motivos funcionales definidos. En formas de realización alternativas, la similitud de secuencia en secuencias sustancialmente idénticas óptimamente alineadas puede ser al menos el 75%, 80%, 85%, 90% o 95%. Una secuencia "no relacionada" comparte menos del 40% de identidad, aunque referiblemente menos de aproximadamente el 25% de identidad, con una secuencia de referencia determinada (por ejemplo, un ácido nucleico diana).

Los ácidos nucleicos sustancialmente complementarios son ácidos nucleicos en los que el complemento de una molécula es sustancialmente idéntico a la otra molécula. Dos secuencias de ácido nucleico o proteína se consideran sustancialmente idénticas si, cuando se alinean de forma óptima, comparten al menos aproximadamente el 70% de identidad de secuencia. En formas de realización alternativas, la identidad de secuencia puede ser, por ejemplo, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, o al menos el 95%. El alineamiento óptimo de secuencias para comparaciones de identidad se puede realizar usando una variedad de algoritmos, tal como el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math* 2: 482, el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443, el método de búsqueda para similitud Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444, e implementaciones computarizadas de estos algoritmos (tal como GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de Wisconsin Genetics Software, Genetics Computer Group, Madison, WI, EE UU.). La identidad de secuencia también se puede determinar usando el algoritmo BLAST, descrito en Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403-10 (usando los ajustes por defecto publicados). El software para realizar análisis por BLAST puede estar disponible a través del Centro Nacional para Información en Biotecnología. El algoritmo BLAST implica primero identificar pares de secuencia de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema que o bien coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral valorada positivamente T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina el umbral de puntuación de palabra vecina. Los aciertos de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia durante tanto como la puntuación acumulada de alineamiento se pueda aumentar. La extensión de los aciertos de palabras en cada dirección se para cuando se cumplen los siguientes parámetros: la puntuación de alineamiento acumulada disminuye en la cantidad X de su valor alcanzado máximo; la puntuación acumulada va a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos que puntúan negativo; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLAST puede usar por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (Henikoff y Henikoff, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919) alineamiento (B) de 50, expectativa (E) de 10 (o 1, o 0,1 o 0,01 o 0,001 o 0,0001), M=5, N=4, y una comparación en ambas hebras. Una medida de la similitud estadística entre dos secuencias usando el algoritmo BLAST es la menor probabilidad de suma (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría al azar. En formas de realización alternativas de la invención, secuencias de nucleótidos o aminoácidos se consideran sustancialmente idénticas si la menor probabilidad de suma en una comparación de las secuencias de prueba es menor que aproximadamente 1, preferiblemente menor que aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor que aproximadamente 0,01, y lo más preferiblemente menor que aproximadamente 0,001.

Una indicación alternativa de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente complementarias es que las dos secuencias hibriden entre sí en condiciones moderadamente rigurosas, o preferiblemente, rigurosas. La hibridación a secuencias unidas a filtro en condiciones moderadamente rigurosas se puede, por ejemplo, realizar, en NaHPO<sub>4</sub> 0,5 M, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, EDTA 1 mM a 65°C y lavar en SSC 0,2x/SDS al 1% a 42°C (véase Ausubel, *et al.* (eds), 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, en p. 2.10.3). Alternativamente, la hibridación a secuencias unidas a filtro en condiciones rigurosas se puede, por ejemplo, realizar en NaHPO<sub>4</sub> 0,5 M, SDS al 7%, EDTA 1 mM a 65°C y lavar en SSC 0,1x/SDS al 0,1% a 68°C (véase Ausubel, *et al.* (eds), 1989, anteriormente). Las condiciones de hibridación se pueden modificar según métodos conocidos dependiendo de la secuencia de interés (véase Tijssen, 1993, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology -- Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parte I, Capítulo 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, Nueva York). Generalmente, se seleccionan condiciones rigurosas que sean aproximadamente 5°C menos que el punto de fusión térmico para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos.

La hebra sentido y la hebra antisentido pueden estar unidas por una estructura en bucle, que puede estar compuesta de un polímero no de ácido nucleico como, entre otros, polietilenglicol. Alternativamente, la estructura en bucle puede estar compuesta de un ácido nucleico, incluyendo ribonucleótidos modificados y sin modificar y desoxirribonucleótidos modificados y sin modificar.

En una forma de realización, el extremo 5' de la hebra sentido de dúplex de oligonucleótidos puede estar unido al extremo 3' de la hebra antisentido, o el extremo 3' de la hebra sentido puede estar unido al extremo 5' de la hebra sentido, dicha unión es a través de un enlazador de ácido nucleico que típicamente tiene una longitud entre 2 a 100 nucleótidos (o nucleótidos modificados), preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 nucleobases.

En una forma de realización, el dúplex de oligonucleótidos anteriormente mencionado es un dúplex en horquilla, que es una hebra única que comprende las hebras sentido y antisentido que es autocomplementaria y se pliega sobre si misma.

5 La invención proporciona además una sal, tal como una sal farmacéuticamente aceptable, de cualquiera de los compuestos mencionados anteriormente (por ejemplo, nucleótido, dúplex de oligonucleótidos, ARNip, o molécula de tipo ARNip) donde sea aplicable.

10 La presente invención también se refiere a compuestos que reducen la expresión de varios genes, es decir, disminuyen la producción de un polipéptido codificado. La invención proporciona oligonucleótidos/dúplex de oligonucleótidos de la invención y usos de los mismos en aplicaciones de ARNip/iARN, por lo cual la expresión de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés, o un fragmento del mismo, se puede inhibir o prevenir usando tecnología de interferencia de ARN (iARN), un tipo de silenciamiento génico postranscripcional. Se puede usar iARN para crear un pseudo "knockout", es decir, un sistema en el que la expresión del producto codificado por un gen o región codificante de interés se reduce, produciendo una reducción global de la actividad del producto codificado en un sistema. Como tal, se puede realizar iARN para atacar un ácido nucleico de interés o fragmento o variante del mismo, para a su vez reducir su expresión y el nivel de actividad del producto que codifica. Tal sistema se puede usar para estudios funcionales del producto, así como para tratar trastornos relacionados con la actividad de tal producto. Se describe la iARN en, por ejemplo, las publicaciones de patentes en EE UU No. 2002/0173478 (Gewirtz; publicada el 21 de noviembre, 2002) y 2002/0132788 (Lewis *et al.*; publicada el 7 de noviembre, 2002). Están comercialmente disponibles reactivos y kits para realizar iARN de, por ejemplo, Ambion Inc. (Austin, TX, EE UU), New England Biolabs Inc. (Beverly, MA, EE UU) e Invitrogen (Carlsbad, CA, EE UU).

25 Se piensa que el agente inicial para iARN en algunos sistemas es ARNbc o moléculas de ARNbc modificado correspondientes a un ácido nucleico diana. Se piensa que después el ARNbc se corta a ARN interferentes pequeños (ARNip) que tienen, por ejemplo, 21-23 nucleótidos de longitud (dúplex de 19-21 pb, cada uno con extensiones 3' de 2 nucleótidos). La enzima que se piensa efectúa esta primera etapa de corte (la versión de *Drosophila* se denomina "Dicer") se categoriza como miembro de la familia de RNasa III de ribonucleasas específicas de ARNbc. Alternativamente, se puede efectuar iARN introduciendo directamente en la célula, o generando en la célula introduciendo en la célula, un ARNip o molécula de tipo ARNip o un precursor adecuado (por ejemplo, vector que codifica precursor(es), etc.), de la misma. Un ARNip se puede asociar después con otros componentes intracelulares para formar un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Por tanto, el RISC formado puede posteriormente dirigirse a un transcrito de interés a través de interacciones de emparejamiento de bases entre su componente ARNip y el transcrito diana en virtud de homología, produciendo el corte del transcrito diana aproximadamente 12 nucleótidos desde el extremo 3' del ARNip. Por tanto, el ARNm diana se corta y el nivel del producto proteína que codifica se reduce.

40 Se puede efectuar iARN mediante la introducción de moléculas de ARNip o de tipo ARNip sintetizadas *in vitro* en células. Se puede realizar iARN, por ejemplo, usando ARN químicamente sintetizado o moléculas de ARN modificado. Alternativamente, se pueden usar vectores de expresión adecuados para transcribir tal ARN ya sea *in vitro* o *in vivo*. La transcripción *in vitro* de las hebras sentido y antisentido (codificadas por secuencias presentes en el mismo vector o en vectores separados) se puede efectuar usando, por ejemplo, ARN polimerasa de T7, en cuyo caso el vector puede comprender una secuencia codificante adecuada operativamente unida a un promotor T7. El ARN transcrito *in vitro* se puede, en formas de realización, procesar (por ejemplo, usando RNasa III de *E. coli*) *in vitro* hasta un tamaño que conduzca a iARN. Los transcritos sentido y antisentido se combinan para formar un dúplex de ARN que se introduce en una célula diana de interés. Se pueden usar otros vectores, que expresan ARN horquillados cortos (ARNhc) que se pueden procesar a moléculas de tipo ARNip. Se han descrito varios métodos basados en vectores (véase, por ejemplo, Brummelkamp *et al.* [2002] *Science* **296**: 550). En la técnica se conocen varios métodos para introducir tales vectores en células, sea *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, terapia génica).

55 Según esto, en una forma de realización de la invención, un ácido nucleico, sea un ARN no codificante (ARNnc), así como un ARN que codifica un polipéptido de interés (por ejemplo, un ARNm), o un fragmento del mismo, se puede inhibir introduciendo en o generando en una célula un ARNip o molécula de tipo ARNip basada en un oligonucleótido de la invención, correspondiente a un ácido nucleico de interés, o un fragmento del mismo, o a un ácido nucleico homólogo al mismo (algunas veces colectivamente denominados en el presente documento un "ácido nucleico diana"). "Ácido nucleico diana" como se usa en el presente documento se refiere a un ácido nucleico que codifica un polipéptido (por ejemplo, un ARN codificante tal como un ARNm), así como a un ácido nucleico no codificante, tal como un ARN no codificante (ARNnc), es decir, un ARN que no se traduce a una proteína y que está implicado en varias funciones celulares incluyendo modificaciones postranscripcionales, regulación génica y propagación (virus). Los ejemplos de ARNnc incluyen ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosómico (ARNr) y ARN nuclear pequeño (ARNnp). Como tal, la degradación y un descenso en el nivel del ácido nucleico diana se puede efectuar, y en el caso de un ácido nucleico diana que codifica un polipéptido, se puede efectuar una disminución en la producción o nivel del polipéptido.

65

“Molécula de tipo ARNip” se refiere a una molécula de ácido nucleico similar a un ARNip (por ejemplo, en tamaño y estructura) y capaz de provocar actividad ARNip, es decir, para efectuar la inhibición mediada por iARN de la producción del polipéptido. En varias formas de realización tal método puede implicar la administración directa del ARNip o la molécula de tipo ARNip en una célula. En una forma de realización, el ARNip o molécula de tipo ARNip es menor de aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. En una forma de realización adicional, el ARNip o molécula de tipo ARNip tiene aproximadamente 19-23 nucleótidos de longitud. En una forma de realización, el ARNip o molécula de tipo ARNip comprende una parte de dúplex de 19-21 pb, cada hebra tiene una extensión 3' de 2 nucleótidos. En otras formas de realización, una o ambas hebras pueden tener extremos romos. En formas de realización, el ARNip o molécula de tipo ARNip es sustancialmente idéntica a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés, o un fragmento o variante (o un fragmento de una variante) del mismo. Tal variante es capaz de codificar una proteína que tiene actividad similar al polipéptido de interés.

Según esto, la presente invención proporciona además un ARNip bicatenario o molécula de tipo ARNip (o ARNip modificado) que comprende un dúplex de oligonucleótidos de la invención.

Se debe entender que, en el contexto de la presente invención, cualquiera de los dúplex de oligonucleótidos o ARNip/moléculas de tipo ARNip divulgadas en el presente documento, o cualquier molécula de ARN bicatenario larga (típicamente de 25-500 nucleótidos de longitud) que se procesan por complejos celulares endógenos (tal como Dicer o un homólogo del mismo – véase anteriormente) para formar las moléculas de ARNip divulgadas en el presente documento, o moléculas que comprenden los dúplex de oligonucleótidos o moléculas de ARNip divulgadas en el presente documento, están dentro del ámbito de la presente invención. Por ejemplo, se prevé que un oligonucleótido largo (por ejemplo, de aproximadamente 80 a 500 nucleótidos de longitud) que comprende una o más estructuras de tallo y bucle, donde las regiones de tallo comprenden los oligonucleótidos de la invención, se puedan administrar en un soporte, preferiblemente un soporte farmacéuticamente aceptable, y se puedan procesar intracelularmente por complejos celulares endógenos para producir uno o más oligonucleótidos bicatenarios más pequeños (ARNip/moléculas de tipo ARNip) de la presente invención. Este oligonucleótido típicamente se denomina construcción de ARNhc en tándem.

En una forma de realización, el ARNip anteriormente mencionado tiene de 25 a 30 nucleótidos, que puede ser sustrato para la endonucleasa Dicer (Kim D.-M. *et al. Nature Biotechnology*, vol. **23**, pp. 222-226 (2005)).

La presente invención también proporciona una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende un oligonucleótido, dúplex de oligonucleótidos o molécula de tipo ARNip de la invención, y un excipiente o soporte, tal como un soporte o excipiente biológica o farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, tales composiciones incluyen un oligonucleótido, dúplex de oligonucleótidos o molécula de tipo ARNip de la invención en una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz suficiente para tratar una afección/enfermedad asociada con la expresión (por ejemplo, sobreexpresión) de un ácido nucleico diana, y/o de un polipéptido codificado por un ácido nucleico diana. La composición terapéutica puede ser soluble en una solución acuosa a un pH fisiológicamente aceptable.

Como se usa en el presente documento “soporte farmacéuticamente aceptable” o “excipiente” incluye cualquier solvente, medio de dispersión, recubrimiento, agente antibacteriano y antifúngico, agente isotónico y retrasador de absorción, y similares, que son fisiológicamente compatibles. En una forma de realización, el soporte es adecuado para administración parenteral. Alternativamente, el soporte puede ser adecuado para administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, tópica, sublingual u oral, o para administración por inhalación. Los soportes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en tanto que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. El soporte puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tal como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Se puede producir la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina. Además, se puede administrar un oligonucleótido de la invención en una formulación de liberación en el tiempo, por ejemplo, en una composición que incluya un polímero de liberación lenta. Se pueden preparar los compuestos activos con soportes que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tal como acetato de

etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y copolímeros poliláctico poliglicólico (PLG). Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o los conocen en general los expertos en la materia.

5 Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo (por ejemplo, un oligonucleótido, dúplex de oligonucleótido, ARNip o molécula de tipo ARNip de la invención) en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. En general, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización que da un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada por esterilización del mismo. Según un aspecto alternativo de la divulgación, un oligonucleótido de la invención se puede formular con uno o más compuestos adicionales que aumentan su solubilidad.

15 Los métodos adecuados para la administración de ARNip para efectuar iARN según formas de realización incluyen cualquier método por el que se puede introducir un ARNip en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, como se describe en el presente documento o como conocería un experto en la materia. Tales métodos incluyen, pero no están limitados a, administración directa de ARNip tal como por inyección incluyendo microinyección, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, usar DEAE-dextrano seguido por polietilenglicol, carga sónica directa, transfección mediada por liposomas, bombardeo con microproyectiles, agitación con fibras de carburo de silicio, transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por PEG, desecación/absorción mediada por inhibición, y similares. Mediante el uso de técnicas tales como estas, un orgánulo, célula, tejido u organismo se puede transformar estable o transitoriamente. El oligonucleótido, molécula bicatenaria/dúplex, molécula de ARNip o composición de la invención se puede administrar en formulaciones de liposomas o lipofectina y similares y se preparan por métodos que conocen bien los expertos en la materia. Tales métodos se describen, por ejemplo, en las patentes en EE UU No. 5.593.972, 5.589.466 y 5.580.859.

30 Se han desarrollado sistemas de administración dirigidos específicamente a la administración aumentada y mejorada 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; Sorensen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 2003, **327**: 761-766; Lewis *et al.*, *Nat. Gen.* 2002, **32**: 107-108 y Simeoni *et al.*, *Nucleic Acids Research* 2003, **31**(11): 2717-2724).

35 Según otro aspecto de la divulgación, composiciones terapéuticas de la invención, que comprenden un dúplex de oligonucleótidos, ARNip, o molécula de tipo ARNip de la invención, se pueden proporcionar en un kit o paquete comercial. El kit puede comprender además instrucciones para el uso del dúplex de oligonucleótidos, ARNip, o molécula de tipo ARNip para la inhibición de la expresión de un gen diana, y/o prevención y/o tratamiento de una enfermedad/afección asociada con la expresión (por ejemplo, sobreexpresión) de un ácido nucleico o gen diana. El kit puede comprender además un ARNip control positivo validado que se dirige a un gen de mantenimiento y/o un ARNip control negativo validado que no tiene diana. El kit puede comprender además uno o más reactivos, tal como reactivos para introducir el dúplex de oligonucleótidos, ARNip, o molécula de tipo ARNip de la invención en una célula (por ejemplo, reactivos de transfección/transformación) y/o reactivos para evaluar reducción de gen diana pretendido tal como anticuerpos para seguir la reducción a nivel de proteína por inmunofluorescencia o análisis de inmunotransferencia, reactivos para evaluar la actividad enzimática o presencia de una proteína indicadora, o reactivos para evaluar la viabilidad celular. Pueden estar incluidos cebadores de RT-PCR y sondas para la detección de ARNm diana o indicador. El kit puede comprender además un envase (por ejemplo, vial, tubo de ensayo, frasco, botella, jeringa u otro medio de embalaje) en el que se puede colocar/alicuotar el dúplex de oligonucleótidos, ARNip, o molécula de tipo ARNip, así como dispositivos para administrar el dúplex de oligonucleótidos, ARNip, o molécula de tipo ARNip a un sujeto (por ejemplo, jeringa).

50 La invención proporciona además un método de inhibir la expresión de un gen/ácido nucleico diana, o de degradar o disminuir el nivel de un gen/ácido nucleico diana, en un sistema biológico (por ejemplo, una célula, un tejido, un órgano, un sujeto), por ejemplo, para inhibir la producción de un polipéptido codificado por el gen/ácido nucleico diana, que comprende introducir en el sistema el dúplex de oligonucleótidos, ARNip, o molécula de tipo ARNip anteriormente mencionado.

60 Según otro aspecto de la divulgación, se proporciona un método de inhibir la producción del producto de un gen ("silenciamiento génico"; por ejemplo, de un gen perjudicial) en un paciente en necesidad de ello. "Silenciamiento génico" como se usa en el presente documento se refiere a una inhibición o reducción de la expresión de la proteína codificada por una secuencia de ácido nucleico o gen particular (por ejemplo, un gen perjudicial). El método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de oligonucleótido, una molécula bicatenaria/dúplex, una molécula de ARNip p una composición de la invención. En formas de realización, el gen o ácido nucleico diana es un gen vírico, bacteriano o de mamífero (por ejemplo, humano).

65 La invención proporciona además un método de tratar una afección asociada con la expresión de un gen/ácido nucleico en un sujeto, por ejemplo, asociada con la producción de un polipéptido codificado por el gen/ácido nucleico

diana, el método comprende administrar el dúplex de oligonucleótidos, ARNip o molécula de tipo ARNip al sujeto (o a una célula, tejido, órgano del sujeto), en donde el ARNip o molécula de tipo ARNip se dirige a (o es específica para) el gen/ácido nucleico.

5 La invención proporciona además el uso del ARNip o molécula de tipo ARNip para la preparación de un medicamento.

10 La invención proporciona además el uso del ARNip o molécula de tipo ARNip anteriormente mencionado para un método seleccionado de: (a) silenciamiento génico; (b) inhibir la expresión génica/producción de polipéptido en un sistema biológico; (c) inhibir la expresión génica/producción de polipéptido en un sujeto; (d) degradar o disminuir el nivel de un gen/ácido nucleico diana en un sistema biológico o un sujeto; (d) tratar una enfermedad/afección asociada con la producción de un polipéptido codificado por un gen/ácido nucleico en un sujeto; y (e) preparación de un medicamento, por ejemplo, un medicamento para tratar una enfermedad o afección asociada con la expresión (por ejemplo, sobreexpresión) de un ácido nucleico/gen en un sujeto.

15 En varias formas de realización, un par de oligonucleótidos, dúplex, ARNip y/o molécula de tipo ARNip de la invención se puede usar profiláctica y/o terapéuticamente en formulaciones o medicamentos para prevenir o tratar una enfermedad/afección asociada con la expresión de un ácido nucleico o gen diana. La invención proporciona métodos correspondientes de tratamiento médico, en los que una dosis terapéutica de un oligonucleótido de la invención se administra en una formulación farmacológicamente aceptable, por ejemplo, a un paciente o sujeto en necesidad de ello.

20 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios para alcanzar el resultado terapéutico deseado, tal como una reducción o inversión en la evolución de una enfermedad asociada con la producción de un polipéptido codificado por un ácido nucleico o gen diana. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un par de oligonucleótidos, dúplex, ARNip y/o molécula de tipo ARNip de la invención puede variar según factores tal como el estado de enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad del compuesto de provocar una respuesta deseada en el individuo. Se pueden ajustar las pautas de dosis para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o nocivo del compuesto está sobrepasado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado profiláctico deseado, tal como prevenir o inhibir la velocidad de inicio o evolución de una enfermedad asociada con la producción de un polipéptido codificado por un ácido nucleico o gen diana. Se puede determinar una cantidad profilácticamente eficaz como se ha descrito anteriormente para la cantidad terapéuticamente eficaz. Para cualquier sujeto particular, se pueden ajustar pautas de dosis específicas a lo largo del tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones.

25 La invención proporciona además un uso de un oligonucleótido, par o dúplex de la invención o la composición anteriormente mencionada para degradar o disminuir el nivel de un ácido nucleico diana, o de disminuir la producción o el nivel de un polipéptido codificado por un ácido nucleico o gen diana o para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad/afección asociada con la producción de un polipéptido codificado por un ácido nucleico o gen diana. La invención proporciona además un uso de un oligonucleótido de la invención para la preparación de un medicamento. En una forma de realización, el medicamento es para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o afección asociada con la expresión (por ejemplo, sobreexpresión) de ácido nucleico o gen diana.

30 El gen/ácido nucleico diana puede ser un gen/ácido nucleico derivado de una célula, un gen endógeno, un transgén, o genes exógenos tal como genes de un patógeno, por ejemplo, un virus, que está presente en la célula después de la infección de la misma. La célula que tiene el gen diana puede ser de la línea germinal o somática, totipotente o pluripotente, en división o que no se divide, de parénquima o epitelio, inmortalizada o transformada, o similar. La célula puede ser un gameto o un embrión; si es un embrión, puede ser un embrión de célula única o una célula o células constituyentes de un embrión multicelular. El término "embrión", por tanto, abarca tejido fetal. La célula que tiene el gen diana puede ser una célula no diferenciada, tal como una célula madre, o una célula diferenciada, tal como de una célula de un órgano o tejido, incluyendo tejido fetal, o cualquier otra célula presente en un organismo. Los tipos celulares que están diferenciados incluyen adipocitos, fibroblastos, miocitos, cardiomiocitos, endotelio, neuronas, glía, células sanguíneas, megacariocitos, linfocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células cebadas, leucocitos, granulocitos, queratinocitos, condrocitos, osteoblastos, osteoclastos, hepatocitos, y células de las glándulas endocrinas o exocrinas.

35 El par de oligonucleótidos, dúplex, ARNip o molécula de tipo ARNip de la invención se puede asociar con, por ejemplo, un ligando de direccionamiento celular. Como se usa en el presente documento, un "ligando de direccionamiento celular" es una molécula que se dirige a una célula que tiene especificidad para sitios diana tal como receptores de superficie celular. Esto permite, por ejemplo, una administración más específica del par de oligonucleótidos, dúplex, ARNip o molécula de tipo ARNip a una célula/tipo celular, tejido u órgano particular.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para aumentar/mejorar la eficacia, potencia y/o estabilidad (por ejemplo, estabilidad *in vivo*) de un dúplex de oligonucleótidos, que comprende incorporar en dicho dúplex (a) uno o más arabinonucleótidos (AAN) 2'-sustituidos; y (b) (i) uno o más ribonucleótidos (ARN) 2'-sustituidos, (ii) uno o más nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (ANB), o (iii) una combinación de (i) y (ii).

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para reducir los efectos inespecíficos de un dúplex de oligonucleótidos, que comprende incorporar en dicho dúplex (a) uno o más arabinonucleótidos (AAN) 2'-sustituidos; y (b) (i) uno o más ribonucleótidos (ARN) 2'-sustituidos, (ii) uno o más nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (ANB), o (iii) una combinación de (i) y (ii).

La invención proporciona además un método de sintetizar un oligonucleótido de la invención, el método comprende: (a) desbloqueo 5'; (b) acoplamiento; (c) protección; y (d) oxidación; en donde (a), (b), (c) y (d) se repiten en condiciones adecuadas para la síntesis del oligonucleótido, en donde la síntesis se lleva a cabo en presencia de un monómero de nucleótido adecuado descrito en el presente documento (por ejemplo, ARN, ADN, 2'F-AAN, 2'F-ARN, ANB).

La invención proporciona además un método para preparar un dúplex de oligonucleótidos de la invención que comprende combinar una primera hebra (por ejemplo, sentido) que comprende un oligonucleótido de la invención y una segunda hebra (por ejemplo, antisentido) sustancialmente complementaria a la primera hebra en condiciones que permiten la formación de un dúplex mediante emparejamiento de bases entre la primera y segunda hebras.

En formas de realización, la síntesis se lleva a cabo en una fase sólida, tal como en un soporte sólido seleccionado del grupo que consiste en vidrio de poro controlado, poliestireno, polietilenglicol, polivinilo, gel de sílice, chips basados en silicio, papel de celulosa, poliamida/diatomita y poliacriolmofolida. En formas de realización adicionales, los monómeros se pueden usar para síntesis en fase solución o síntesis basada en líquido iónico de oligonucleótidos.

“Desbloqueo 5'” como se usa en el presente documento se refiere a una etapa en la síntesis de oligonucleótidos en donde un grupo protector se elimina de un nucleósido previamente añadido (o un grupo químico unido a un soporte sólido), para producir un hidroxilo reactivo que es capaz de reaccionar con una molécula de nucleósido, tal como un nucleósido fosforamidita o H-fosfonato.

“Grupo protector” como se usa en el presente documento se refiere a una fracción que se une temporalmente a un grupo químico reactivo para prevenir la síntesis de productos indeseados durante una o más fases de síntesis. Tal grupo protector se puede eliminar después para permitir que la etapa de la síntesis deseada prosiga, o para generar el producto sintético deseado. Los ejemplos de grupos protectores son grupos tritilo (por ejemplo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo), sililo, levulinilo y acetilo.

“Acoplamiento” como se usa en el presente documento se refiere a una etapa en la síntesis de oligonucleótidos en donde un nucleósido se une covalentemente al residuo de nucleósido terminal del oligonucleótido (o al soporte sólido a través, por ejemplo, de un enlazador adecuado), por ejemplo, a través de un ataque nucleofílico de un nucleósido fosforamidita, H-fosfonato, fosfortriéster, pirofosfato o fosfato activado en solución por un grupo 5'-hidroxilo terminal de un nucleótido u oligonucleótido unido a un soporte. Tal activación se puede efectuar por un reactivo activante tal como tetrazol, 5-etiltiotetrazol, 4,5-dicianoimidazol (DCI), y/o cloruro de pivaloilo.

“Protección” como se usa en el presente documento se refiere a una etapa en la síntesis de oligonucleótidos en donde una fracción química se une covalentemente a cualquier grupo hidroxilo libre o sin reaccionar en el ácido nucleico u oligonucleótido unido al soporte (o en un enlazador químico unido al soporte). Tal protección se usa para prevenir la formación de, por ejemplo, secuencias de longitud más corta que la secuencia deseada (por ejemplo, que contienen deleciones). Un ejemplo de un reactivo que se puede usar para tal protección es anhídrido acético. Además, la etapa de protección se puede realizar antes o después de la oxidación (véase a continuación) del enlace fosfito.

“Oxidación” como se usa en el presente documento se refiere a una etapa en la síntesis de oligonucleótidos en donde el enlace fosfito triéster o H-fosfonato diéster recién sintetizado se convierte en un enlace fosfato triéster o diéster pentavalente. En el caso donde se desea un enlace internucleotídico fosforotioato, “oxidación” también se refiere a la adición de un átomo de azufre para generar un enlace fosforotioato.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de varios aspectos de la invención, y no limitan los aspectos amplios de la invención como se divulga en el presente documento.

### **Modo(s) para llevar a cabo la invención**

La presente invención se ilustra en más detalle mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

#### **Ejemplo 1: Materiales y métodos**

*Síntesis de oligonucleótidos.* Se usaron condiciones estándar para síntesis de oligonucleótidos en fase sólida para la síntesis de todos los oligonucleótidos, a una escala de 0,8 a 1,0  $\mu\text{mol}$ . Se usaron 4,5-dicianimidazol (0,50 M en acetonitrilo) o 5-etiltiotetrazol (0,25 M en acetonitrilo) como activadores, y se usó yodo 0,10 M en piridina:agua:TFH 1:2:10 como oxidante (el tiempo de espera durante la etapa de oxidación fue 24 segundos). Se prepararon fosforoamiditas como soluciones 0,15 M (amiditas de ARN) o soluciones 0,08-0,10 M (ADN, 2'-fluoro amiditas). Los tiempos de acoplamiento se extendieron a 10-30 minutos para nucleótidos modificados. Los oligonucleótidos se trataron con hidróxido de amonio:etanol 3:1 durante 16 h a 55°C para cortarlos del soporte sólido y desproteger los fosfatos y bases. Las secuencias que contenían ribonucleótidos se concentraron y desililaron con  $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$  (100  $\mu\text{l}$ ) durante 48 h a temperatura ambiente. La purificación de secuencia se logró por HPLC de intercambio aniónico usando solución de  $\text{LiClO}_4$  0-0,2 M como eluyente, o por PAGE desnaturalizante preparativa. El desalado se efectuó en columnas Sephadex G-25 o NAP-25. La pureza de secuencia se verificó usando PAGE desnaturalizante.

La fosforilación en 5' de los oligonucleótidos se alcanzó en general en el soporte sólido CPG, tratando el oligonucleótido recién sintetizado con bis(2-cianoetil)-diisopropilaminofosfaoramidita y etiltiotetrazol, seguido por condiciones de desprotección normales. Se usó ESI-MS para conformar el éxito de la reacción de fosforilación.

*Desnaturalización térmica y estudios de CD.* Se combinaron cantidades equimolares de secuencias complementarias, se secaron y rediluyeron en tampón de pH 7,2 que contenía KCl 140 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM y  $\text{NaHPO}_4$  5 mM (1 ml). Después de calentar a 90°C, las muestras se enfriaron lentamente a temperatura ambiente y se refrigeraron durante la noche. Después se transfirieron a cubetas frías en un espectrofotómetro de UV Cary™ 300. El cambio en absorbancia a 260 nm se siguió después calentando desde 15°C a 90°C. Se determinaron las temperaturas de fusión como el máximo de los primeros derivados o usando el método de la línea basal, implementado en el software de Varian™.

Se obtuvieron espectros de CD en un espectropolarímetro Jasco™ J-720 a 20°C usando muestras hibridadas en el mismo tampón y en las mismas condiciones que para los estudios de desnaturalización térmica. Los espectros se corrigieron para línea basal con respecto a un blanco que contenía el tampón, pero sin dúplex. Se efectuaron alisado y ajuste para la concentración de dúplex usando el programa Spectra-Manager (Jasco).

*Ensayos de ARNip (inhibición de luciferasa).* Se hicieron crecer células HeLa X1/5 que expresan establemente luciferasa de luciérnaga como se ha descrito previamente (Wu, H. *et al. J. Biol. Chem.* 1999, **274**: 28270-28278). El día antes de la transfección, se sembraron  $0,5 \times 10^5$  células en cada pocillo de una placa de 24 pocillos. Al día siguiente, las células se incubaron con cantidades crecientes de los ARNip premezclados con el reactivo lipofectamine-plus™ (Invitrogen) usando 1  $\mu\text{l}$  de lipofectamine y 4  $\mu\text{l}$  del reactivo plus por 20 pmol de ARNip (para la mayor concentración ensayada). Para las titulaciones de ARNip, cada ARNip se diluyó en tampón de dilución (HEPES-KOH 30 mM, pH 7,4, KOAc 100 mM,  $\text{MgOAc}_2$  2 mM) y la cantidad del reactivo lipofectamine-plus usado relativo a los ARNip permaneció constante. 24 horas después de la transfección, las células se lisaron en tampón de lisis hipotónico ( $\text{K}_3\text{PO}_4$  15 mM, EDTA 1 mM, Triton al 1%, NaF 2 mM, BSA 1 mg/ml, DTT 1 mM, NaCl 100 mM, aprotinina 4  $\mu\text{g/ml}$ , leupeptina 2  $\mu\text{g/ml}$  y pepstatina 2  $\mu\text{g/ml}$ ) y se determinaron la unidades de luz de luciérnaga usando un lector de bioluminiscencia de placa de 96 pocillos Fluostar Optima (BMG Labtech) usando sustrato de luciérnaga como se describe (Novac, O. *et al. J. Nucl. Acids Res.* 2004, **32**: 902-915). Las cuentas de luciferasa se normalizaron respecto a la concentración de proteína del lisado celular determinada por el ensayo de proteína DC (BioRad). Las barras de error representan la desviación estándar de al menos cuatro transfecciones. Cotransfectar los ARNip y el plásmido pCI-hRL-con que expresa el ARNm de la luciferasa de *Renilla* (Pillai, R.S. *et al. Science* 2005, **309**: 1573-1576) en la misma línea celular no mostró diferencia en la expresión de este indicador, lo que demuestra la especificidad de los efectos de iARN.

*Evaluación de la producción de IFN usando el ensayo de detección de IFN HEK-Blue™.* 48 horas después de la transfección de ARNip, las células se dejaron sin tratar o se trataron con 1  $\mu\text{g/ml}$  de poli(I:C) durante 24 horas. La cantidad de IFN en el sobrenadante se midió según las instrucciones del fabricante (InvivoGen). Brevemente, los sobrenadantes se mezclaron con células HEK-Blue™ que llevan un gen indicador que expresa una fosfatasa alcalina secretada bajo el control de promotor del elemento 9 de respuesta estimulado por interferón (ISRE9). En respuesta a la exposición a IFN, las células HEK-Blue™ liberan fosfatasa alcalina soluble que se cuantifica mezclando el sobrenadante con reactivo Quanti Blue™ (InvivoGen) y midiendo la absorbancia a 650 nm.

## **Ejemplo 2: Dúplex de ARNip que contienen combinaciones de 2'F-AAN y 2'F-ARN**

Se hizo una serie de dúplex que contenían hebras completamente modificadas con 2'F-AAN y 2'F-ARN (Tabla I). Estos dúplex se dirigen a las posiciones 1818-1836 del gen de la luciferasa de luciérnaga (número de acceso de RefSeq M15077). También se diseñaron una serie de hebras quiméricas que contienen ambos 2'-fluoro epímeros. Una quimera consistía en 2'F-ARN pirimidinas y 2'F-AAN purinas. Otro para de hebras era una estructura de "altímero 1-1", con residuos de 2'F-AAN y 2'F-ARN alternantes. Para todas estas hebras quiméricas 2'F-AAN/2'F-ARN, la extensión 3' siempre se hizo de 2'F-AAN.

**Tabla I: Secuencias de los ARNip que se dirigen a las posiciones 1818-1836 de la luciferasa de luciérnaga que contienen mezclas de 2'F-AAN y 2'F-ARN**

Nombre	Descripción	Secuencia	T <sub>m</sub>	SEQ ID NO:
jg-1	ARN	5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'	61,8	19
	ARN	5'-UUAUUUAAAGACUUCAAGCgg-3'		20
jg-2	pur/pir	5'- <u>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT</u> -3'	65,6	21
	pur/pir	5'- <u>TTAATTAAGACTTCAAGCGG</u> -3'		22
jg-3	altímero 1-1	5'- <u>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT</u> -3'	36,8	23
	altímero 1-1	5'- <u>TTAATTAAGACTTCAAGCGG</u> -3'		24
jg-4	2'F-ARN	5'- <u>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT</u> -3'	>90	25
		5'-p <u>TTAATTAAGACTTCAAGCGG</u> -3'		26
jg-5	2'F-AAN	5'- <u>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT</u> -3'	72,8	27
		5'-p <u>TTAATTAAGACTTCAAGCGG</u> -3'		28
jg-6	pur/pir	5'- <u>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT</u> -3'	62,5	21
	ARN	5'-UUAUUUAAAGACUUCAAGCgg-3'		20
jg-7	ARN	5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'	56,7	19
	pur/pir	5'- <u>TTAATTAAGACTTCAAGCGG</u> -3'		22
jg-8	altímero 1-1	5'- <u>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT</u> -3'	48,2	23
	ARN	5'-UUAUUUAAAGACUUCAAGCgg-3'		20
jg-9	ARN	5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'	45,8	19
	altímero 1-1	5'- <u>TTAATTAAGACTTCAAGCGG</u> -3'		24
jg-10	2'F-ARN	5'- <u>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT</u> -3'	76,5	25
	ARN	5'-UUAUUUAAAGACUUCAAGCgg-3'		20
jg-11	ARN	5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'	76,2	19
	2'F-ARN	5'-p <u>TTAATTAAGACTTCAAGCGG</u> -3'		26
jg-12	2'F-AAN	5'- <u>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT</u> -3'	64,7	27
	ARN	5'-UUAUUUAAAGACUUCAAGCgg-3'		20
jg-13	ARN	5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'	62,8	19
	2'F-AAN	5'-p <u>TTAATTAAGACTTCAAGCGG</u> -3'		28
jg-14	2'F-AAN	5'- <u>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT</u> -3'	80,1	27
	2'F-ARN	5'-p <u>TTAATTAAGACTTCAAGCGG</u> -3'		26
jg-15	2'F-ARN	5'- <u>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT</u> -3'	77,5	25
	2'F-AAN	5'-p <u>TTAATTAAGACTTCAAGCGG</u> -3'		28

Mayúscula = ARN

5 Minúscula = adn

Mayúscula negrita subrayada = **2'F-AAN (FAAN)**

Mayúscula negrita cursiva = **2'F-ARN**

p = 5'-fosfato

10 La actividad iARN de todos los dúplex se probó en las mismas condiciones descritas anteriormente. Los resultados se muestran en la figura 1.

15 Cuatro de los dúplex (**jg-6**, **jg-8**, **jg-10** y **jg-12**) contenían una hebra sentido modificada emparejada con una hebra antisentido de ARN. El mejor de estos cuatro dúplex es **jg-6**, que contiene una hebra sentido química purina/primidina. El segundo mejor dúplex es el dúplex **jg-8**, que contiene la configuración altímero 1-1 en la hebra sentido. Por tanto, combinar los epímeros 2'F en la hebra sentido da mejores resultados que usar cualquier química sola, y sorprendentemente, con mejores resultados relativos al ARN natural (**jg-1**).

20 La comparación de la actividad iARN de los dúplex **jg-6-jg-13** permite evaluar la idoneidad de cada tipo de arquitectura de hebra modificada (2'F-AAN, 2'F-ARN, purina/pirimidina y altímero 1-1) en las hebras sentido o antisentido. Se observan preferencias sentido/antisentido para los cuatro tipos de hebras modificadas. Los dúplex **jg-6**, **jg-8** y **jg-12** son más activos que **jg-7**, **jg-9** y **jg-13**, respectivamente, revelando que ambas construcciones químicas y la hebra 2'F-AAN son mejor toleradas en la hebra sentido que en la hebra antisentido. La diferencia es particularmente sorprendente entre los dúplex **jg-8** y **jg-9** que contienen una hebra de altímero 1-1; **jg-8** (altímero 1-1 en la hebra sentido) fue uno de los dúplex más activos probados, mientras que **jg-9** (altímero 1-1 en la hebra antisentido) era inactivo.

30 La figura 1 muestra que **jg-11** es más activo que **jg-10**, sugiriendo de esta manera que 2'F-AAN es mejor tolerado en la hebra antisentido que en la sentido. Se cree que esta es la primera vez que se ha observado que una hebra completamente modificada o muy modificada es mejor tolerada en la hebra antisentido que en la sentido.

Una hebra sentido de 2'F-AAN y una hebra antisentido de 2'F-ARN formaron un dúplex que se encontró que era activo también. En efecto, la sinergia entre estas dos modificaciones se observa en el caso del dúplex **jg-14**, que es

más activo que cualquiera de los dúplex **kg-11** o **kg-12** de los que deriva. Por otra parte, invertir la combinación sentido/antisentido dio **kg-15**, uno de los ARNip menos potentes probados en este estudio.

Las estabildades térmicas de los dúplex se probaron calentando los dúplex hibridados, en tampón fisiológico, y midiendo el cambio en la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ). Las afinidades de unión de los dúplex modificados varían mucho. No había correlación entre actividad iARN y afinidad de unión. Por ejemplo, dos de los dúplex más activos probados fueron **kg-4** y **kg-8**, con valores de  $T_m$  de > 90°C y 48,2°C, respectivamente. El dúplex más potente, el heterodúplex completamente fluorado **kg-14**, tenía una  $T_m$  de aproximadamente 20°C mayor que la del dúplex de ARN nativo (80,1°C frente a 61,8°C).

Los espectros de CD de los dúplex modificados se examinaron para explorar posibles conexiones entre estructura helicoidal y actividad ARNip. Los resultados se presentan en la figura 2. Los cambios en los efectos de Cotton a 210-220 nm son notables. Empezando con los dúplex **kg-2-kg-5**, que tienen la misma química en ambas hebras, es notable que para el dúplex de 2'F-ARN **kg-4**, esta banda es de máxima intensidad a 227 nm, que está ligeramente desplazada al rojo respecto al dúplex control **kg-1** (224 nm). Por otra parte, para los tres dúplex que contienen 2'F-AAN, incluyendo dos arquitecturas quiméricas **kg-2** y **kg-3** y el dúplex todo 2'F-AAN **kg-5**, esta banda está desplazada al azul y alcanza intensidad máxima a aproximadamente 220 nm. Además, los dúplex **kg-1** y **kg-4** muestran una banda más fuertemente negativa a 210 nm. Esto es consistente con el grado de hecilidad de forma A de los dúplex (Ratmeyer, L. *et al. Biochemistry* 1994, **33**: 5298-5304). El dúplex de 2'F-ARN **kg-4** también la mayor intensidad para su banda de 270 nm, seguido por el dúplex de ARN nativo **kg-1**, después las hebras que contienen 2'F-AAN. El dúplex de 2'F-AAN al completo **kg-5** tiene bastante forma B de carácter, como evidencia el hecho de que su banda a 270 nm es de la menor intensidad y contiene un hombro por encima de 280 nm, y su banda negativa a 245 nm es significativamente más negativa que los otros dúplex (Ratmeyer, L. *et al.* 1994, anteriormente).

Para los dúplex **kg-6-kg-13**, una hebra sentido modificada correspondía a mayor elipticidad molar a 220 nm que la observada para los dúplex nativos y antisentido modificados. Por tanto, la intensidad de la banda de 220 nm para varios pares sentido antisentido **kg-6/kg-7**, **kg-8/kg-9**, **kg-10/kg-11** y **kg12/kg-13** era siempre mayor para el primer miembro de cada par. Puesto que la modificación sentido producía siempre mayor potencia para 3 de las 4 arquitecturas de hebra modificadas, esta mayor intensidad también correspondía con mayor potencia, con la excepción de los dúplex **kg-10** y **kg-11**, para los que la hebra modificada con 2'F-ARN era mejor aceptada en la antisentido que la sentido. También es interesante que modificar la hebra sentido, pero no la hebra antisentido, con 2'F-ARN, producía un aumento notable en la intensidad de los efectos de Cotton a 270 nm.

Para los dúplex **kg-14** y **kg-15**, en los que ambas hebras estaban modificadas, el dúplex más potente **kg-14** mostraba mayor intensidad para su banda a 220 nm, y de hecho, en el intervalo entero de 205-250 nm. No está claro por qué se observa tan gran diferencia entre estos dos dúplex a longitudes de onda menores. El dúplex **kg-15** debe tener más carácter de forma A ya que tiene picos más fuertemente negativos a 210 nm, pero la mayor  $T_m$  de **kg-14** implica que tiene más carácter de forma A que **kg-15** (Ratmeyer, L. *et al.* 1994, anteriormente).

Para investigar si la potencia y sinergia obtenidas para combinaciones 2'F-AAN-2'F-ARN era aplicable a otras secuencias de ARNip, otros dúplex se dirigieron contra el mismo gen y línea celular, esta vez dirigiéndose a las posiciones 515-533 (Hoshika, S. *et al. FEBS Lett.* 2005, **579**: 3115-3118; Elbashir, S.M. *et al. Nature* 2001, **411**: 494-498). Se diseñó una serie de dúplex 2'fluorados por completo o fuertemente, con los siguientes principios en mente:

- La preferencia de 2'F-AAN y quimeras 2'F-AAN-2'F-ARN para la hebra sentido y de 2'F-ARN para la hebra antisentido;
- La baja afinidad de unión de altímeros 1-1 de 2'F-AAN y 2'F-ARN (los dúplex **kg-8** y **kg-9** tenían valores de  $T_m$  13-16°C menores que la secuencia control, véase la tabla I;
- la actividad de una hebra sentido 2'F-AAN completamente modificada se comparó con la una secuencia sentido 2'F-AAN "de tipo fr", que incluye cinco insertos de ARN cerca de su extremo 3', cuando se empareja con una hebra antisentido de 2'F-ARN.

Los dúplex resultantes se presentan en la tabla II. Cada una de dos hebras antisentido (ARN o 2'F-ARN) se emparejó con cada una de seis hebras sentido modificadas (2'F-AAN o una quimera 2'F-AAN-2'F-ARN). la potencia de estas hebras para inducir iARN se evaluó y los resultados se presentan en la figura 3.

**Tabla II: Secuencias de ARNip que se dirigen a las posiciones 515-533 de luciferasa de luciérnaga con combinaciones de 2'F-AAN y 2'F-ARN**

Nombre	Descripción	Secuencia	SEQ ID NO:
kl-ctl	ARN	5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAtt-3'	29
	ARN	5'-UCGAAGUAUUCGCGUACGtt-3'	30
kl-1	2'F-ARN	5'- <b>CGUACGCGGAAUACUUCGAUU</b> -3'	31
	ARN	5'-UCGAAGUAUUCGCGUACGtt-3'	30
kl-2	2'F-AAN	5'- <b>CGTACGCGGAATACTTCGATT</b> -3'	32
	ARN	5'-UCGAAGUAUUCGCGUACGtt-3'	30

<b>kl-3</b>	tipo "fr" ARN	5'- <b>CGTACGCGGAATACUUCGATT</b> -3' 5'-UCGAAGUAUUCCGCGUACGtt-3'	33 30
<b>kl-4</b>	altímero 3-3 ARN	5'- <b>CGTACGCGGAAUACTUCGATT</b> -3' 5'-UCGAAGUAUUCCGCGUACGtt-3'	34 30
<b>kl-5</b>	alt 3-3/1-1 ARN	5'- <b>CGTACGCGGAAUACTUCGATT</b> -3' 5'-UCGAAGUAUUCCGCGUACGtt-3'	35 30
<b>kl-6</b>	altímero 1-1 ARN	5'- <b>CGTACGCGGAAUACTUCGATT</b> -3' 5'-UCGAAGUAUUCCGCGUACGtt-3'	36 30
<b>kl-7</b>	2'F-ARN 2'F-ARN	5'- <b>CGUACGCGGAAUACUUCGAUU</b> -3' 5'-p <b>UCGAAGUAUUCCGCGUACGUU</b> -3'	31 37
<b>kl-8</b>	2'F-AAN 2'F-ARN	5'- <b>CGTACGCGGAATACTTCGATT</b> -3' 5'-p <b>UCGAAGUAUUCCGCGUACGUU</b> -3'	32 37
<b>kl-9</b>	tipo "fr" 2'F-ARN	5'- <b>CGTACGCGGAATACUUCGATT</b> -3' 5'-p <b>UCGAAGUAUUCCGCGUACGUU</b> -3'	33 37
<b>kl-10</b>	altímero 3-3 2'F-ARN	5'- <b>CGTACGCGGAAUACTUCGATT</b> -3' 5'-p <b>UCGAAGUAUUCCGCGUACGUU</b> -3'	34 37
<b>kl-11</b>	alt 3-3/1-1 2'F-ARN	5'- <b>CGTACGCGGAAUACTUCGATT</b> -3' 5'-p <b>UCGAAGUAUUCCGCGUACGUU</b> -3'	35 37
<b>kl-12</b>	altímero 1-1 2'F-ARN	5'- <b>CGTACGCGGAAUACTUCGATT</b> -3' 5'-p <b>UCGAAGUAUUCCGCGUACGUU</b> -3'	36 37

Mayúscula = ARN

Minúscula = adn

Mayúscula negrita subrayada = **2'F-AAN (FAAN)**

Mayúscula negrita cursiva = **2'F-ARN**

5 p = 5'-fosfato

Varios resultados están claros de este conjunto de dúplex. Como se muestra en la figura 3, casi todos los dúplex son más eficaces que el ARNip control. Cuatro dúplex modificados por completo (**kl-7**, **kl-9**, **kl-10**, **kl-11**) y cinco otros dúplex muy modificados (**kl-4**, **kl-5**, **kl-6**, **kl-8**, **kl-12**) tienen mayor potencia que el control para esta segunda secuencia de la luciferasa de luciérnaga.

Además, la sinergia entre 2'F-ARN y 2'F-AAN es de nuevo visible. Se puede pensar que estos dúplex como perteneciente a dos subseries, la primera con una hebra antisentido de ARN (**kl-1** a **kl-6**) y la segunda con una hebra antisentido de 2'F-ARN (**kl-7** a **kl-12**). Comparando los miembros correspondientes de cada serie (**kl-1** a **kl-7**, **kl-2** a **kl-8**, etc.), está claro que todas las hebras sentido modificadas muestran mejor potencia cuando se emparejan a una hebra antisentido de 2'F-ARN que a una hebra antisentido de ARN.

Tomando cada subserie por separado, y clasificando los dúplex en orden de potencia, se puede observar un patrón: las hebras sentido siguen el mismo orden, con cualquier hebra antisentido. Por tanto, la "peor" hebra sentido es todo 2'F-AAN (**kl-2** y **kl-8**), seguida por la hebra antisentido de "tipo fr" que contiene cinco insertos de ARN (**kl-3** y **kl-9**). Se debe indicar, sin embargo, que tanto **kl-8** como **kl-9** son, no obstante, más potentes que el control.

El uso de hebras sentido quiméricas 2'F-AAN-2'F-ARN produjo mejor potencia, de nuevo independientemente de la hebra antisentido usada. La mejor hebra sentido fue la hebra de altímero 3-3/1-1 (**kl-5** y **kl-11**), lo que sugiere que el diseño racional para controlar sesgos termodinámicos no mejora de hecho la potencia. El dúplex **kl-11** no fue superado ni en potencia ni en eficacia. No es posible siquiera estimar un valor de  $Cl_{50}$  para este dúplex, ya que, a 2 nM, la menor concentración usada para estas transfecciones, el silenciamiento está todavía a su máximo nivel.

Por último, es digno de mencionar que tanto los dúplex **kl-7** como **kl-11** parecen estar silenciando a su máxima eficacia, ya que la respuesta a la dosis es esencialmente plana. La hebra sentido quimérica de **kl-11**, por tanto, permite silenciamiento de mayor eficacia (nivel relativo de luciferasa de 0,12-0,15 en lugar de 0,21-0,24).

Como se describe en el presente documento, por ejemplo, 2'F-AAN y 2'F-ARN se pueden combinar de varias maneras en dúplex de ARNip. Por ejemplo, dos tipos de combinaciones de estas dos modificaciones producen potencia aumentada: combinar ambas químicas en la hebra sentido, y combinar una hebra antisentido 2'F-ARN con una hebra sentido 2'F-AAN o quimérica. Ejemplos de ambos de estos tipos de combinaciones sinérgicas producen potencia aumentada.

**Ejemplo 3: Disminución de 4E-BP1/2 usando dúplex de ARNip específicos que contienen combinaciones de 2'F-AAN y 2'F-ARN y efectos en la producción de IFN de tipo I**

Las secuencias de los ARNip usados en los estudios de inhibición de 4E-BP descritos en el presente documento se proporcionan en la tabla III.

**Tabla III: Secuencias de los ARNip usados en los estudios de inhibición de 4E-BP descritos en el presente documento**

Secuencia	ID de oligo	ID de dúplex de ARNip	SEQ ID NO:
5' AACUCACCUUGUGACCAAAAcA	4EBP-1 HS	Control sin modificar 4EBP-1 humano	1
5' UUUUGGUCACAGGUGAGUUcc	4EBP-1 HAS		2
5' AAGACUCCAAAGUAGAAGUaa	4EBP-2 HS	Control sin modificar 4EBP-2 humano y murino	3
5' ACUUCUACUUUGGAGUCUUca	4EBP-2 HAS		4
5' AACUCACCUUGUGGCCAAAca	4EBP-1 MS	Control sin modificar 4EBP-1 murino	5
5' UUUUGGCCACAGGUGAGUUcc	4EBP-1 MAS		6
5' <b>A</b> ACTCACCTGTGGCCAAA <b>A</b> CA	4EBP-1 MS_JG14	4EBP-1 murino_14	7
5' <b>p</b> UUUUGGCCACAGGUGAGU <b>U</b> CC	4EBP-1 MAS_JG14		8
5' <b>A</b> ACTCACCTGTGACCAAAA <b>A</b> CA	4EBP-1 HS_JG14	4EBP-1 humano_14	9
5' <b>p</b> UUUUGGUCACAGGUGAGU <b>U</b> CC	4EBP-1 HAS_JG14		10
5' <b>A</b> AGACTCCAAAGTAGAAGTAA	4EBP-2 MS_JG14	4EBP-2 ratón_14 o 4EBP-2 humano_14	11
5' <b>p</b> ACUUCUACUUUGGAGUCU <b>U</b> CA	4EBP-2 MAS_JG14		12
5' <b>A</b> ACUCACCTGUGGCCAAA <b>A</b> CA	4EBP-1 MS_611	4EBP-1 ratón_611	13
5' <b>p</b> UUUUGGCCACAGGUGAGU <b>U</b> CC	4EBP-1 MAS_611		14
5' <b>A</b> ACUCACCTGUGGCCAAA <b>A</b> CA	4EBP-1 HS_611	4EBP-1 humano_611	15
5' <b>p</b> UUUUGGUCACAGGUGAGU <b>U</b> CC	4EBP-1 HAS_611		16
5' <b>A</b> AGACTCCAAAGTAGAAGTAA	4EBP-2 MS_611	4EBP-2 ratón_611 o 4EBP-2 humano_611	17
5' <b>p</b> ACUUCUACUUUGGAGUCU <b>U</b> CA	4EBP-2 MAS_611		18

Mayúscula = ARN

5 Minúscula = adn

Mayúscula negrita subrayada = **2'F-AAN (FAAN)**

Mayúscula negrita cursiva = **2'F-ARN**

p = 5'-fosfato

10 Los resultados presentados en la figura 4A indican que los ARNip sin modificar que se dirigen a 4E-PB1 y 4E-BP2 humanas provocan silenciamiento génico potente (carriles más a la derecha en los dos geles). Asimismo, ninguno de los ARNip mezclados (sin diana) afectan los niveles de expresión de 4E-PB1 o 4E-BP2. Puesto que los controles modificados mezclados 1 y 2 se modifican químicamente con 2'F-AAN y 2'F-ARN, estos datos indican que las modificaciones químicas solas no son responsables de cambios en la expresión de 4E-BP1 o 2. Observando la

15 reducción de 4E-BP1 y 2 con la arquitectura de modificación **\_14** (hebra sentido 2'F-AAN por completo, hebra antisentido 2'F-ARN por completo), se muestra que los ARNip que comprenden esta modificación son capaces de silenciar tanto 4E-BP1 como 2, aunque no de forma tan potente como el control sin modificar después de 24 horas, especialmente en el caso de 4E-BP1. La arquitectura de modificación **\_611** (hebra sentido 2'F-AAN/2'F-ARN alternantes, hebra antisentido 2'F-ARN por completo) parece ser más potente que **\_14** en ambos casos,

20 posiblemente incluso superando la potencia del control sin modificar para 4E-BP2.

La capacidad de ARNip químicamente modificados para reproducir el fenotipo de falta doble de 4E-PB1/2 se determinó a continuación usando el sistema HEK-Blue™ según el protocolo del fabricante (InvivoGen). Los resultados de los experimentos realizados para seguir los niveles relativos de interferón 3 días tras la transfección de

25 ARNip y en presencia o ausencia de poli(I:C) se presentan en la figura 5. Cuando las células se tratan con ARNip mezclado modificado y poli(I:C), los niveles relativos de IFN son similares a los de células tratadas con secuencias mezclada sin modificar, mostrando que la modificación no desencadena una respuesta inmunoestimuladora significativa. En el caso de tratamiento de células con ARNip sin modificar que se dirigen tanto a 4E-BP1 como 2 a la vez, los niveles relativos de IFN en las células aumentan a aproximadamente 5 unidades en ausencia de poli(I:C).

30 Cuando las células se trataron con poli(I:C) (un desencadenante de la producción de IFN a través de los receptores RIG-I y MDA5), los niveles relativos de IFN están alrededor de 18, frente a aproximadamente 11 en células tratadas con ARNip mezclado, lo que demuestra que silenciar 4E-BP1 y 2 aumenta la respuesta de IFN, similar a nuestras observaciones en ratones que carecen de 4E-PB1/2. Por último, el tratamiento con ARNip modificado por completo (correspondiente a la arquitectura **\_611**) frente a 4E-BP1 y 2 en presencia de poli(I:C) produce niveles de interferón

35 relativos de aproximadamente 42 unidades, que es un aumento de 4 veces comparado con las células tratadas con mezclados, y un aumento de 2 veces comparado con células tratadas con ARNIP de 4E-BP1 y 2 sin modificar regular.

**Ejemplo 4: Reducción de luciferasa usando dúplex de ARNip que contienen 2'F-AAN y ANB**

40 A continuación se probó si 2'F-AAN podría actuar sinérgicamente con otro análogo de ARN que adopta una conformación del azúcar norte, es decir, ácido nucleico bloqueado (ANB). El ANB está bloqueado en una conformación de azúcar norte rígida mediante un puente metileno.

La primera serie, denominada "L-FL", se diseñó combinando hebras sentido 2'F-AAN con hebras antisentido que contenían extensiones de 2'F-AAN e insertos de ANB en posiciones previamente observadas que tenían actividad iARN. Las secuencias de los dúplex de la serie L-FL se proporcionan en la tabla IV.

5 **Tabla IV: Secuencias de los ARNip de la serie L-FL usados en los experimentos descritos en el presente documento**

Secuencia	Marcador hebra	Marcador ARNip	SEQ ID NO:
5'- <b>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT</b> -3'	303g		27
5'-pUUAUUAAAGACUUCAAGc <b>GG</b> -3'	GD2	L-LF1	38
5'- <b>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT</b> -3'	303g		27
5'-pUUAUUAAAGACUUCAa <b>GcGG</b> -3'	GD3	L-LF2	39
5'- <b>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT</b> -3'	303g		27
5'-pUUAUUaaAAGACUUCAAGc <b>GG</b> -3'	GD4	L-LF3	40
5'- <b>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT</b> -3'	303g		27
5'-pUUAUUAAAGACUUCAAGC <b>gg</b> -3'		L-LF4	56
5'- <b>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT</b> -3'	303g		27
5'-pUUAUUAAAGACUUCAAG <b>CGG</b> -3'	GD1	L-LF5	42
5'- <b>GCTTGAAGTCTTTAAUUAATT</b> -3'	L-S-RF		41
5'-pUUAUUAAAGACUUCAAGc <b>GG</b> -3'	GD2	L-LF6	38
5'- <b>GCTTGAAGTCTTTAAUUAATT</b> -3'	L-S-RF		41
5'-pUUAUUAAAGACUUCAa <b>GcGG</b> -3'	GD3	L-LF7	39
5'- <b>GCTTGAAGTCTTTAAUUAATT</b> -3'	L-S-RF		41
5'-pUUAUUaaAAGACUUCAAGc <b>GG</b> -3'	GD4	L-LF8	40
5'- <b>GCTTGAAGTCTTTAAUUAATT</b> -3'	L-S-RF		41
5'-pUUAUUAAAGACUUCAAGC <b>gg</b> -3'		L-LF9	56
5'- <b>GCTTGAAGTCTTTAAUUAATT</b> -3'	L-S-RF		41
5'-pUUAUUAAAGACUUCAAG <b>CGG</b> -3'	GD1	L-LF10	42
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'	G1A		19
5'-pUUAUUAAAGACUUCAAGC <b>gg</b> -3'		L-LF11	56
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'	G1A		19
5'-pUUAUUAAAGACUUCAAGC <b>GG</b> -3'	GD1	L-LF12	42
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'	G1A		19
5'-pUUAUUaaAAGACUUCAAGc <b>GG</b> -3'	GD4	L-LF13	40
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'	G1A		19
5'-UUAUUAAAGACUUCAAGC <b>gg</b> -3'	G1B	L-LF18	20
5'-GCUUGAUUUCUGAAUUAAtt-3'	178H		54
5'-UUAUUUCAGAAUCAAGC <b>gg</b> -3'	178I	Control sc	55

Mayúscula = ARN

Minúscula = adn

Minúscula subrayada = anb

10 Mayúscula negrita subrayada = **2'F-AAN (FAAN)**

Mayúscula negrita cursiva = **2'F-ARN**

p = 5'-fosfato

15 La segunda serie, denominada "L-FL2", se diseñó basada en arquitecturas 2'F-AAN/2'F-ARN mostradas tener sinergia que mejora la potencia significativa (véanse los ejemplos 2 y 3 anteriormente). Las secuencias de los dúplex en la serie L-FL2 se proporcionan en la tabla V.

20 **Tabla V: Secuencias de los ARNip de la serie L-FL2 usados en los experimentos descritos en el presente documento**

Hebras	Marcador hebra	Marcador ARNip	SEQ ID NO:
5'- <b>GC<u>u</u>GAAGUC<u>u</u>UUAA<u>u</u>UAATT</b> -3'	GD-21		43
5'-UUAUUAAAGACUUCAAGC <b>gg</b> -3'	G1B	L-LF2-1	20
5'- <b>GC<u>u</u>GAAGUC<u>u</u>UUAA<u>u</u>AATT</b> -3'	GD-22		44
5'-UUAUUAAAGACUUCAAGC <b>gg</b> -3'	G1B	L-LF2-2	20
5'- <b>GC<u>u</u>GAAGUC<u>u</u>UUAA<u>u</u>UAATT</b> -3'	GD-23		45
5'-UUAUUAAAGACUUCAAGC <b>gg</b> -3'	G1B	L-LF2-3	20
5'- <b>GC<u>u</u>GAAGUC<u>u</u>UUAA<u>u</u>AATT</b> -3'	GD-24		46
5'-UUAUUAAAGACUUCAAGC <b>gg</b> -3'	G1B	L-LF2-4	20
5'- <b>GC<u>u</u>GAAGUC<u>u</u>UUAA<u>u</u>UAATT</b> -3'	GD-25		47
5'-UUAUUAAAGACUUCAAGC <b>gg</b> -3'	G1B	L-LF2-5	20
5'- <b>GC<u>u</u>GAAGUC<u>u</u>UUAA<u>u</u>UAATT</b> -3'	GD-21		43
5'-pUUAUUAAAGACUUCAAGc <b>GG</b> -3'	GD2	L-LF2-6	38
5'- <b>GC<u>u</u>GAAGUC<u>u</u>UUAA<u>u</u>AATT</b> -3'	GD-22		44
		L-LF2-7	

5'-pUUAUUAAAGACUUCAAGcGG-3'	GD2		38
5'- <b>GCuUGAAGUCuUUAAUUAATT</b> -3'	GD-23	L-LF2-8	45
5'-pUUAUUAAAGACUUCAAGcGG-3'	GD2		38
5'- <b>GCuUGAAGUCuUUAAUUAATT</b> -3'	GD-24	L-LF2-9	46
5'-pUUAUUAAAGACUUCAAGcGG-3'	GD2		38
5'- <b>GCuUGAAGUCuUUAAUUAATT</b> -3'	GD-25	L-LF2-10	47
5'-pUUAUUAAAGACUUCAAGcGG-3'	GD2		38
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'	G1A	Control	19
5'-UUAUUAAAGACUUCAAGCgg-3'	G1B		20
5'-GCUUGAUUUCUGAAUUAAtt-3'	178H	Control sc	54
5'-UUAUUUUCAGAAUCAAGCgg-3'	178I		55

Mayúscula = ARN

Minúscula = adn

Minúscula subrayada = anb

Mayúscula negrita subrayada = **2'F-ARN (FAAN)**

5 Mayúscula negrita cursiva = **2'F-ARN**

p = 5'-fosfato

La tercera serie, denominada "L-FL3", utiliza las mismas hebras sentido de L-FL2 hibridadas con hebras antisentido todo 2'F-ARN. Las secuencias de los dúplex de la serie L-FL3 se proporcionan en la tabla VI.

10

**Tabla VI: Secuencias de los ARNip de la serie L-FL3 usados en los experimentos descritos en el presente documento**

Secuencia	Marcador hebra	Marcador ARNip	SEQ ID NO:
5'- <b>GCuUGAAGUCuUUAAuUAATT</b> -3'	GD-21		43
5'-p <b>TTAATTAAGACTTCAAGCGG</b> -3'	303f	L-LF3-1	26
5'- <b>GCuUGAAGUCuUUAAUUAATT</b> -3'	GD-22		44
5'-p <b>TTAATTAAGACTTCAAGCGG</b> -3'	303f	L-LF3-2	26
5'- <b>GCuUGAAGUCuUUAAUUAATT</b> -3'	GD-23		45
5'-p <b>TTAATTAAGACTTCAAGCGG</b> -3'	303f	L-LF3-3	26
5'- <b>GCuUGAAGUCuUUAAUUAATT</b> -3'	GD-24		46
5'-p <b>TTAATTAAGACTTCAAGCGG</b> -3'	303f	L-LF3-4	26
5'- <b>GCuUGAAGUCuUUAAUUAATT</b> -3'	GD-25		47
5'-p <b>TTAATTAAGACTTCAAGCGG</b> -3'	303f	L-LF3-5	26

Mayúscula = ARN

Minúscula = adn

Minúscula subrayada = anb

Mayúscula negrita subrayada = **2'F-ARN (FAAN)**

Mayúscula negrita cursiva = **2'F-ARN**

p = 5'-fosfato

15

20

Cada oligonucleótido se caracterizó por espectrometría de masas ESI-TOF (tabla VII) y para algunos de los oligonucleótidos por PAGE analítica desnaturante seguido por tratamiento con Stains-all.

**Tabla VIII: Datos de espectroscopia de masas para los oligonucleótidos de las series L-FL, L-FL2 y L-FL3**

25

Secuencia	Masa esperada (M-H) <sup>+</sup>	Masa experimental
GD2	6814	6814,3
GD3	6826	6826,7
GD4	6814	6812,5
L-S-RF	n.d.	n.d.
G1A	6618	6616,5
G1B	6674	6672,2
178H	6618	6616,4
178I	6674	6671,9
GD21	6707	6705,3
GD22	6720	6718
GD23	6696	6693
GD24	6708	6705,8
GD25	6690	6687,4
303g	6804	6802
303f	6911	6911

El análisis de los datos presentados en la figura 6 indica que la hebra antisentido GD2, que contiene dos extensiones 3' FAAN (2'F-AAN) seguido por un único residuo de ANB es compatible con la maquinaria de iARN, y en algunos casos puede mejorar la potencia de iARN relativa a una hebra antisentido de ARN regular (compárese L-FL1 y L-FL4). Considerando que los ARN modificados en 3' son en general más estables a la degradación por nucleasas, esta arquitectura antisentido se eligió para avanzar en estudios adicionales, ahora enfocados en probar la sinergia 2'F-AAN/ANB interhebra en la hebra sentido.

Como se ha mostrado anteriormente (ejemplos 2 y 3), se puede alcanzar silenciamiento génico potente usando ARNip quimeras de 2'F-AAN/2'F-ARN. Las arquitecturas de ARNip 2'F-AAN/2'F-ARN quiméricas que comprenden la serie L-FL2 de ARNip se diseñaron y estudiaron entonces. Se diseñaron las hebras sentido con regiones alternantes 2'F-AAN y ANB moviéndose de 5' a 3'. La incorporación de ANB se mantuvo a un mínimo rodeando insertos de ANB con configuración fuertemente norte con ARN. Las modificaciones químicas en los extremos 3' de las hebras sentido se variaron en intentos de capitalizar en el sesgo termodinámico observado de RISC para carga de la hebra de ARNip con la afinidad de unión más débil en el extremo 5'. 7 hebras sentido GD21-GD25 son idénticas hasta el nucleótido 14, después de lo cual se emplearon varios patrones de modificación química. Las hebras GD21 y 22 muestran regiones ANB-2'F-AAN alternantes diseñadas para explorar los efectos de colocar configuraciones de azúcar contrarias (norte frente a sureste) una al lado de otra en una hebra sentido. GD23-25 muestra varios patrones de modificación 2'F-AAN combinada con ARN sin modificar, incluyendo diseños de altímeros 1-1, diseños de altímeros 2-2, y regiones 3' totalmente ARN seguidas por extensiones 2'F-AAN. La  $T_m$  de los dúplex de oligonucleótidos de la serie L-FL2 se proporciona en la tabla VIII a continuación.

**Tabla VIII:  $T_m$  de los dúplex de oligonucleótidos de la serie L-FL2**

ARNip	$T_m$ (°C)
L-FL2-1	62,9
L-FL2-2	59,2
L-FL2-3	58,4
L-FL2-4	55,0
L-FL2-5	58,6
L-FL2-6	65,7
L-FL2-7	62,2
L-FL2-8	n.d.
L-FL2-9	60,5
L-FL2-10	61,9
Control	60,5

Según los datos de  $T_m$  obtenidos, las modificaciones químicas en 3' no crearon cambios significativos en la afinidad de unión de dúplex, lo que sugiere que no se introdujo sesgo de hebra para carga de la hebra antisentido apropiada. Sin embargo, la secuencia de ARNip tiene alto contenido A:U en el extremo 5' de la hebra antisentido, favoreciendo la carga apropiada de RISC, y tal vez sea innecesario sesgo de hebra adicional. Para examinar la actividad de silenciamiento génico de estas hebras sentido ANB/2'F-AAN, se prepararon ARNip hibridando GD21-GD25 con una hebra antisentido de ARN regular, o con GD2, la potente hebra antisentido de ANB/2'F-AAN de la serie L-FL. En efecto, a pesar del fracaso para introducir sesgo de hebra significativo, varias de estas arquitecturas modificadas fueron capaces de provocar silenciamiento génico potente, comparable a o mejor que el sustrato de RISC nativo, ARNbc.

Los ensayos iniciales de ARNip con la serie L-FL2 indicaban aumentos de potencia varias veces mejor que los controles sin modificar. De hecho, se observó reducción del 70-90% a intervalos subnanomolares para L-FL2-9 y L-FL2-10, reducción más fuerte que incluso tratamientos 2 nM con ARNip sin modificar. Ensayos posteriores de reducción de luciferasa de luciérnaga indican disminución potente de la serie L-FL2. En la figura 7 se muestran los resultados de la reducción para los mejores ARNip en la serie L-FL2. Varias de las arquitecturas son bien toleradas por la maquinaria de RISC. Algunas de las arquitecturas probadas aquí son silenciadores génicos mucho más potentes que ARNip sin modificar, especialmente a dosis menores. Además, los diseños que contienen ANB parecen ser más potentes que uno de los diseños de ARNip 2'F-AAN/2'F-ARN potentes descritos anteriormente (**Fig. 14**). Por tanto, estos datos muestran que los diseños de ARNip muy modificados aparentemente no tienen efectos nocivos en el silenciamiento génico.

La serie L-FL2 demuestra planes de modificación de la hebra sentido que son muy compatibles con el silenciamiento génico. Sin embargo, en estos casos la hebra antisentido permanece sin modificar, o solo modificada en 3'. Se probó después si era posible combinar estas arquitecturas de hebra sentido potentes con modificaciones de hebra antisentido compatibles con RISC, tal como hebras antisentido 2'F-ARN.

Basado en la eficacia de las hebras sentido ANB/2'F-AAN de la serie L-FL2, y en la eficacia observada de hebras antisentido de 2'F-ARN por completo, se diseñaron ARNip muy modificados que contenían solo 7-11 insertos de ARN (serie L-FL3). Estas arquitecturas de modificación química representan la combinación de diseños mostrados

en el presente documento que son compatibles con silenciamiento basados en ARNip (ejemplos 2 y 3, series L-FL1 y L-FL2). Como se muestra en la figura 8, estos imitadores de ARNip muy modificados muestran capacidades de silenciamiento génico potentes. Algunos de estos ARNip modificados son significativamente más potentes que el ARNip control, incluso en a la dosis de intervalo medio 0,08 nM donde la potencia de los ARNip modificados de la serie L-FL2 era aproximadamente igual que la del ARNip sin modificar.

**Ejemplo 5: Disminución de C-myb usando dúplex de ARNip basados en las arquitecturas 2’F-AAN/2’F-ARN y 2’F-AAN/2’F-ARN/ANB**

C-myb es un protooncogén implicado en leucemia. Codifica proteínas esenciales para la proliferación de células hematopoyéticas. Se probaron arquitecturas 2’F-AAN/2’F-ARN y 2’F-AAN/2’F-ARN/ANB mostradas que tienen actividades de silenciamiento génicos de luciferasa y/o 4E-BP contra otra diana, es decir, c-myb. Las secuencias de los dúplex de la serie C-myb se proporcionan en la tabla IX.

**Tabla IX: Secuencias de los ARNip de la serie C-myb usadas en los estudios descritos en el presente documento**

Hebras	Marcadores de ARNip	SEQ ID NO:
5'-UGUUUUUUGCCAAGCACUUAAA-3'	Cmyb-1	48
5-UAAGUGCUUUGGCAAUACAGA-3'		49
5'- <b>TGTUAUTGCCAAGCACTUAAA</b> -3'	Cmyb-2	50
5'- <b>pUAAGUGCUUUGGCAAUACAGA</b> -3'		51
5'- <b>TGuUATTGCCaAGCAcUTAAA</b> -3'	Cmyb-3	52
5'- <b>pUAAGUGCUUUGGCAAUACAGA</b> -3'		51
5'- <b>TGTUAUTGCCAAGCACTUAAA</b> -3'	Cmyb-4	50
5-UAAGUGCUUUGGCAAUACAGA-3'		49
5'- <b>TGuUATTGCCaAGCAcUTAAA</b> -3'	Cmyb-5	52
5'-UAAGUGCUUUGGCAAUACAGA-3'		49
5'-UGUUUUUUGCCAAGCACUUAAA-3'	Cmyb-6	48
5'- <b>pUAAGUGCUUUGGCAAUACAGA</b> -3'		51
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'	Mezclado	19
5'-UUAAUUAAGACUUCAAGCgg-3'		20
5'- <b>CGTACGCGGAAUACTUCGATT</b> -3'	Mezclado Mod.1	35
5'- <b>pUCGAAGUAUUCGCGUACGUU</b> -3'		37
5'- <b>GcUUGAAGUCuUUAuUAATT</b> -3'	Mezclado Mod.2	43
5'- <b>pTTAATTAAGACTTCAAGCGG</b> -3'		26

Mayúscula = ARN

Minúscula = adn

Minúscula subrayada = anb

Mayúscula negrita subrayada = **2’F-AAN (FAAN)**

Mayúscula negrita cursiva = **2’F-ARN**

p = 5'-fosfato

Como se muestra en la figura 9A, los ARNip modificados con 2’F-AAN/2’F-ARN y 2’F-AAN/2’F-ARN/ANB son capaces de silenciar la expresión génica en otra diana, y son mejores silenciando c-myb que ARNip sin modificar a las dosis menores. La arquitectura 2’F-AAN/2’F-ARN parece ser más potente en las condiciones experimentales ensayadas.

La figura 9B muestra la tasa de supervivencia (el eje y representa el número de células de leucemia aún vivas después de los periodos de tiempo indicados después del tratamiento con ARNip diseñado para dirigirse a c-myb y prevenir la proliferación de células de leucemia) después del tratamiento con ARNip. De forma interesante, las células de leucemia tratadas con ARNip sin modificar se recuperan 6 días después del tratamiento y empiezan a proliferar otra vez, mientras que varios de los ARNip modificados, aún previenen la proliferación después de 6 días. Esto sugiere que los ARNip modificados no se degradan tanto como los ARNip sin modificar después de estos periodos de tiempo.

Las novedosas arquitecturas de ARNip quiméricos descritas en el presente documento representan miméticos de ARNip no explorados previamente capaces de potencias equivalentes o mejoradas comparados con ARNip sin modificar.

**Tabla X: Resumen de los ARNip usados en los estudios descritos en el presente documento**

Secuencia	ID de dúplex de ARNip	SEQ ID NO:
<b>ARNip de la tabla III</b>		
5' AACUCACCUUGUGACCAAACA	Control sin modificar	1

5' UUUUGGUCACAGGUGAGUUcc	4EBP-1 humano	2
5' AAGACUCCAAAGUAGAAGUaa	Control sin modificar	3
5' ACUUCUACUUUGGAGUCUUca	4EBP-2 humano y murino	4
5' AACUCACCUUGUGGCCAAAACA	Control sin modificar	5
5' UUUUGGCCACAGGUGAGUUcc	4EBP-1 murino	6
5' <b>AACTCACCTGTGGCCAAAACA</b>	4EBP-1 murino_14	7
5' <b>pUUUUGGCCACAGGUGAGUUCC</b>		8
5' <b>AACTCACCTGTGACCAAAAACA</b>	4EBP-1 humano_14	9
5' <b>pUUUUGGUCACAGGUGAGUUCC</b>		10
5' <b>AAGACTCCAAAGTAGAAGTAA</b>	4EBP-2 ratón_14 o	11
5' <b>pACUUCUACUUUGGAGUCUUCA</b>	4EBP-2 humano_14	12
5' <b>AACUCACCTGUGGCCAAAACA</b>	4EBP-1 ratón_611	13
5' <b>pUUUUGGCCACAGGUGAGUUCC</b>		14
5' <b>AACUCACCTGUGACCAAAAACA</b>	4EBP-1 humano_611	15
5' <b>pUUUUGGUCACAGGUGAGUUCC</b>		16
5' <b>AAGACUCCAAAGTAGAAGTAA</b>	4EBP-2 ratón_611 o	17
5' <b>pACUUCUACUUUGGAGUCUUCA</b>	4EBP-2 humano_611	18
<b>ARNip de la tabla I</b>		
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'		19
5'-UUAAUUAAAGACUUCAAGCgg-3'	jg-1	20
5'- <b>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT-3'</b>		21
5'- <b>TTAATTAAGACTTCAAGCGG-3'</b>	jg-2	22
5'- <b>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT-3'</b>		23
5'- <b>TTAATTAAGACTTCAAGCGG-3'</b>	jg-3	24
5'- <b>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT-3'</b>		25
5'-p <b>TTAATTAAGACTTCAAGCGG-3'</b>	jg-4	26
5'- <b>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT-3'</b>		27
5'-p <b>TTAATTAAGACTTCAAGCGG-3'</b>	jg-5	28
5'- <b>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT-3'</b>		21
5'-UUAAUUAAAGACUUCAAGCgg-3'	jg-6	20
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'		19
5'- <b>TTAATTAAGACTTCAAGCGG-3'</b>	jg-7	22
5'- <b>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT-3'</b>		23
5'-UUAAUUAAAGACUUCAAGCgg-3'	jg-8	20
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'		19
5'- <b>TTAATTAAGACTTCAAGCGG-3'</b>	jg-9	24
5'- <b>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT-3'</b>		25
5'-UUAAU UAAAGACUUCAAGCgg-3'	jg-10	20
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'		19
5'-p <b>TTAATTAAGACTTCAAGCGG-3'</b>	jg-11	26
5'- <b>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT-3'</b>		27
5'-UUAAUUAAAGACUUCAAGCgg-3'	jg-12	20
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'		19
5'-p <b>TTAATTAAGACTTCAAGCGG-3'</b>	jg-13	28
5'- <b>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT-3'</b>		27
5'-p <b>TTAATTAAGACTTCAAGCGG-3'</b>	jg-14	26
5'- <b>GCTTGAAGTCTTTAATTAATT-3'</b>		25
5'-p <b>TTAATTAAGACTTCAAGCGG-3'</b>	jg-15	28
<b>ARNip de la tabla II</b>		
5'-CGUACGCGGAUACUUCGAtt-3'		29
5'-UCGAAGUAUUCGCGUACGtt-3'	kl-ctl	30
5'- <b>CGUACGCGGAUACUUCGAUU-3'</b>		31
5'-UCGAAGUAUUCGCGUACGtt-3'	kl-1	30
5'- <b>CGTACGCGGAATACTTCGATT-3'</b>		32
5'-UCGAAGUAUUCGCGUACGtt-3'	kl-2	30
5'- <b>CGTACGCGGAATACUUCGATT-3'</b>		33
5'-UCGAAGUAUUCGCGUACGtt-3'	kl-3	30
5'- <b>CGTACGCGGAUACTUCGATT-3'</b>		34
5'-UCGAAGUAUUCGCGUACGtt-3'	kl-4	30
5'- <b>CGTACGCGGAUACTUCGATT-3'</b>		35
5'-UCGAAGUAUUCGCGUACGtt-3'	kl-5	30
5'- <b>CGTACGCGGAUACTUCGATT-3'</b>		36
5'-UCGAAGUAUUCGCGUACGtt-3'	kl-6	30

5'-CGUACGCGGAUACUUCGAUU-3'		31
5'-pUCGAAGUAUUCGCGUACGUU-3'	kl-7	37
5'-CGTACGCGGAATACTTCGATT-3'		32
5'-pUCGAAGUAUUCGCGUACGUU-3'	kl-8	37
5'-CGTACGCGGAATACUUCGATT-3'		33
5'-pUCGAAGUAUUCGCGUACGUU-3'	kl-9	37
5'-CGTACGCGGAUACTUCGATT-3'		34
5'-pUCGAAGUAUUCGCGUACGUU-3'	kl-10	37
5'-CGTACGCGGAUACTUCGATT-3'		35
5'-pUCGAAGUAUUCGCGUACGUU-3'	kl-11	37
5'-CGTACGCGGAUACTUCGATT-3'		36
5'-pUCGAAGUAUUCGCGUACGUU-3'	kl-12	37
<b>ARNip de la tabla IV</b>		
5'-GCTTGAAGTCTTTAATTAATT-3'		27
5'-pUUAAUUAAAGACUUCAAGcGG-3'	L-FL1	38
5'-GCTTGAAGTCTTTAATTAATT-3'		27
5'-pUUAAUUAAAGACUUCAaGcGG-3'	L-FL2	39
5'-GCTTGAAGTCTTTAATTAATT-3'		27
5'-pUUAAUUaaAAGACUUCAAGcGG-3'	L-FL3	40
5'-GCTTGAAGTCTTTAAUUAATT-3'		41
5'-pUUAAUUAAAGACUUCAAGcGG-3'	L-FL6	38
5'-GCTTGAAGTCTTTAAUUAATT-3'		41
5'-pUUAAUUAAAGACUUCAaGcGG-3'	L-FL7	39
5'-GCTTGAAGTCTTTAAUUAATT-3'		41
5'-pUUAAUUaaAAGACUUCAAGcGG-3'	L-FL8	40
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'		19
5'-pUUAAUUAAAGACUUCAAGcGG-3'	L-FL13	38
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'		19
5'-pUUAAUUAAAGACUUCAaGcGG-3'	L-FL14	39
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'		19
5'-pUUAAUUaaAAGACUUCAAGcGG-3'	L-FL15	40
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'		19
5'-pUUAAUUAAAGACUUCAAGcGG-3'	L-FL-2	42
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'		19
5'-UUAAUUAAAGACUUCAAGCgg-3'	Control	20
5'-GCUUGAUUUCUGAAAUUAAtt-3'		54
5'-UUAAUUUCAGAAAUCAAGCgg-3'	Control sc	55
<b>ARNip de la tabla V</b>		
5'-GCTTGAAGTCTTTAATTAATT-3'		27
5'-pUUAAUUAAAGACUUCAAGcGG-3'	L-LF1	38
5'-GCTTGAAGTCTTTAATTAATT-3'		27
5'-pUUAAUUAAAGACUUCAaGcGG-3'	L-LF2	39
5'-GCTTGAAGTCTTTAATTAATT-3'		27
5'-pUUAAUUaaAAGACUUCAAGcGG-3'	L-LF3	40
5'-GCTTGAAGTCTTTAATTAATT-3'		27
5'-pUUAAUUAAAGACUUCAAGCgg-3'	L-LF4	56
5'-GCTTGAAGTCTTTAATTAATT-3'		27
5'-pUUAAUUAAAGACUUCAAGcGG-3'	L-LF5	42
5'-GCTTGAAGTCTTTAAUUAATT-3'		41
5'-pUUAAUUAAAGACUUCAAGcGG-3'	L-LF6	38
5'-GCTTGAAGTCTTTAAUUAATT-3'		41
5'-pUUAAUUAAAGACUUCAaGcGG-3'	L-LF7	39
5'-GCTTGAAGTCTTTAAUUAATT-3'		41
5'-pUUAAUUaaAAGACUUCAAGcGG-3'	L-LF8	40
5'-GCTTGAAGTCTTTAAUUAATT-3'		41
5'-pUUAAUUAAAGACUUCAAGCgg-3'	L-LF9	56
5'-GCTTGAAGTCTTTAAUUAATT-3'		41
5'-pUUAAUUAAAGACUUCAAGcGG-3'	L-LF10	42
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'		19
5'-pUUAAUUAAAGACUUCAAGCgg-3'	L-LF11	56
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'		19
5'-UUAAUUAAAGACUUCAAGcGG-3'	L-LF12	42
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'	L-LF13	19

5'-pUUAUUaaAAGACUUCAAGcGG-3'		40
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'	L-LF18	19
5'-UUAUUAAAGACUUCAAGCgg-3'		20
5'-GCUUGAUUUCUGAAUUAAtt-3'	Control sc	54
5'-UUAUUUCAGAAAUCAAGCgg-3'		55
<b>ARNip de la tabla VI</b>		
5'-GCuUGAAGUCuUUA <u>u</u> UAATT-3'	L-LF3-1	43
5'-pTTAATTAAGACTTCAAGCGG-3'		26
5'-GCuUGAAGUCuUUA <u>A</u> TuAATT-3'	L-LF3-2	44
5'-pTTAATTAAGACTTCAAGCGG-3'		26
5'-GCuUGAAGUCuUUA <u>u</u> UAATT-3'	L-LF3-3	45
5'-pTTAATTAAGACTTCAAGCGG-3'		26
5'-GCuUGAAGUCuUUA <u>A</u> TuAATT-3'	L-LF3-4	46
5'-pTTAATTAAGACTTCAAGCGG-3'		26
5'-GCuUGAAGUCuUUA <u>A</u> UUAATT-3'	L-LF3-5	47
5'-pTTAATTAAGACTTCAAGCGG-3'		26
<b>ARNip de la tabla IX</b>		
5'-UGUUAUUGCCAAGCACUAAAA-3'	Cmyb-1	48
5-UAAGUGCUUGGCAAUAACAGA-3'		49
5'-TGTU <u>A</u> UTGCCAAGCACTUAAA-3'	Cmyb-2	50
5'-pUAAGUGCUUGGCAAUAACAGA-3'		51
5'-TGuUATTGCCaAGCAcUTAAA-3'	Cmyb-3	52
5'-pUAAGUGCUUGGCAAUAACAGA-3'		51
5'-TGTU <u>A</u> UTGCCAAGCACTUAAA-3'	Cmyb-4	50
5-UAAGUGCUUGGCAAUAACAGA-3'		49
5'-TGuUATTGCCaAGCAcUTAAA-3'	Cmyb-5	52
5-UAAGUGCUUGGCAAUAACAGA-3'		49
5'-UGUUAUUGCCAAGCACUAAAA-3'	Cmyb-6	48
5'-pUAAGUGCUUGGCAAUAACAGA-3'		51
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'	sc	19
5'-UUAUUAAAGACUUCAAGCgg-3'		20
5'-CGTACGCGGAAU <u>ACTUCGATT</u> -3'	sc Mod. 1	35
5'-pUCGAAGUAU <u>UCCGCGUACGUU</u> -3'		37
5'-GCuUGAAGUCuUUA <u>u</u> UAATT-3'	sc Mod.2	43
5'-pTTAATTAAGACTTCAAGCGG-3'		26
<b>ARNip de la figura 4</b>		
5' AACUCACCUUGUGACCAAAca	Control sin modificar 4EBP-1 humano (ARNip control 1)	1
5' UUUUGGUCACAGGUGAGUucc		2
5' <b>AACTCACCTGTGACCAAAACA</b>	4EBP-1 humano_14	9
5' <b>pUUUUGGUCACAGGUGAGUucc</b>		10
5' <b>AACTCACCTGUGACCAAAACA</b>	4EBP-1 humano_611	15
5' <b>pUUUUGGUCACAGGUGAGUucc</b>		16
5' AAGACUCCAAAGUAGAAGUaa	Control sin modificar 4EBP-2 humano (ARNip control 2)	3
5' ACUUCUACUUUGGAGUCUuca		4
5' <b>AAGACTCCAAAGTAGAAGTAA</b>	4EBP-2 humano_14	11
5' <b>pACUUCUACUUUGGAGUCUuca</b>		12
5' <b>AAGACUCCAAAGTAGAAGTAA</b>	4EBP-2 humano_611	17
5' <b>pACUUCUACUUUGGAGUCUuca</b>		18
5'-GCUUGAAGUCUUUAAUUAAtt-3'	Control Mezclado (sc)	19
5'-UUAUUAAAGACUUCAAGCgg-3'		20
5'-GCTTGAAGTCTTTAATTAATT-3'	Control Mezclado (sc) Modificado 1	27
5'-pUUAUUAAAGACUUCAAGCGG-3'		53
5'-CGTACGCGGAAU <u>ACTUCGATT</u> -3'	Control Mezclado (sc) Modificado 2	35
5'-pUCGAAGUAU <u>UCCGCGUACGUU</u> -3'		37

Mayúscula = ARN

Minúscula = adn

Minúscula subrayada = anb

Mayúscula negrita subrayada = **2'F-AAAN (FAAN)**

5 Mayúscula negrita cursiva = **2'F-ARN**

p = 5'-fosfato

Aunque la presente invención se ha descrito anteriormente mediante formas de realización específicas de la misma, se puede modificar, sin separarse de la invención objeto como se define en las reivindicaciones adjuntas. En las reivindicaciones, la palabra "comprender" se usa como término abierto, sustancialmente equivalente a la frase "incluyendo, pero no limitado a". Las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales correspondientes a menos que el contexto claramente dicte otra cosa.

**Lista de secuencias**

- 5
- 10 <110> THE ROYAL INSTITUTION FOR ADVANCEMENT OF LEARNING/MCGILL UNIVERSITY  
DAMHA, Masad, J.  
WATTS, Jonathan K.  
DELEAVEY, Gen
- 15 <120> DÚPLEX OLIGONUCLEOTÍDICOS Y USOS DE LOS MISMOS  
<130> 780/11168.354  
  
<150> US 61/059.186  
<151> 05-06-2008
- 20 <150> CA 2.635.187  
<151> 17-06-2008  
  
<150> PCT/CA2008/002259  
25 <151> 19-12-2008  
  
<160> 56  
  
<170> PatentIn versión 3.5
- 30 <210> 1  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
  
<220>  
40 <221> característica misc  
<222> (1)..(19)  
<223> ARN  
  
<220>  
45 <221> característica misc  
<222> (20)..(21)  
<223> ADN  
  
<400> 1  
50 aacucaccug ugaccaaac a 21
- <210> 2  
<211> 21  
<212> ADN  
55 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético
- 60 <220>  
<221> característica misc  
<222> (1)..(19)  
<223> ARN
- 65 <220>  
<221> característica misc

	<222> (20)..(21)	
	<223> ADN	
	<400> 2	
5	uuuuggucac aggugaguuc c	21
	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
15	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (1)..(19)	
	<223> ARN	
20	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (20)..(21)	
	<223> ADN	
25	<400> 3	
	aagacucxaa aguagaagua a	21
	<210> 4	
	<211> 21	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
35	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (1)..(19)	
	<223> ARN	
40	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (20)..(21)	
	<223> ADN	
45	<400> 4	
	acuucuacuu uggagucuuc a	21
	<210> 5	
50	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (1)..(19)	
60	<223> ARN	
	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (20)..(21)	
65	<223> ADN	

	<400> 5 aacucaccug uggccaaaac a	21
5	<210> 6 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
15	<220> <221> característica misc <222> (1)..(19) <223> ARN	
20	<220> <221> característica misc <222> (20)..(21) <223> ADN	
	<400> 6 uuuuggccac aggugaguuc c	21
25	<210> 7 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
35	<220> <221> característica misc <222> (1)..(21) <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
	<400> 7 aactcacctg tggccaaaac a	21
40	<210> 8 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
50	<220> <221> característica misc <222> (1)..(21) <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	
55	<220> <221> característica misc <222> (1)..(1) <223> modificación 5'-fosfato	
60	<400> 8 uuuuggccac aggugaguuc c	21
65	<210> 9 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 643 576 T3

	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
5	<220> <221> característica misc <222> (1)..(21) <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
10	<400> 9 aactcacctg tgaccaaaac a	21
	<210> 10 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
20	<220> <221> característica misc <222> (1)..(21) <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	
25	<220> <221> característica misc <222> (1)..(1) <223> modificación 5'-fosfato	
30	<400> 10 uuuuggucac aggugaguuc c	21
	<210> 11 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
40	<220> <221> característica misc <222> (1)..(21) <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
45	<400> 11 aagactccaa agtagaagta a	21
50	<210> 12 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
60	<220> <221> característica misc <222> (1)..(21) <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	
65	<220> <221> característica misc <222> (1)..(1)	

	<223> modificación 5'-fosfato	
	<400> 12	
	acuucuacuu uggagucuuc a	21
5	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
15	<221> característica misc	
	<222> (1)..(3)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
	<220>	
20	<221> característica misc	
	<222> (4)..(6)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	
	<220>	
25	<221> característica misc	
	<222> (7)..(9)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
	<220>	
30	<221> característica misc	
	<222> (10)..(12)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	
	<220>	
35	<221> característica misc	
	<222> (13)..(13)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
	<220>	
40	<221> característica misc	
	<222> (14)..(14)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	
	<220>	
45	<221> característica misc	
	<222> (15)..(15)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
	<220>	
50	<221> característica misc	
	<222> (16)..(16)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	
	<220>	
55	<221> característica misc	
	<222> (17)..(17)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
	<220>	
60	<221> característica misc	
	<222> (18)..(18)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	
	<220>	
65	<221> característica misc	
	<222> (19)..(21)	

ES 2 643 576 T3

	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
	<400> 13 aacucacctg uggcctaaaac a	21
5	<210> 14 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
15	<220> <221> característica misc <222> (1)..(21) <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	
20	<220> <221> característica misc <222> (1)..(1) <223> modificación 5'-fosfato	
25	<400> 14 uuuuggccac aggugaguuc c	21
30	<210> 15 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
35	<220> <221> característica misc <222> (1)..(3) <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
40	<220> <221> característica misc <222> (4)..(6) <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	
45	<220> <221> característica misc <222> (7)..(9) <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
50	<220> <221> característica misc <222> (10)..(12) <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	
55	<220> <221> característica misc <222> (13)..(13) <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
60	<220> <221> característica misc <222> (14)..(14) <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	
65	<220>	

	<221> característica misc	
	<222> (15)..(15)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
5	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (16)..(16)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	
10	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (17)..(17)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
15	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (18)..(18)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	
20	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (19)..(21)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
25	<400> 15	
	aacucacctg ugacaaaaac a	21
	<210> 16	
	<211> 21	
30	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
35	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (1)..(21)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	
40	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (1)..(1)	
	<223> modificación 5'-fosfato	
45	<400> 16	
	uuuuggucac aggugaguuc c	21
	<210> 17	
50	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (1)..(3)	
60	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (4)..(6)	
65	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (7)..(9)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 5  
 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (10)..(12)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa  
 10  
 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (13)..(13)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 15  
 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (14)..(14)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa  
 20  
 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (15)..(15)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 25  
 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa  
 30  
 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (17)..(17)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 35  
 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (18)..(18)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa  
 40  
 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (19)..(21)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 45  
 <400> 17  
 aagacuccaa agtagaagta a  
 50  
 <210> 18  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (1)..(21)  
 60  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa  
 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (1)..(1)  
 65  
 <223> modificación 5'-fosfato

	<400> 18		
	acuucuacuu uggagucuuc a		21
5	<210> 19 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético		
15	<220> <221> característica misc <222> (1)..(19) <223> ARN		
20	<220> <221> característica misc <222> (20)..(21) <223> ADN		
	<400> 19		
	gcuugaaguc uuuaauaat t		21
25	<210> 20 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético		
35	<220> <221> característica misc <222> (1)..(19) <223> ARN		
40	<220> <221> característica misc <222> (20)..(21) <223> ADN		
	<400> 20		
	uuuaauaaag acuucaagcg g		21
45	<210> 21 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
50	<220> <223> Oligonucleótido sintético		
55	<220> <221> característica misc <222> (1)..(1) <223> fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa		
60	<220> <221> característica misc <222> (2)..(4) <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa		
65	<220> <221> característica misc		

- <222> (5)..(8)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- <220>  
5 <221> característica misc  
<222> (9)..(13)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- <220>  
10 <221> característica misc  
<222> (14)..(15)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- <220>  
15 <221> característica misc  
<222> (16)..(17)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- <220>  
20 <221> característica misc  
<222> (18)..(21)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- <400> 21  
25 gcttgaagtc ttaattaat t
- <210> 22  
<211> 21  
<212> ADN  
30 <213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Oligonucleótido sintético
- <220>  
35 <221> característica misc  
<222> (1)..(2)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- <220>  
40 <221> característica misc  
<222> (3)..(4)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- <220>  
45 <221> característica misc  
<222> (5)..(6)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- <220>  
50 <221> característica misc  
<222> (7)..(11)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- <220>  
55 <221> característica misc  
<222> (12)..(15)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- <220>  
60 <221> característica misc  
<222> (16)..(18)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- <220>  
65 <221> característica misc

<222> (19)..(19)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa  
  
 <220>  
 5 <221> característica misc  
 <222> (20)..(21)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
  
 <400> 22  
 10 ttaattaaag acttcaagcg g 21  
  
 <210> 23  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 20 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (1)..(1)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
  
 25 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (2)..(2)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa  
  
 30 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (3)..(3)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
  
 35 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (4)..(4)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa  
  
 40 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (5)..(5)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
  
 45 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (6)..(6)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa  
  
 50 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (7)..(7)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
  
 55 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (8)..(8)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa  
  
 60 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (9)..(9)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
  
 65 <220>

- <221> característica misc  
 <222> (10)..(10)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 5 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (11)..(11)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 10 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (12)..(12)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 15 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (13)..(13)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 20 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (14)..(14)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 25 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (15)..(15)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 30 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 35 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (17)..(17)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 40 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (18)..(18)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 45 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (19)..(21)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 50 <400> 23  
 gcttgaagtc ttttaattaat t
- <210> 24  
 <211> 21
- 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético
- 60 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (1)..(1)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 65 <220>

- <221> característica misc  
<222> (2)..(2)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 5 <220>  
<221> característica misc  
<222> (3)..(3)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 10 <220>  
<221> característica misc  
<222> (4)..(4)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 15 <220>  
<221> característica misc  
<222> (5)..(5)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 20 <220>  
<221> característica misc  
<222> (6)..(6)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 25 <220>  
<221> característica misc  
<222> (7)..(7)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 30 <220>  
<221> característica misc  
<222> (8)..(8)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 35 <220>  
<221> característica misc  
<222> (9)..(9)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 40 <220>  
<221> característica misc  
<222> (10)..(10)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 45 <220>  
<221> característica misc  
<222> (11)..(11)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 50 <220>  
<221> característica misc  
<222> (12)..(12)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 55 <220>  
<221> característica misc  
<222> (13)..(13)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 60 <220>  
<221> característica misc  
<222> (14)..(14)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 65 <220>  
<221> característica misc

<222> (15)..(15)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa  
  
 <220>  
 5 <221> característica misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
  
 <220>  
 10 <221> característica misc  
 <222> (17)..(17)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa  
  
 <220>  
 15 <221> característica misc  
 <222> (18)..(18)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
  
 <220>  
 20 <221> característica misc  
 <222> (19)..(19)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa  
  
 <220>  
 25 <221> característica misc  
 <222> (20)..(21)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
  
 <400> 24  
 30 ttaattaaag acttcaagcg g 21  
  
 <210> 25  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <220>  
 40 <221> característica misc  
 <222> (1)..(21)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa  
  
 <400> 25  
 45 gcttgaagtc ttaattaat t 21  
  
 <210> 26  
 <211> 21  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <220>  
 55 <221> característica misc  
 <222> (1)..(21)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa  
  
 <220>  
 60 <221> característica misc  
 <222> (1)..(1)  
 <223> modificación 5'-fosfato  
  
 65

ES 2 643 576 T3

	<400> 26 ttaaattaaag acttcaagcg g	21
5	<210> 27 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
15	<220> <221> característica misc <222> (1)..(21) <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'fluoroarabinosa	
	<400> 27 gcttgaagtc tttaattaat t	21
20	<210> 28 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
30	<220> <221> característica misc <222> (1)..(21) <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'fluoroarabinosa	
35	<220> <221> característica misc <222> (1)..(1) <223> modificación 5'-fosfato	
40	<400> 28 ttaaattaaag acttcaagcg g	21
45	<210> 29 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
55	<220> <221> característica misc <222> (1)..(19) <223> ARN	
60	<220> <221> característica misc <222> (20)..(21) <223> ADN	
65	<400> 29 cguacgcgga auacuucgat t	21
	<210> 30 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
5	<220> <221> característica misc <222> (1)..(19) <223> ARN	
10	<220> <221> característica misc <222> (20)..(21) <223> ADN	
15	<400> 30 ucgaaguauu ccgcguacgt t	21
	<210> 31 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
25	<220> <221> característica misc <222> (1)..(21) <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	
30	<400> 31 cguacgcgga auacuucgau u	21
	<210> 32 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
40	<220> <221> característica misc <222> (1)..(21) <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
45	<400> 32 cgtacgcgga atacttcgat t	21
	<210> 33 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<220> <221> característica misc <222> (1)..(14) <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
60	<220> <221> característica misc <222> (15)..(19)	
65	<220> <221> característica misc <222> (15)..(19)	

<223> ARN  
 <220>  
 <221> característica misc  
 5 <222> (20)..(21)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 <400> 33  
 cgtacgcgga atacuucgat t 21  
 10 <210> 34  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 20 <221> característica misc  
 <222> (1)..(3)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 <220>  
 25 <221> característica misc  
 <222> (4)..(6)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa  
 <220>  
 30 <221> característica misc  
 <222> (7)..(9)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 <220>  
 35 <221> característica misc  
 <222> (10)..(12)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa  
 <220>  
 40 <221> característica misc  
 <222> (13)..(15)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 <220>  
 45 <221> característica misc  
 <222> (16)..(18)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa  
 <220>  
 50 <221> característica misc  
 <222> (19)..(21)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 <400> 34  
 55 cgtacgcgga auactucgat t 21  
 <210> 35  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 65 <220>

- <221> característica misc  
 <222> (1)..(3)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 5 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (4)..(6)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 10 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (7)..(9)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 15 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (10)..(12)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 20 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (13)..(13)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 25 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (14)..(14)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 30 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (15)..(15)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 35 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 40 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (17)..(17)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 45 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (18)..(18)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 50 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (19)..(21)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 55 <400> 35  
 cgtacgcgga auactucgat t
- <210> 36  
 <211> 21
- 60 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético
- 65 <220>

- <221> característica misc  
 <222> (1)..(1)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 5 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (2)..(2)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 10 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (3)..(3)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 15 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (4)..(4)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 20 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (5)..(5)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 25 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (6)..(6)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 30 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (7)..(7)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 35 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (8)..(8)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 40 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (9)..(9)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 45 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (10)..(10)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 50 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (11)..(11)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 55 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (12)..(12)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 60 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (13)..(13)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 65 <220>  
 <221> característica misc

	<222> (14)..(14)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	
	<220>	
5	<221> característica misc	
	<222> (15)..(15)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
	<220>	
10	<221> característica misc	
	<222> (16)..(16)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	
	<220>	
15	<221> característica misc	
	<222> (17)..(17)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
	<220>	
20	<221> característica misc	
	<222> (18)..(18)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	
	<220>	
25	<221> característica misc	
	<222> (19)..(21)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
	<400> 36	
30	cgtacgcgga auactucgat t	21
	<210> 37	
	<211> 21	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
40	<221> característica misc	
	<222> (1)..(21)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	
	<220>	
45	<221> característica misc	
	<222> (1)..(1)	
	<223> modificación 5'-fosfato	
	<400> 37	
50	ucgaaguauu ccgcguacgu u	21
	<210> 38	
	<211> 21	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
60	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (1)..(18)	
	<223> ARN	
65		



<223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica misc  
 5 <222> (1)..(6)  
 <223> ARN  
 <220>  
 <221> característica misc  
 10 <222> (7)..(8)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar de tipo ANB que comprende un puente de 2' a 4'  
 <220>  
 <221> característica misc  
 15 <222> (9)..(18)  
 <223> ARN  
 <220>  
 <221> característica misc  
 20 <222> (19)..(19)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar de tipo ANB que comprende un puente de 2' a 4'  
 <220>  
 <221> característica misc  
 25 <222> (20)..(21)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 <400> 40  
 30 uuaauuaaaa gacuucaagc gg 22  
 <210> 41  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 40 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (1)..(14)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 45 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (15)..(19)  
 <223> ARN  
 50 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (20)..(21)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 55 <400> 41  
 gcttgaagtc ttttauuuat t 21  
 <210> 42  
 <211> 21  
 60 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 65

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (1)..(19)  
 <223> ARN  
 5

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (1)..(1)  
 <223> modificación 5'-fosfato  
 10

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (20)..(21)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 15

<400> 42  
 uuaauuaaag acuucaagcg g 21

<210> 43  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 25

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (1)..(1)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 30

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (2)..(2)  
 <223> ARN  
 35

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (3)..(3)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar de tipo ANB que comprende un puente de 2' a 4'  
 40

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (4)..(4)  
 <223> ARN  
 45

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (5)..(8)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 50

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (9)..(10)  
 <223> ARN  
 55

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (11)..(11)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar de tipo ANB que comprende un puente de 2' a 4'  
 60

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (12)..(13)  
 <223> ARN  
 65

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (14)..(15)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 5

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (16)..(16)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar de tipo ANB que comprende un puente de 2' a 4'  
 10

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (17)..(17)  
 <223> ARN  
 15

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (18)..(21)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 20

<400> 43  
 gcuugaaguc uuuaauaat t 21

<210> 44  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 30

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (1)..(1)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 35

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (2)..(2)  
 <223> ARN  
 40

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (3)..(3)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar de tipo ANB que comprende un puente de 2' a 4'  
 45

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (4)..(4)  
 <223> ARN  
 50

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (5)..(8)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 55

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (9)..(10)  
 <223> ARN  
 60

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (11)..(11)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar de tipo ANB que comprende un puente de 2' a 4'  
 65

	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (12)..(13)	
	<223> ARN	
5	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (14)..(14)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
10	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (15)..(15)	
	<223> ARN	
15	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (16)..(16)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
20	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (17)..(17)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar de tipo ANB que comprende un puente de 2' a 4'	
25	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (18)..(18)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
30	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (19)..(19)	
	<223> ARN	
35	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (20)..(21)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
40	<400> 44	
	gcuugaaguc uuuaatuaat t	21
	<210> 45	
	<211> 21	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
50	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (1)..(1)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
55	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (2)..(2)	
	<223> ARN	
60	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (3)..(3)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar de tipo ANB que comprende un puente de 2' a 4'	
65		

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (4)..(4)  
 <223> ARN  
 5  
 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (5)..(8)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 10  
 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (9)..(10)  
 <223> ARN  
 15  
 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (11)..(11)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar de tipo ANB que comprende un puente de 2' a 4'  
 20  
 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (12)..(13)  
 <223> ARN  
 25  
 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (14)..(15)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 30  
 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (16)..(17)  
 <223> ARN  
 35  
 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (18)..(21)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 40  
 <400> 45  
 gcuugaaguc uuuaauaat t 21  
 45  
 <210> 46  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (1)..(1)  
 55  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (2)..(2)  
 60  
 <223> ARN  
 <220>  
 <221> característica misc  
 <222> (4)..(4)  
 65  
 <223> ARN

	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (5)..(8)	
5	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (9)..(10)	
10	<223> ARN	
	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (11)..(11)	
15	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar de tipo ANB que comprende un puente de 2' a 4'	
	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (12)..(13)	
20	<223> ARN	
	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (14)..(14)	
25	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (15)..(15)	
30	<223> ARN	
	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (16)..(16)	
35	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (17)..(17)	
40	<223> ARN	
	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (18)..(18)	
45	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (20)..(21)	
50	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
	<400> 46	
	gcuugaaguc uuuaatuaat t	21
	<210> 47	
55	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (1)..(1)	
65	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	

ES 2 643 576 T3

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (2)..(2)  
 <223> ARN  
 5

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (3)..(3)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar de tipo ANB que comprende un puente de 2' a 4'  
 10

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (4)..(4)  
 <223> ARN  
 15

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (5)..(8)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 20

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (9)..(10)  
 <223> ARN  
 25

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (11)..(11)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar de tipo ANB que comprende un puente de 2' a 4'  
 30

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (12)..(13)  
 <223> ARN  
 35

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (14)..(14)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 40

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (15)..(19)  
 <223> ARN  
 45

<220>  
 <221> característica misc  
 <222> (20)..(21)  
 <223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa  
 50

<400> 47  
 gcuugaaguc uuuaauaat t 21

<210> 48  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 60

<400> 48  
 uguuauugcc aagcacuuaa a 21

<210> 49  
 <211> 21  
 65

- <212> ARN  
<213> Secuencia artificial
- 5 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético
- <400> 49  
uaagugcuug gcaauaacag a
- 10 <210> 50  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 15 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético
- 20 <220>  
<221> característica misc  
<222> (1)..(3)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 25 <220>  
<221> característica misc  
<222> (4)..(6)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 30 <220>  
<221> característica misc  
<222> (7)..(9)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 35 <220>  
<221> característica misc  
<222> (10)..(12)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 40 <220>  
<221> característica misc  
<222> (13)..(13)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 45 <220>  
<221> característica misc  
<222> (14)..(14)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 50 <220>  
<221> característica misc  
<222> (15)..(15)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 55 <220>  
<221> característica misc  
<222> (16)..(16)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- 60 <220>  
<221> característica misc  
<222> (17)..(17)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- 65 <220>  
<221> característica misc  
<222> (18)..(18)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa

21

	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (19)..(21)	
5	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
	<400> 50	
	tgtuautgcc aagcactuaa a	21
10	<210> 51	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> característica misc	
20	<222> (1)..(21)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa	
	<220>	
	<221> característica misc	
25	<222> (1)..(1)	
	<223> modificación 5'-fosfato	
	<400> 51	
	uaagugcuug gcaauaacag a	21
30	<210> 52	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
40	<221> característica misc	
	<222> (1)..(1)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
	<220>	
45	<221> característica misc	
	<222> (2)..(2)	
	<223> ARN	
	<220>	
50	<221> característica misc	
	<222> (3)..(3)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar de tipo ANB que comprende un puente de 2' a 4'	
	<220>	
55	<221> característica misc	
	<222> (4)..(4)	
	<223> ARN	
	<220>	
60	<221> característica misc	
	<222> (5)..(8)	
	<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa	
	<220>	
65	<221> característica misc	

ES 2 643 576 T3

- <222> (9)..(10)  
<223> ARN
- <220>  
5 <221> característica misc  
<222> (11)..(11)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar de tipo ANB que comprende un puente de 2' a 4'
- <220>  
10 <221> característica misc  
<222> (12)..(13)  
<223> ARN
- <220>  
15 <221> característica misc  
<222> (14)..(15)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- <220>  
20 <221> característica misc  
<222> (16)..(16)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar de tipo ANB que comprende un puente de 2' a 4'
- <220>  
25 <221> característica misc  
<222> (17)..(17)  
<223> ARN
- <220>  
30 <221> característica misc  
<222> (18)..(21)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-desoxi-2'-fluoroarabinosa
- <400> 52  
35 tguuattgcc aagcacutaa a 21
- <210> 53  
<211> 21  
<212> ARN  
40 <213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Oligonucleótido sintético
- <220>  
45 <221> característica misc  
<222> (1)..(21)  
<223> el nucleósido contiene una fracción azúcar 2'-fluororribosa
- <400> 53  
50 uuaauuaaag acuucaagcg g 21
- <210> 54  
<211> 21  
55 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Oligonucleótido sintético
- <220>  
60 <221> característica misc  
<222> (1)..(19)  
<223> ARN
- 65

	<220>	
	<221> característica misc	
	<222> (20)..(21)	
	<223> ADN	
5	<400> 54	
	gcuugauuuc ugaaauaat t	21
	<210> 55	
10	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> característica misc	
20	<222> (1)..(19)	
	<223> ARN	
	<220>	
	<221> característica misc	
25	<222> (20)..(21)	
	<223> ADN	
	<400> 55	
	uuauuuucag aaaucaagcg g	21
30	<210> 56	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> característica misc	
40	<222> (1)..(19)	
	<223> ARN	
	<220>	
	<221> característica misc	
45	<222> (1)..(1)	
	<223> modificación 5'-fosfato	
	<220>	
	<221> característica misc	
50	<222> (20)..(21)	
	<223> ADN	
	<400> 56	
	uuauuuuaag acuucaagcg g	21
55		

## REIVINDICACIONES

1. Un ARNip químicamente modificado que comprende un dúplex oligonucleotídico que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, cada una comprende respectivamente:
- 5
- (i) Sentido:  $[(2'F-AAN)_3(2'F-ARN)_3]_2 [(2'F-AAN)(2'F-ARN)]_3 (2'F-AAN)$   
 Antisentido:  $(ARN)_{19}$ ;
- (ii) Sentido:  $[(2'F-AAN)_3(2'F-ARN)_3]_2 [(2'F-AAN)(2'F-ARN)]_3 (2'F-AAN)$   
 Antisentido:  $(2'F-ARN)_{19}$ ;
- 10 (iii) Sentido:  $[(2'F-AAN)(2'F-ARN)]_9 (2'F-AAN)$   
 Antisentido:  $(ARN)_{19}$ ;
- (iv) Sentido:  $[(2'F-AAN)(2'F-ARN)]_9 (2'F-AAN)$   
 Antisentido:  $(2'F-ARN)_{19}$ ;
- (v) Sentido:  $[(2'F-AAN)_3(2'F-ARN)_3]_3 (2'F-AAN)$   
 Antisentido:  $(ARN)_{19}$ ; o
- 15 (vi) Sentido:  $[(2'F-AAN)_3(2'F-ARN)_3]_3 (2'F-AAN)$   
 Antisentido:  $(2'F-ARN)_{19}$ ,
- en donde el ARNip tiene actividad ARNip.
- 20
2. El ARNip químicamente modificado de la reivindicación 1, en donde el dúplex está completamente modificado con uno o más residuos de 2'F-ARN y 2'F-AAN.
3. El ARNip químicamente modificado de la reivindicación 1, en donde el dúplex comprende una extensión.
- 25
4. El ARNip químicamente modificado de la reivindicación 3, en donde la extensión es una extensión de 1 a 5 residuos.
5. El ARNip químicamente modificado de la reivindicación 4, en donde la extensión es una extensión de 2 residuos.
- 30
6. El ARNip químicamente modificado de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde la extensión comprende residuos de ADN, 2'F-AAN y/o 2'F-ARN.
- 35
7. El ARNip químicamente modificado de la reivindicación 6, en donde la extensión comprende dos residuos de 2'F-AAN.
8. El ARNip químicamente modificado de la reivindicación 7, en donde la extensión comprende dos residuos de 2'F-AAN en la hebra sentido.
- 40
9. El ARNip químicamente modificado de la reivindicación 7, en donde la extensión comprende dos residuos de 2'F-AAN en la hebra antisentido.
10. El ARNip químicamente modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la hebra sentido y la hebra antisentido tienen una longitud de 19 a 23 residuos de nucleótidos.
- 45
11. Una composición farmacéutica que comprende el ARNip químicamente modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, junto con un excipiente o soporte farmacéuticamente aceptable.
- 50
12. Uso del ARNip químicamente modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o la composición farmacéutica de la reivindicación 11 para degradar o disminuir el nivel de un ácido nucleico diana, o para disminuir la producción de un polipéptido codificado por dicho ácido nucleico diana, en una célula, en donde la hebra sentido del ARNip químicamente modificado comprende una secuencia de nucleobases sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleobases del ácido nucleico diana.
- 55
13. El ARNip químicamente modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o la composición farmacéutica de la reivindicación 11 para uso en prevenir o tratar una enfermedad o afección asociada con la expresión de un ácido nucleico diana, o de un polipéptido codificado por dicho ácido nucleico diana, en un sujeto, en donde la hebra sentido del ARNip químicamente modificado comprende una secuencia de nucleobases sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleobases del ácido nucleico diana.
- 60
14. Un método *in vitro* de degradar o disminuir la expresión de un ácido nucleico diana, o de disminuir el nivel de un polipéptido codificado por dicho ácido nucleico diana, en una célula, el método comprende poner en contacto la célula con el ARNip químicamente modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o la composición farmacéutica de la reivindicación 11, en donde la hebra sentido del ARNip químicamente
- 65

modificado comprende una secuencia de nucleobases sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleobases del ácido nucleico diana.

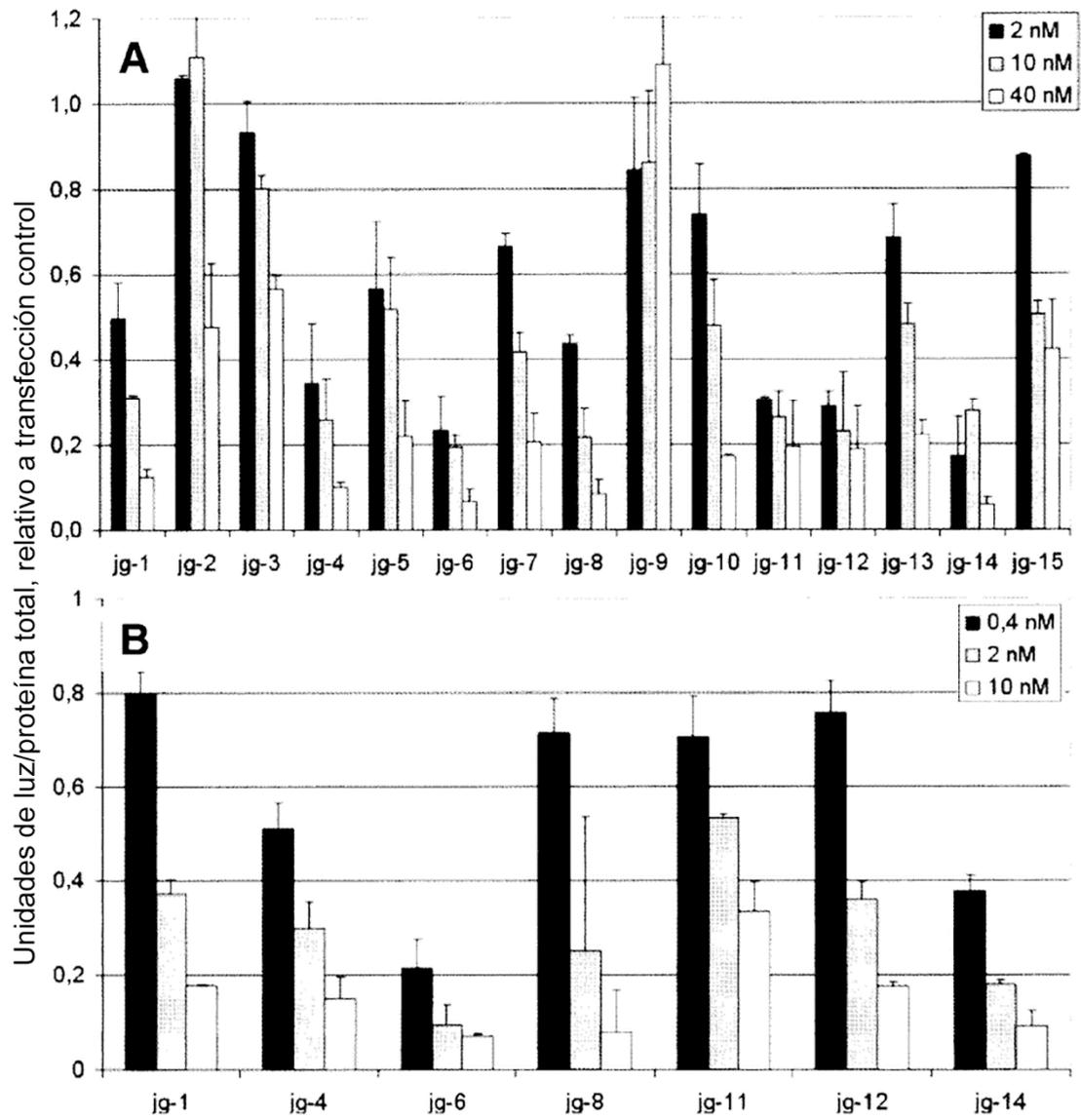


Fig. 1

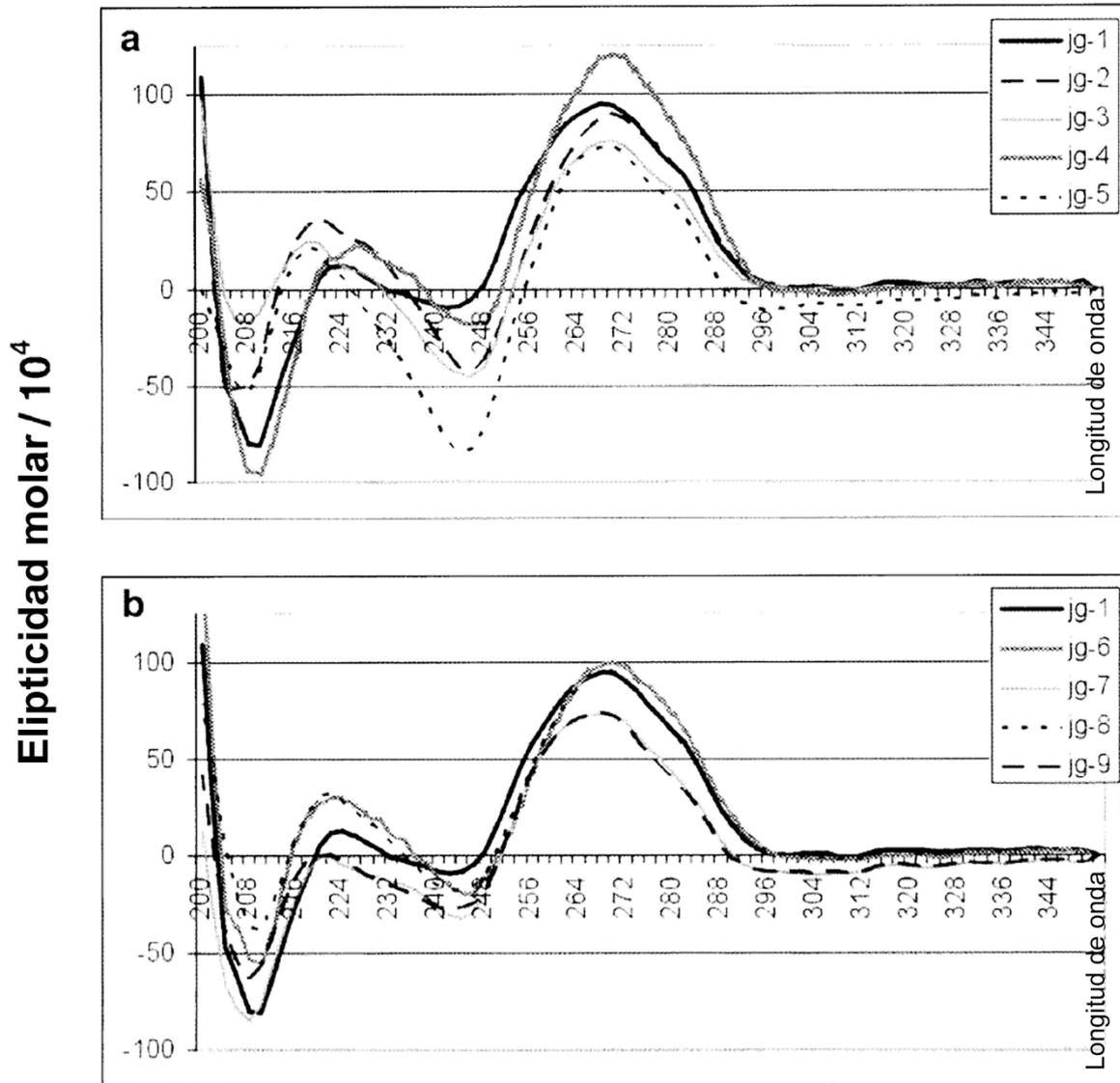
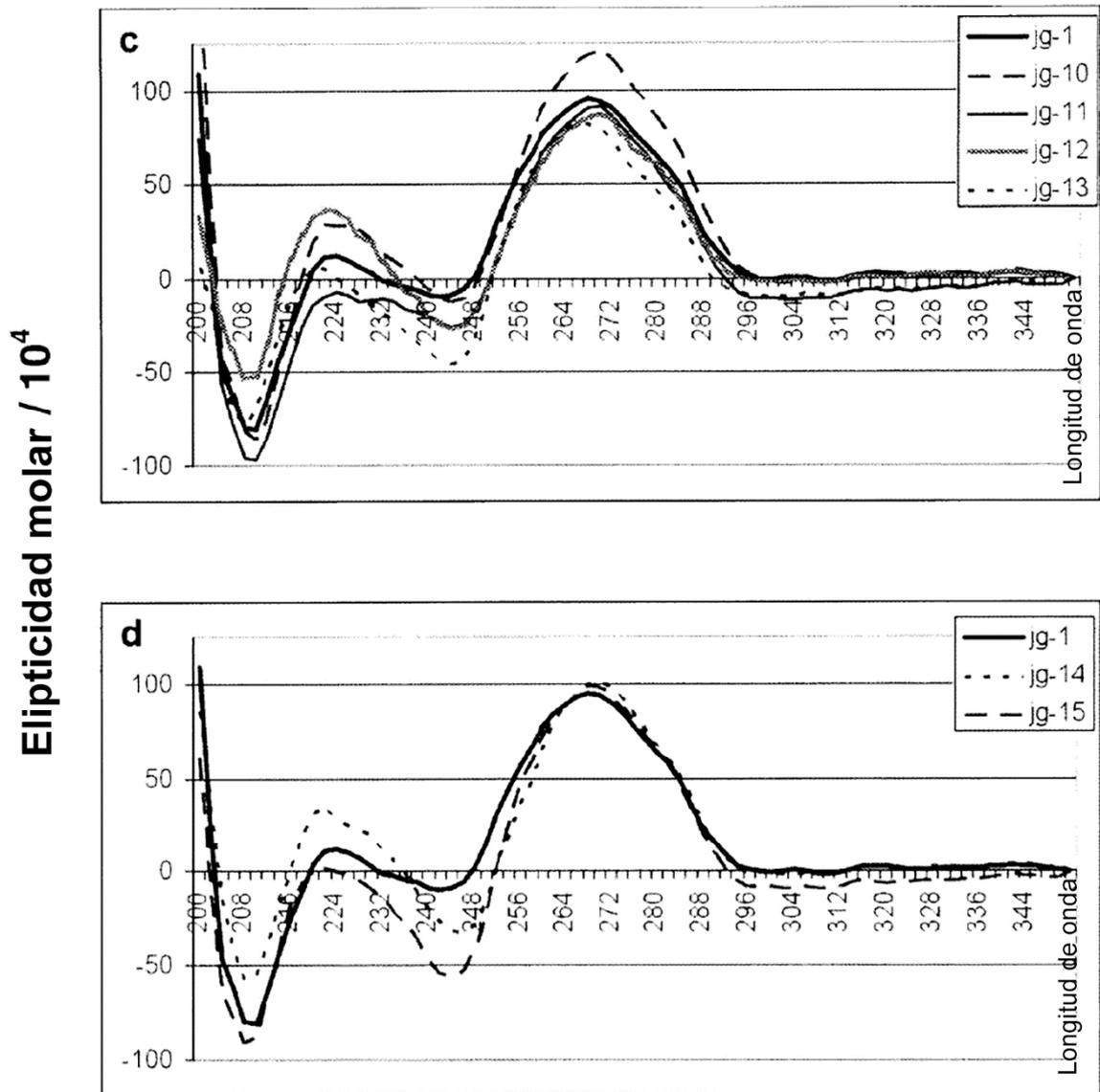
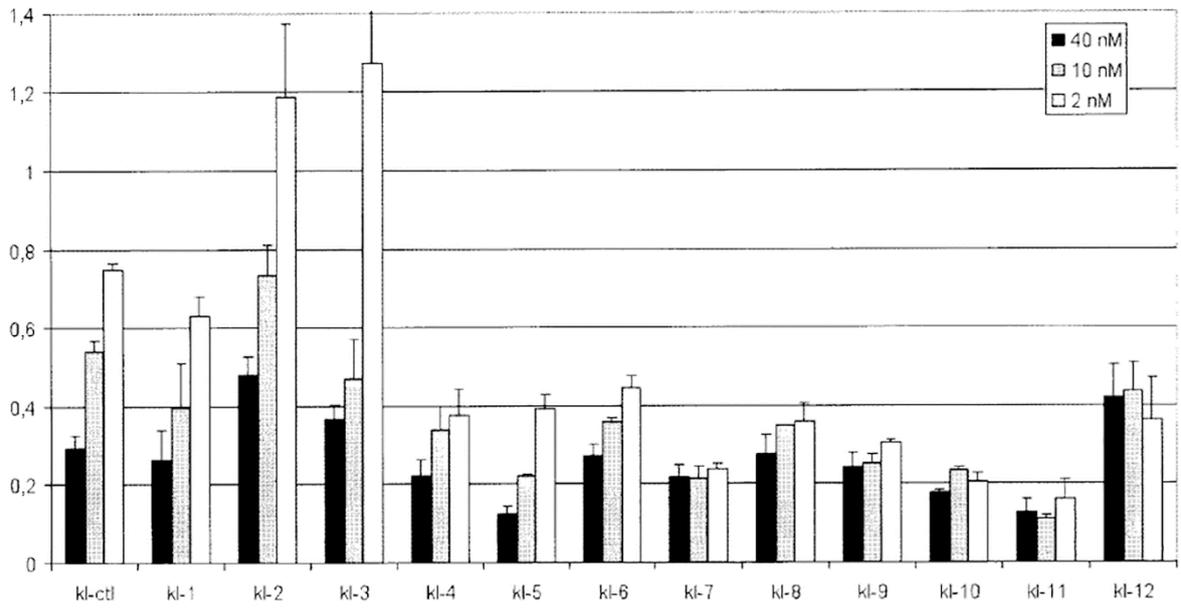


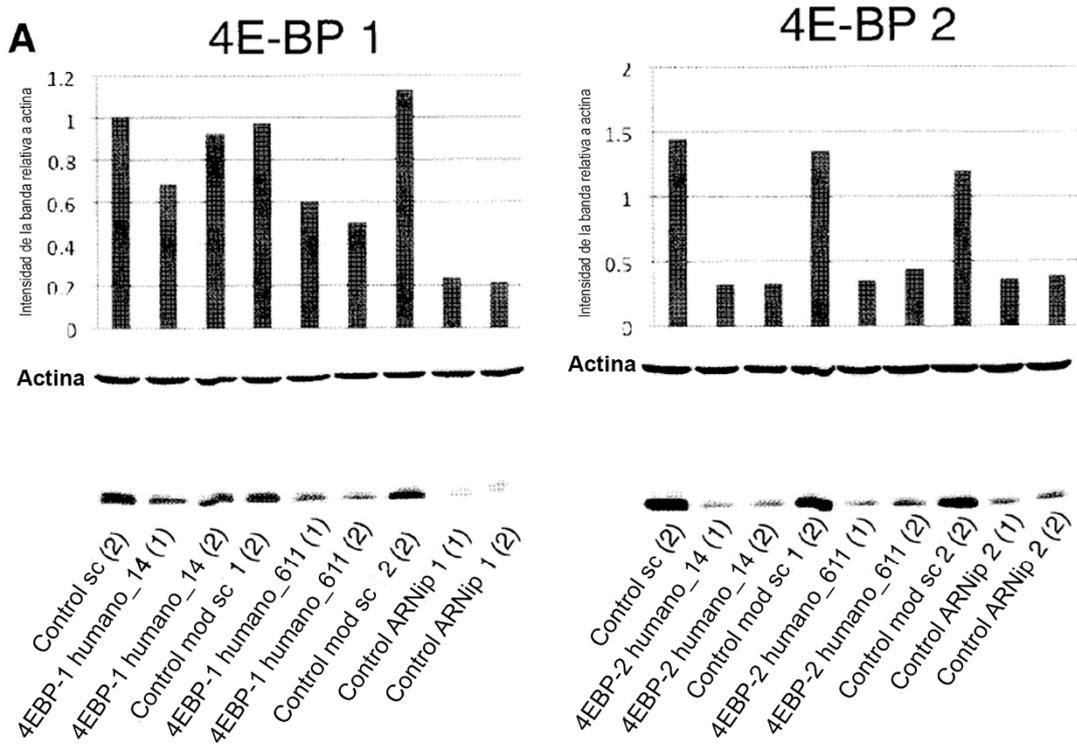
Fig. 2



**Fig. 2 (continuación)**

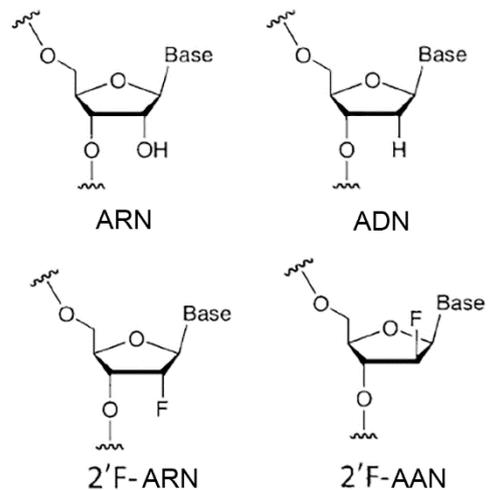


**Fig. 3**



Secuencias de ARNip dirigidas a ARNm humano	
<b>4EBP1</b>	
Control sin modificar 4EBP1 humano (Control ARNip 1)	5' AACUCACCUUGACCAAACA 3' ccUUGAGUGGACACUGUUUU
4EBP-1 humano_14	5' AACTCACCTGTGACCAAACA 3' CCUUGAGUGGACACUGUUUU
4EBP-1 humano_611	5' AACUCACCTGUGACCAAACA 3' CCUUGAGUGGACACUGUUUU
<b>4EBP2</b>	
Control sin modificar 4EBP-2 humano (Control ARNip 2)	5' AAGACUCCAAGUAGAAGUaa 3' acUUCUGAGGUUUAUCUUCA
4EBP-2 humano_14	5' AAGACTCCAAGTAGAAGTAA 3' ACUUCUGAGGUUUAUCUUCa
4EBP-2 humano_611	5' AAGACUCCAAGTAGAAGTAA 3' ACUUCUGAGGUUUAUCUUCa
<b>Mezclado</b>	
Control mezclado (sc)	5' GCUUGAUUUCUGAAAUUAatt 3' ggCGAACUAAAGACUUAUU
Control modificado mezclado (sc) 1	5' GCTTGAAGTCITTAATTAATT 3' GGCGAACUUCAGAAAUUAUU
Control modificado mezclado (sc) 2	5' CGTACGCGAAUACTUCGATT 3' UUGCAUGCGCCUUAUGAAGCu

**Leyenda**  
 ARN  
 Adn  
 2'F-AAN  
 2'F-ARN



**Fig. 4**

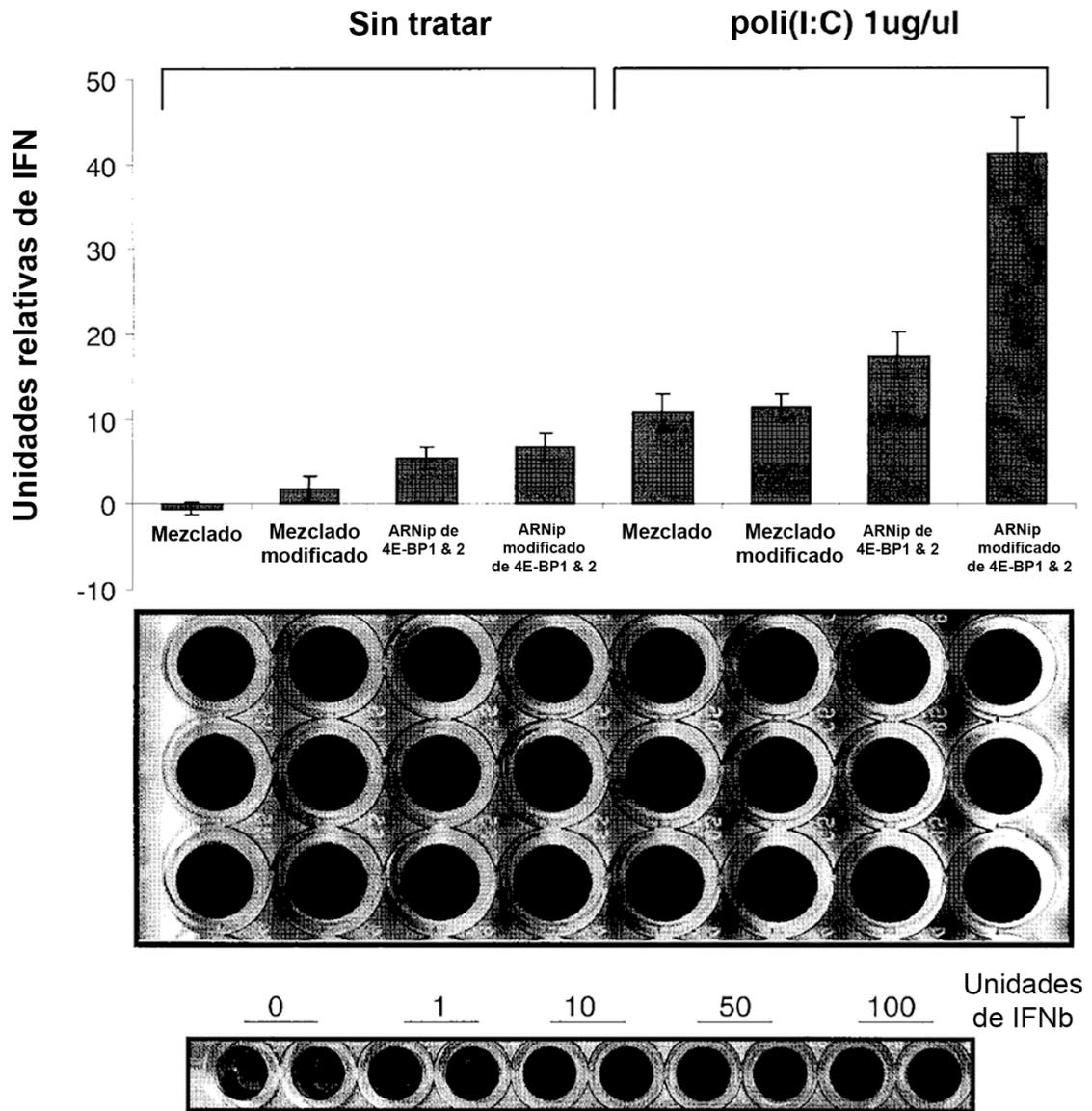
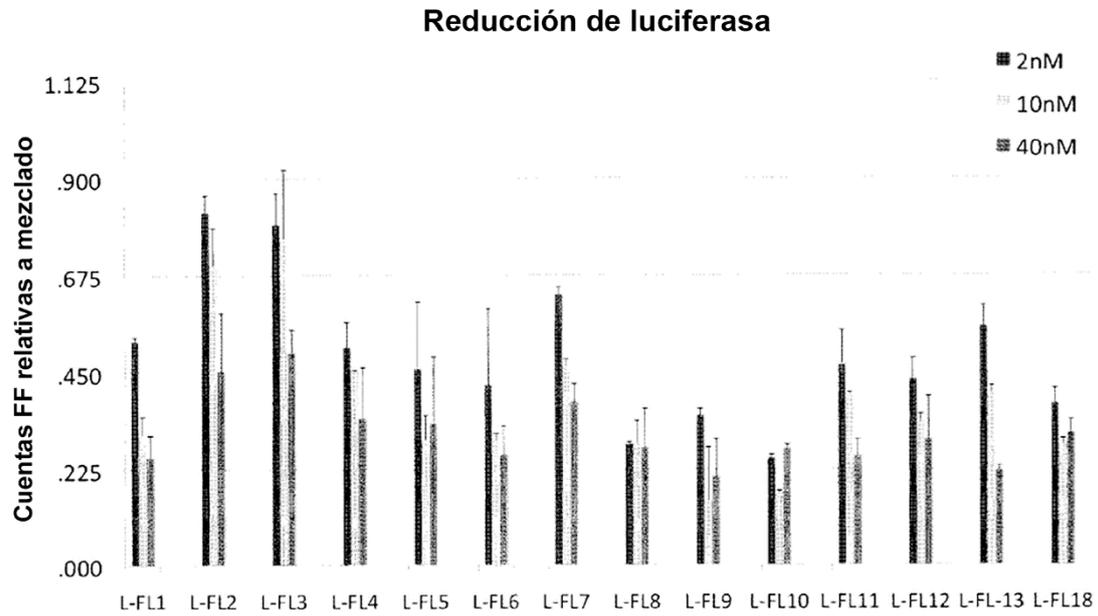
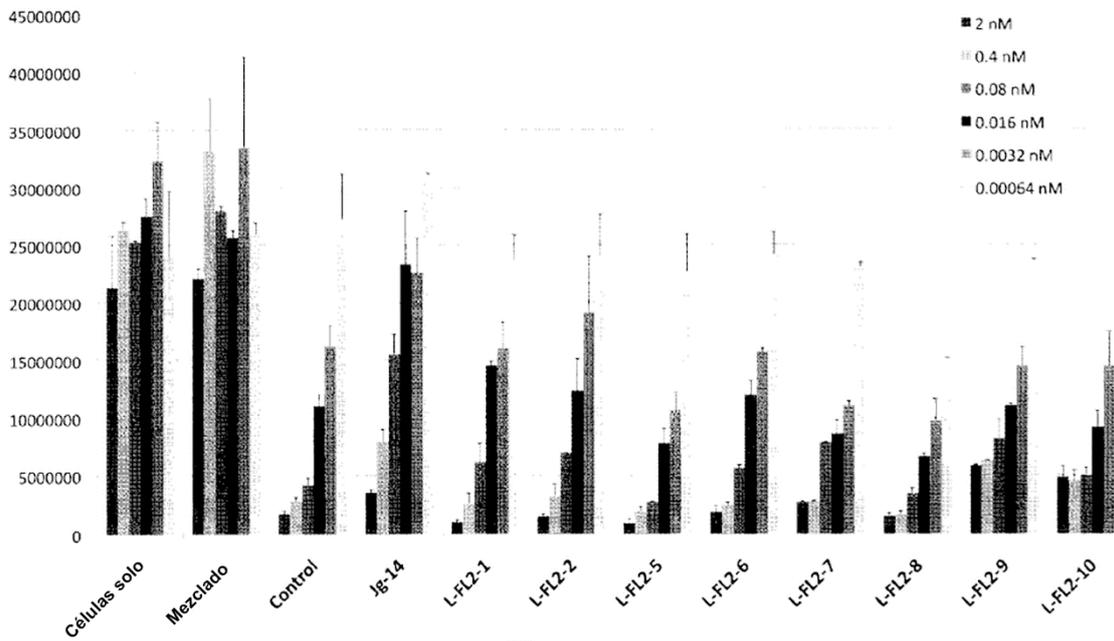


Fig. 5



**Fig. 6**



**Fig. 7**

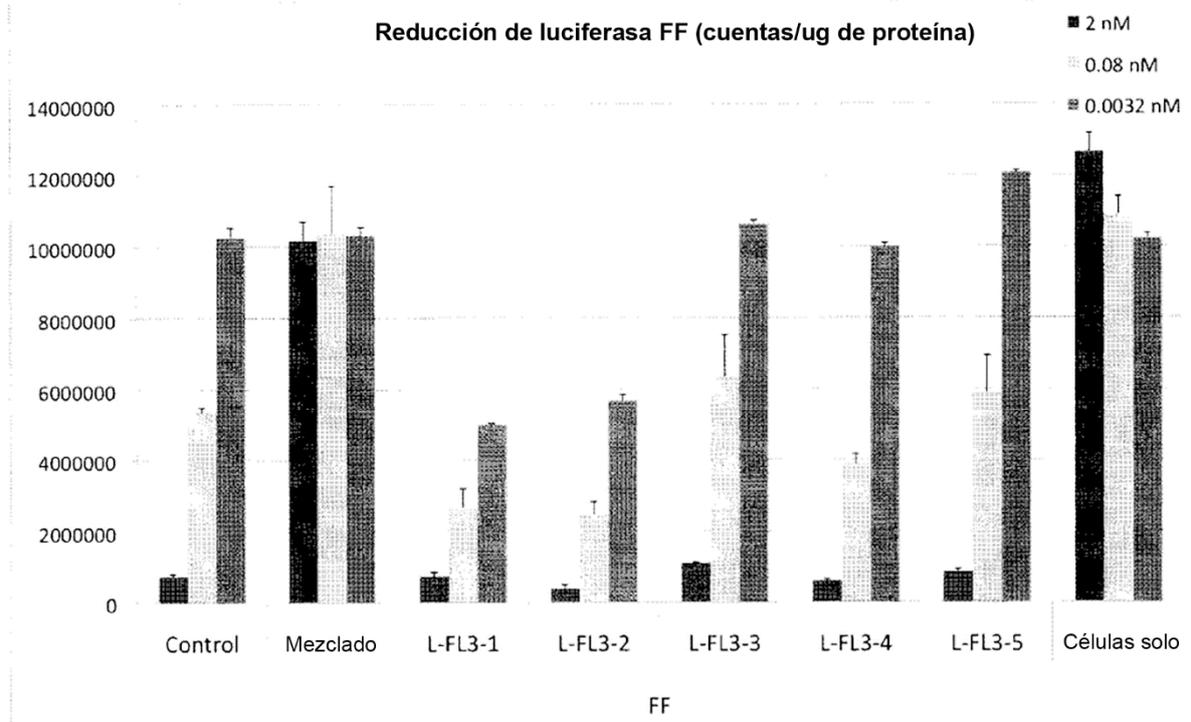
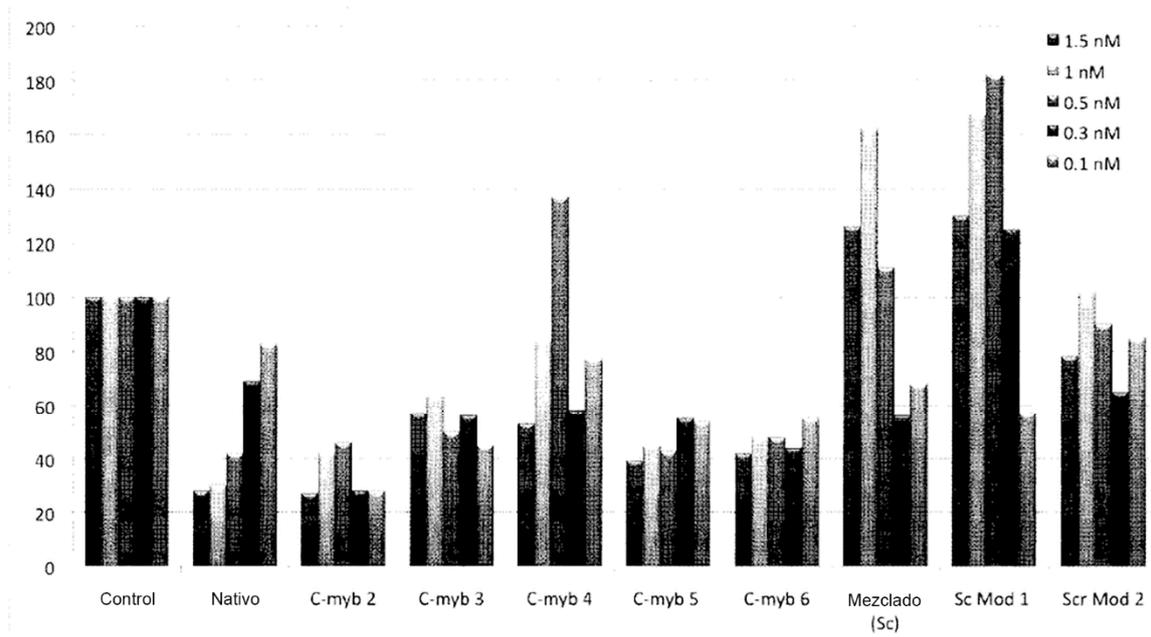
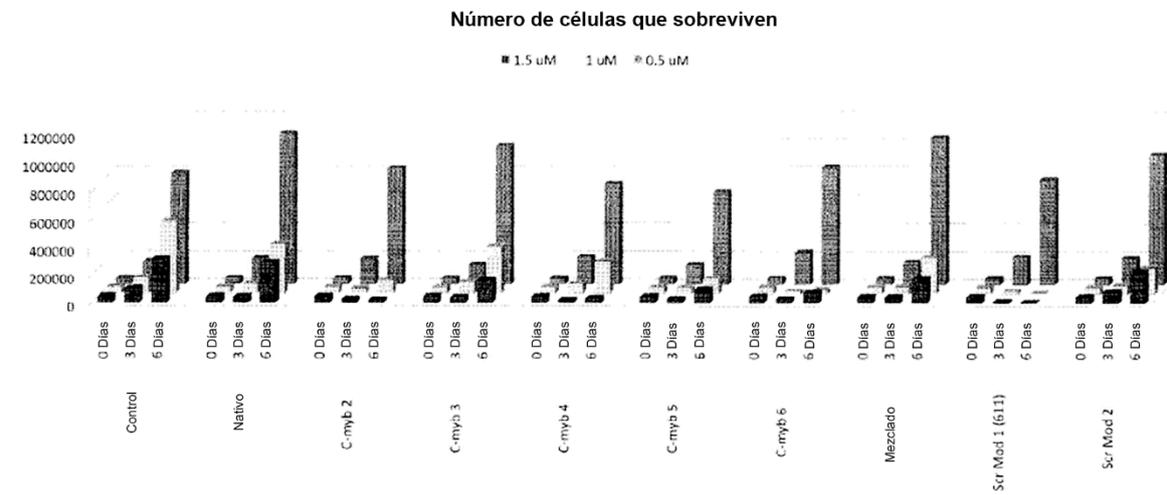


Fig. 8

**A**



**B**



**Fig. 9**