

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 277**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2014 PCT/JP2014/002882**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014 WO14192310**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2014 E 14804901 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 3004347**

54 Título: **Agentes de doble cadena para el suministro de oligonucleótidos terapéuticos**

30 Prioridad:

**30.05.2013 US 201361829239 P**

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

**14.02.2019**

73 Titular/es:

**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO  
MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY (100.0%)  
5-45 Yushima 1-chome Bunkyo-ku  
Tokyo 113-8510, JP**

72 Inventor/es:

**YOKOTA, TAKANORI;  
NISHINA, KAZUTAKA;  
YOSHIOKA, KOTARO y  
MIZUSAWA, HIDEHIRO**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 700 277 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

Agentes de doble cadena para el suministro de oligonucleótidos terapéuticos

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a un agente ácido nucleico de doble cadena útil para el suministro de oligonucleótidos de doble cadena a una célula, tal como en una muestra biológica o en un paciente. Los oligonucleótidos terapéuticos pueden incluir oligonucleótidos antisentido, antagomires, oligonucleótidos de conmutación de corte y empalme, ARNip de cadena sencilla, microARN, pre-microARN, y similares. El oligonucleótido terapéutico es una parte constituyente de una de las cadenas del agente de doble cadena, y se libera, al menos en parte por la acción de enzimas o por la curvatura de la estructura de doble cadena. Los oligonucleótidos terapéuticos se pueden utilizar para cualquiera de los fines conocidos para dichos oligonucleótidos que incluyen, por ejemplo, la modificación de los niveles de transcripción de ARN o los niveles proteicos en las células.

15 **Técnica antecedente**

En años recientes, los oligonucleótidos han sido un sujeto de interés en el desarrollo en curso de productos farmacéuticos llamados fármacos de ácido nucleico, y particularmente, desde el punto de vista de su alta selectividad para el gen diana y baja toxicidad, el desarrollo de fármacos de ácido nucleico que utilizan un método antisentido está en marcha activamente. El método antisentido incluye métodos de modificación o inhibición selectivas de la expresión de una proteína que está codificada por un gen diana, introduciendo en una célula un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido, o ASO) que es complementario de una secuencia parcial del ARNm (cadena en sentido) de un gen diana. De manera similar, los métodos antisentido también se dirigen al miARN y operan para modificar la actividad de dicho miARN.

Como se ilustra en la FIG. 1 (parte superior), cuando un oligonucleótido comprende un ARN se introduce en una célula como un ASO, el ASO se une a un producto de transcripción (ARNm) del gen diana, y se forma una doble cadena parcial. Se sabe que esta doble cadena tiene un papel como una cubierta que evita la traducción en un ribosoma, y por lo tanto se inhibe la expresión de la proteína codificada por el gen diana.

Por otra parte, cuando se introduce un oligonucleótido que comprende un ADN en una célula como un ASO, se forma un heterodúplex parcial ADN-ARN. Debido a que esta estructura es reconocida por la RNasa H, y de esta manera el ARNm del gen diana se descompone, la expresión de la proteína codificada por el gen diana se inhibe (FIG. 1 parte inferior). En muchos casos, el efecto supresor de la expresión genética es mayor cuando se utiliza el ADN como un ASO (ruta dependiente de RNasa H), en comparación con el caso de utilizar un ASO ARN.

Cuando se utiliza un oligonucleótido como un fármaco de ácido nucleico, se han desarrollado distintos análogos de ácido nucleico tal como un Ácido Nucleico Bloqueado (LNA) (marca registrada), otros ácidos nucleicos puenteados (BNA), y similares, para aumentar la afinidad de unión a un ARN diana y la estabilidad *in vivo*.

Como se ilustra en la FIG. 2, aunque el resto de azúcar de un ácido nucleico natural (ARN o ADN) tiene un anillo de cinco miembros con cuatro átomos de carbono y un átomo de oxígeno, el resto de azúcar tiene dos tipos de conformaciones, una forma N y una forma S. Se sabe que estas conformaciones oscilan de una a la otra, y de esta manera, la estructura helicoidal del ácido nucleico también adopta diferentes formas, una forma A y una forma B. Aunque el ARNm que sirve como diana del ASO mencionado anteriormente adopta una estructura helicoidal en la forma A, estando el resto de azúcar principalmente en forma N, es importante para el resto de azúcar del ASO adoptar la forma N desde el punto de vista de aumentar la afinidad para el ARN. Un producto que se ha desarrollado bajo este concepto es un ácido nucleico modificado tal como un LNA (ácido nucleico puenteado con 2'-O, 4'-C-metileno (2',4'-BNA)). Por ejemplo, en el LNA como el oxígeno en la posición 2' y el carbono en la posición 4' están puenteados por un grupo metileno, la conformación se fija en forma N, y no hay más fluctuación entre las conformaciones. Por lo tanto, un oligonucleótido sintetizado por incorporación de varias unidades de LNA tiene una afinidad muy alta para el ARN y una especificidad de secuencia muy alta, y también presenta una resistencia excelente al calor y resistencia a nucleasa, en comparación con los oligonucleótidos sintetizados con los ácidos nucleicos naturales convencionales (véase, Documento Patente 1). Aunque otros ácidos nucleicos artificiales también tienen dichas características se ha prestado mucha atención a los ácidos nucleicos artificiales en conexión con la utilización de un método antisentido y similares (véase, los Documentos Patentes 1 a 9).

No obstante, los diseños de oligonucleótidos antisentido que utilizan incluso estos ácidos nucleicos modificados de altas prestaciones siguen careciendo de la eficacia, potencia y/o seguridad adecuadas para utilizarlos como agentes terapéuticos.

Un problema técnico que limita el uso de oligonucleótidos terapéuticos es la incapacidad para suministrar eficazmente el agente en un sitio en el que desencadene un efecto. Para algunos tipos de oligonucleótidos terapéuticos, el suministro directo del propio agente puede alcanzar el sitio de actividad, pero en general se necesitan grandes dosis y eso compromete la seguridad. Las razones del suministro ineficaz pueden incluir la inestabilidad metabólica, el

transporte ineficaz e interacciones no específicas de atrapamiento o unión que secuestran los agentes. Otros tipos, tal como los dúplex de ARN corto de interferencia (ARNip), necesita formulaciones lipídicas complejas para el suministro, pero se ha informado que son caras, difíciles de preparar, y tienen algunos efectos secundarios tóxicos (Documento No patente 1). Por lo tanto, existe la necesidad reconocida de métodos más eficaces para el suministro de oligonucleótidos terapéuticos a las células y tejidos en una muestra biológica o en un paciente.

Además, cuando se utiliza un oligonucleótido antisentido como un fármaco, para algunas aplicaciones también es importante también que el oligonucleótido se pueda suministrar en un sitio diana con alta especificidad y alta eficacia. Los métodos de suministro de un oligonucleótido incluyen la utilización de lípidos tales como el colesterol y la vitamina E (Documentos No patente 2 y 3), utilizando un péptido específico de receptor tal como el RVG-9R (Documento No patente 4), o utilizando un anticuerpo específico del sitio diana (Documento No patente 5). El documento WO2005/111238A1 PTL(10) describe métodos para modular el suministro intracelular del agente terapéutico, incluyendo los oligonucleótidos terapéuticos utilizando aptámeros de ácidos nucleicos.

## 15 Lista de citas

### Bibliografías de patentes

PTL1: JP 10-304889 A  
 20 PTL 2: WO 2005/021570  
 PTL3: JP 10-195098 A  
 PTL 4: JP 2002-521310 W  
 PTL 5: WO 2007/143315  
 PTL 6: WO 2008/043753  
 25 PTL7: Documento de Patente 7: WO 08/029619  
 PTL 8: WO 2003/011887  
 PTL 9: WO 2007/131238  
 PTL10: WO2005/111238A1.

### 30 Bibliografía de no patentes

NPL 1: Walt F. Lima et al., Cell, Vol. 150, 883-894 (2012)  
 NPL 2: Kazutaka Nishina et al., Molecular Therapy, Vol. 16, 734-740 (2008)  
 NPL 3: Jurgen Soutscheck et al., Nature, Vol. 432, 173-178 (2004)  
 35 NPL 4: Kazutaka Nishina et al, Molecular Therapy, Vol. 16, 734-740 (2008)  
 NPL 5: Dan Peer et al, Science, Vol. 319, 627-630 (2008)

### Sumario de la invención

#### 40 Problema técnico

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un agente de ácido nucleico de doble cadena que pueda suministrar un oligonucleótido terapéutico.

#### 45 Solución al problema

Se proporciona un agente de ácido nucleico de doble cadena como se define en las reivindicaciones. El agente de ácido nucleico de cadena dobla puede suministrar un oligonucleótido terapéutico y comprende una primera y una segunda cadena, en el que el oligonucleótido terapéutico es una parte de la primera cadena. El oligonucleótido generalmente es un agente de cadena sencilla, pero puede ser una construcción de doble cadena o en horquilla. El oligonucleótido terapéutico se diseña en algunas realizaciones para desencadenar un efecto antisentido. Por ejemplo, el efecto antisentido puede dirigirse contra un producto de transcripción codificante de una proteína o codificante de no-proteínas. El agente de ácido nucleico de doble cadena puede aplicarse por lo tanto para cambiar la concentración o nivel de actividad del producto de transcripción dirigido. En algunas realizaciones, el agente se puede utilizar para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o afección en un paciente que se caracteriza por tener un nivel anormal del producto de transcripción.

Como se muestra en la FIG. 3A y 3B, la primera cadena comprende la región del oligonucleótido terapéutico y una primera región complementaria. La primera región complementaria es complementaria de una parte o toda la segunda cadena. La segunda cadena comprende una segunda región complementaria. La segunda región complementaria es complementaria de una parte o toda la primera región complementaria, y opcionalmente puede ser complementaria de una parte de la región terapéutica. No se necesita, sin embargo, que la primera región complementaria sea completamente complementaria, o tenga el mismo número de bases que la segunda región complementaria. La región del oligonucleótido terapéutico se puede unir al extremo 3' de la región complementaria de la primera cadena como se muestra en la Fig. 3A y 3B, o al extremo 5' de la región complementaria de la primera cadena como se muestra en la Fig. 5. Preferentemente, la región de oligonucleótido terapéutico se puede unir al extremo 5' de la región

complementaria de la primera cadena.

Los agentes de ácidos nucleicos de doble cadena pueden comprender adicionalmente un resto funcional, como se muestra en la FIG. 3B. El resto funcional (x) puede ser un marcador de detección, una molécula de suministro o de direccionamiento, o un marcador de purificación. Uno o más de dichos restos, de una o más de dichas categorías pueden unirse al agente de ácido nucleico de doble cadena. En algunos aspectos dichos restos se unen en la posición terminal, en el extremo 3' o el 5' de una cadena de ácido nucleico. En otros aspectos un resto se puede unir en una posición interna. Un resto también se puede unir a una cadena mediante un enlazador escindible. En algunos aspectos uno o más restos funcionales aumentan el suministro del agente de ácido nucleico de doble cadena a un sitio diana con alta especificidad y alta eficacia. Los agentes de ácido nucleico de doble cadena de acuerdo con la presente invención comprenden un resto de marcado como se expone en las reivindicaciones.

La segunda cadena puede estar compuesta de un tipo de nucleótido o análogo de nucleótidos (colectivamente, "base"), o puede estar compuesto por dos o más tipos de bases. Cuando esté compuesto por dos o más tipos, las bases se pueden disponer en una estructura de oligómero con huecos o un oligómero mixto. Por ejemplo, como oligómero con huecos, la segunda cadena se puede disponer para que tenga una región central que consista en al menos 4 nucleótidos de ADN consecutivos, una primera ala de región 5' que comprenda al menos dos análogos de nucleótido localizados en el lado del extremo 5' de la región central y una primera ala de región 3' con al menos dos análogos de nucleótido localizados en el lado del extremo 3' de la región como se describe con respecto a la cadena antisentido en el documento PCT/JP2012/083180, titulado "Chimeric Double-Stranded Nucleic Acid". Por ejemplo, como oligómero mixto, la segunda cadena puede estar dispuesta para que no tenga una región que consiste en 4 o más nucleótidos ADN consecutivos. La cadena puede estar compuesta también de nucleótidos o análogos de nucleótidos que se disponen en una estructura de doble ala, tal como se desvela en la Solicit. Provisional de EE. UU. N.º 61/771.115, en trámite junto con la presente y de propiedad común, titulada "Chimeric Single-Stranded Antisense Polynucleotides", y la Solicit. Provisional de EE. UU. N.º 61/806.887, titulada "Double-Stranded Antisense Agents" Por ejemplo, como estructura de doble ala, la segunda cadena puede disponerse para que comprenda:

una región de nucleótidos central que comprenda al menos 4 nucleótidos ADN;  
 una primera ala de la región 5' unida al extremo 5' de la región central de nucleótidos que comprende 1-10 nucleótidos en los que al menos 1 es un análogo de nucleótido,  
 una primera ala de la región 3' unida al extremo 3' de la región central de nucleótidos que comprenda 1-10 nucleótidos en los que al menos 1 es un análogo de nucleótido; y  
 una segunda ala de la región 5' y/o una segunda ala de la región 3', en las que:

la segunda ala de la región 5' está unida al extremo 5' de la primera ala de la región 5', tiene una mayor resistencia a la DNasa o la RNasa que un ADN o ARN naturales y se omite en una célula cuando se suministra el polinucleótido quimérico; y  
 la segunda ala de la región 3' se une al extremo 3' de la primera ala de la región 3', tiene mayor resistencia a la DNasa o RNasa que un ADN o ARN naturales. La segunda cadena puede comprender también unidades de ácido nucleico peptídico (PNA) en todo o en parte. La propia segunda cadena puede ser un oligonucleótido antisentido.

En general, la segunda cadena se diseña para ser resistente a la degradación por nucleasa, o más generalmente, la degradación metabólica cuando se ponen en una muestra biológica (células, tejido, animal, ser humano, etc.).

La primera cadena puede estar compuesta de un tipo de nucleótido o análogo de nucleótido (colectivamente, "base"), o puede estar compuesta por dos o más tipos de bases. Como se señala, la primera cadena comprende una primera región complementaria y una región de oligonucleótido terapéutico. Estas regiones se llaman simplemente por conveniencia de manera de hacer referencia a cada parte de la cadena. Algunos nucleótidos y/o análogos de nucleótidos pueden ser parte o ambas regiones. Por lo tanto, las regiones pueden "solaparse" en el que una base particular es complementaria a una base de la segunda cadena, pero también es parte del oligonucleótido terapéutico. Por ejemplo, como se ilustra en las FIG. 4A-4F, el oligonucleótido terapéutico puede no tener solapamientos con la segunda cadena (FIG. 4A), o la región del oligonucleótido terapéutico podría emparejarse como una base con alguno o incluso más de la mitad de la segunda cadena (FIG. 4B-4F).

Considerando solo la primera región complementaria de la primera cadena, cuando está compuesta de dos o más tipos de nucleótidos o análogos de nucleótido, las bases se pueden disponer en una estructura de oligómero con huecos u oligómero mixto. Por ejemplo, como oligómero con huecos, la primera región complementaria se puede disponer para tener una región central que comprende al menos 4 nucleótidos ARN consecutivos, una primera ala de la región 5' y una primera ala de la región 3' como se ha descrito con la cadena en sentido del documento PCT/JP2012/083180, titulado "Chimeric Double-Stranded Nucleic Acid".

- 5 Considerando solo la región de oligonucleótido terapéutico de la primera cadena, esta región puede comprender cualquier tipo de agente de ácido nucleico terapéutico. Ejemplos particulares incluyen oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos antagomir, oligonucleótidos conmutadores de corte y empalmen, oligonucleótidos de ARNip de cadena sencilla, oligonucleótidos ARNip de doble cadena, microARN, pre-microARN, y aptámeros. Estos agentes se pueden preparar con cualquiera de las estructuras y diseños conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden emplear nucleótidos o análogos de nucleótido particulares que se pueden incorporar en la estructura, o la disposición de diferentes tipos de bases en disposiciones de oligómero con huecos, oligómero mixto, ala sencilla o ala doble.
- 10 En algunas reislamizaciones, la primera región complementaria se diseña para que sea resistente a la degradación por nucleasas, o más generalmente, la degradación, cuando se pone en una muestra biológica (células, tejido, animal, ser humano, etc.). Por ejemplo, la primera región complementaria puede comprender bases (nucleótidos modificados o análogos de nucleótidos) que son más resistentes a la escisión por nucleasas que las bases naturales, o puede comprender un PNA. Cuando la primera región complementaria se diseña para que sea resistente a la degradación por nucleasas, esta región se mantendrá generalmente conectada con el oligonucleótido terapéutico en los métodos desvelados en el presente documento. En este caso, cuando se hace referencia a la liberación del oligonucleótido terapéutico, se puede entender apropiadamente que significa la liberación de la primera cadena (el oligonucleótido terapéutico conectado con la primera región complementaria).
- 15 La primera región complementaria de la presente invención se diseña para que sea susceptible a la escisión por la RNasa H cuando se hibrida la primera cadena con la segunda cadena. Por lo tanto, al menos una parte de la primera región complementaria y la segunda región complementaria se diseñan para ser reconocidas por la RNasa H cuando están hibridadas como un dúplex. En general, para este fin la primera cadena comprende nucleótidos ARN y la segunda cadena comprende nucleótidos ADN con el fin de formar un heterodúplex. En algunas realizaciones, la primera región complementaria comprende 2, 3, 4, o 5 o más bases de ARN naturales consecutivas, que pueden opcionalmente flanquearse en uno o ambos lados por nucleótidos de ARN modificados. La parte de la segunda región complementaria que es complementaria de dicha primera región complementaria puede comprender ADN natural, ADN modificado, análogos de ADN, u otra de dichas bases que promueven el reconocimiento de la estructura de heterodúplex y la escisión de la primera cadena.
- 20 La región de oligonucleótido terapéutico se diseña adicionalmente para que sea resistente a la degradación por nucleasas o más en general, la degradación metabólica, cuando se pone en una muestra biológica (una célula, tejido, animal, ser humano, etc.). Por ejemplo, la región del oligonucleótido terapéutico puede comprender bases (nucleótidos modificados o análogos de nucleótido) que son más resistentes a la escisión por nucleasas que las bases naturales, o puede comprender un PNA. En particular, la región del oligonucleótido terapéutico se diseña en general para tener al menos 1, 2, 3, o al menos 4 bases en la parte del extremo 3' o 5' de la región que son más resistentes a la escisión o degradación que las bases naturales. Como se ha señalado anteriormente, algunas de estas bases de una de las partes terminales pueden ser parte de la primera región complementaria.
- 25 Cuando la primera región complementaria contiene algunas bases que son susceptibles a la escisión o degradación, tal como por una RNasa H, y se produce una reacción de escisión, la parte de la primera cadena que contiene la región del oligonucleótido terapéutico puede contener aún una parte de la primera región complementaria. Algunas de estas bases que eran parte de la primera región complementaria puede ser susceptible de reacciones de escisión o degradación adicionales. Por ejemplo, dichas bases pueden someterse a escisión por exonucleasas. Incluso si dichas bases pueden estar presentes se pueden eliminar en el ambiente de la muestra, pero se espera que la presencia de bases en la parte terminal de la región de nucleótido terapéutico que sean más resistentes a la escisión o degradación que las bases naturales eviten la escisión o degradación de los oligonucleótidos terapéuticos, tal como por la acción adicional de las exonucleasas.
- 30 En otras realizaciones más, pueden incluirse nucleótidos o análogos adicionales añadiéndolos al extremo 5', y el extremo 3', o en ambos extremos de la primera o la segunda cadena, y/o en uno o ambos extremos de la región del oligonucleótido terapéutico, que presentan resistencia a nucleasas y baja afinidad de unión por proteínas y componentes celulares tipo proteínas.
- 35 Los inventores han determinado que el agente de ácido nucleico de doble cadena, cuando se introduce en una célula, puede liberar el oligonucleótido terapéutico, que entonces pueden actuar, por ejemplo, para modificar la actividad o función de un producto de transcripción. El producto de transcripción puede ser un producto de transcripción que codifica una proteína o un producto que no codifica una proteína tal como un miARN. La solicitud contempla adicionalmente métodos y composiciones para su uso en los métodos, que alteran el nivel al que se expresa una proteína en una célula, y para cambiar una estructura proteica por medio del efecto antisentido.
- 40 El agente de ácido nucleico de doble cadena también es útil para tratar pacientes que tienen una afección caracterizada por un nivel de expresión genética alterado, de manera que, por ejemplo, se sobre-exprese una proteína. Tratando el paciente con una composición farmacéutica que comprende el agente de ácido nucleico de doble cadena, el nivel de expresión genética se puede suprimir o inhibir específicamente hasta un grado en el que los niveles de proteína disminuyen, mejorando de esta manera la afección.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

La solicitud describe lo siguiente:

- 5 (1) Un método de suministro de un oligonucleótido terapéutico a una célula que comprende: poner en contacto la célula con una composición que comprende:  
un agente de ácido nucleico de doble cadena que comprende una primera cadena de ácido nucleico hibridada con una segunda cadena de ácido nucleico, en las que:
- 10 la primera cadena de ácido nucleico comprende (i) una primera región de ARN con al menos 2 nucleótidos de ARN consecutivos que pueden ser reconocidas por la RNasa H cuando la primera cadena de ácido nucleico se hibrida con la segunda cadena de ácido nucleico, (ii) una región de oligonucleótido terapéutico en el que al menos un enlace internucleotídico den el extremo 3' y el extremo 5' de la región del oligonucleótido terapéutico es más resistente a nucleasas que un enlace internucleotídico natural, y (iii) al menos un enlace internucleotídico en los extremos 3' y el 5' de la primera cadena de ácido nucleico es más resistente a nucleasas que un enlace internucleotídico natural;
- 15 la segunda cadena de ácido nucleico comprende (i) una primera región de ADN que se hibrida con la primera región de ARN de la primera cadena de ácido nucleico y que puede promover el reconocimiento de al menos 2 nucleótidos de ARN consecutivos de la primera cadena de ácido nucleico por la RNasa h, y opcionalmente (ii) al menos un enlace internucleotídico en el extremo 3' y el extremo 5' de la segunda cadena de ácido nucleico es más resistente a nucleasas que un enlace internucleotídico natural; y  
la región del oligonucleótido terapéutico de la primera cadena de ácido nucleico no es capaz de la hibridación con la segunda cadena de ácido nucleico.
- 25 (2) El método de acuerdo con el artículo (1), en el que la primera cadena de ácido nucleico y no es capaz de hibridarse con la segunda cadena de ácido nucleico.  
(3) El método de acuerdo con el artículo (1), en el que la primera cadena de ácido nucleico comprende nucleótidos seleccionados de nucleótidos de ADN, nucleótidos de ARN, análogos de nucleótidos, y nucleótidos de PNA, y la segunda cadena de ácido nucleico comprende nucleótidos seleccionados de entre nucleótidos de ADN, análogos de nucleótidos, y nucleótidos de PNA.
- 30 (4) El método de acuerdo con uno cualquiera de los artículos (1)-(3), en el que la región del oligonucleótido terapéutico comprende un oligonucleótido seleccionado de entre un oligonucleótido antisentido, un oligonucleótido antagomir, un oligonucleótido conmutador de corte y empalme, un oligonucleótido de ARNip de cadena sencilla, un ARNip de doble cadena, un microARN, un pre-microARN, y un aptámero.
- 35 (5) El método de acuerdo con el artículo (4), en el que el oligonucleótido de antagomir es un oligómero mixto, está compuesto por un tipo de nucleótidos o análogos de nucleótido, o un oligómero con huecos.  
(6) El método de acuerdo con el artículo (5) en el que el antagomir comprende al menos un nucleótido seleccionado de entre 2'-OMe-ARN, MOE, CET, ENA, LNA, y AmNA, y al menos un enlace internucleotídico está opcionalmente fosforotioado.
- 40 (7) El método de acuerdo con uno cualquiera de los artículos (1)-(6), en el que la segunda cadena de ácido nucleico es un oligómero con huecos o un oligómero mixto.  
(8) El método de acuerdo con uno cualquiera de los artículos (1)-(7) en el que el agente de ácido nucleico de doble cadena comprende adicionalmente un resto de direccionamiento;  
Adicionalmente en el que el resto de direccionamiento se selecciona de entre un lípido, un azúcar, un péptido, y una proteína;
- 45 Adicionalmente en el que el lípido se selecciona de entre colesterol, un tocoferol, un tocotrienol, un ácido graso, una vitamina liposoluble, un glucolípido y un glicérido.  
(9) El método de acuerdo con el artículo (8), en el que el resto de direccionamiento está unido al nucleótido del extremo 3' o el nucleótido del extremo 5' de la segunda cadena de ácido nucleico, o el nucleótido del extremo 3' o el nucleótido del extremo 5' de la primera cadena de ácido nucleico.
- 50 (10) El método de acuerdo con uno cualquiera de los artículos (1)-(9), en el que el aumento de resistencia a nucleasas de los enlaces internucleotídico es debido a al menos un grupo fosforotioato, un nucleótido modificado, un análogo de nucleótido, y un nucleótido de PNA.  
(11) El método de acuerdo de uno cualquiera de los artículos (1)-(10), en el que la primera cadena de ácido nucleico comprende uno o más nucleótidos seleccionados de entre nucleótidos de ARN modificados y análogos de nucleótidos localizados 5' y localizados 3' del al menos 2 nucleótidos ARN consecutivos que pueden ser reconocidos por la RNasa H.
- 55 (12) El método de acuerdo con el artículo (11), en el que uno o más nucleótidos localizados 5' y localizados 3' de al menos los 2 nucleótidos de ARN consecutivos que pueden ser reconocidos por la RNasa H se seleccionan independientemente de entre nucleótidos de LNA, nucleótidos BNA, y nucleótidos 2'-O-metoxietil ARN.
- 60 (13) El método de acuerdo con el artículo (11) o (12), en el que uno o más nucleótidos localizados 5' y localizados 3' del al menos 2 nucleótidos de ARN consecutivos que pueden ser reconocidos por la RNasa H están opcionalmente fosforotioados independientemente.
- (14) Un método de suministro de un oligonucleótido terapéutico a una célula que comprende: poner en contacto con la célula una composición que comprende:
- 65 Un agente de ácido nucleico de doble cadena que comprende una primera cadena de ácido nucleico hibridada con una segunda cadena de ácido nucleico, en la que:

la primera cadena de ácido nucleico comprende (i) una primera región de ARN con al menos 2 nucleótidos de ARN que pueden ser reconocidos por la RNasa H cuando la primera cadena de ácido nucleico se hibrida con la segunda cadena de ácido nucleico, (ii) uno o más nucleótidos seleccionados de entre nucleótidos de ARN modificados y análogos de nucleótido localizados 5' y localizados 3' de al menos dos nucleótidos de ARN consecutivos que son reconocidos por la RNasa H, (iii) una región de oligonucleótido terapéutico que comprende uno o más nucleótidos en el extremo 3' y el 5' de nucleótidos de ARN modificados y comprende uno o más nucleótidos en el extremo 3' y el 5' seleccionados de entre nucleótidos de ARN modificados y análogos de nucleótido y que están opcionalmente fosforotioados independientemente, (iv) un resto de direccionamiento seleccionado de entre un lípido, un péptido y una proteína unidos al nucleótido del extremo 3' o el nucleótido del extremo 5' y (v) el número total de nucleótidos de la primera cadena de ácido nucleico se de 12 a 100;

la segunda cadena de ácido nucleico comprende (i) una primera región de ADN que se hibrida con la primera región de ARN de la primera cadena de ácido nucleico y puede promover el reconocimiento de los al menos 2 nucleótidos de ARN consecutivos de la primera cadena de ácido nucleico por la RNasa H, y (ii) uno o más nucleótidos seleccionados de entre nucleótidos de ADN modificados y análogos de nucleótido localizados 5' y localizados 3' de la primera región de ADN y que están opcionalmente fosforotioados independientemente; y la región del oligonucleótido terapéutico de la primera cadena de ácido nucleico no es capaz de hibridarse con la segunda cadena de ácido nucleico.

(15) Un método de suministro de un oligonucleótido terapéutico a una célula que comprende:

Poner en contacto con la célula una composición que comprende:

un agente de ácido nucleico de doble cadena que comprende una primera cadena de ácido nucleico hibridada con una segunda cadena de ácido nucleico, en el que:

la primera cadena de ácido nucleico comprende (i) una primera región de PNA con al menos dos nucleótidos de PNA, (ii) una región de oligonucleótido terapéutico en la que en la que al menos un enlace internucleotídico en el extremo 3' y el 5' de la región del oligonucleótido terapéutico es más resistente a nucleasas que un enlace internucleotídico natural, y (iii) al menos un enlace internucleotídico en el extremo 3' y el 5' de la primera cadena de ácido nucleico es más resistente a nucleasas que un enlace internucleotídico natural; y

la segunda cadena de ácido nucleico comprende (i) una primera región de ADN que se hibrida con una primera región de PNA de la primera cadena de ácido nucleico, y (ii) al menos un enlace internucleotídico en el extremo 3' y el 5' de la segunda cadena de ácido nucleico es más resistente a nucleasas que un enlace internucleotídico natural; y

la región del oligonucleótido terapéutico de la primera cadena de ácido nucleico no es capaz de hibridarse con la segunda cadena de ácido nucleico.

(16) Una composición que comprende:

un agente de ácido nucleico de doble cadena que comprende una primera cadena de ácido nucleico hibridada con una segunda cadena de ácido nucleico, en el que:

la primera cadena de ácido nucleico comprende (i) una primera región de ARN con al menos 2 nucleótidos de ARN consecutivos que pueden ser reconocidos por la RNasa H cuando la primera cadena de ácido nucleico se hibrida con la segunda cadena de ácido nucleico, (ii) una región de oligonucleótido terapéutico en el que al menos un enlace internucleotídico en el extremo 3' y el 5' de la región del oligonucleótido terapéutico es más resistente a nucleasas que un enlace internucleotídico natural, (iii) al menos un enlace internucleotídico en el extremo 3' y el 5' de la primera cadena de ácido nucleico es más resistente a nucleasas que un enlace internucleotídico natural, y (iv) el número total de nucleótidos en la primera cadena de ácido nucleico es de 12 a 100;

la segunda cadena de ácido nucleico comprende (i) una primera región de ARN de la primera cadena de ácido nucleico y puede promover el reconocimiento de los al menos 2 nucleótidos de ARN consecutivos de la primera cadena de ácido nucleico por la RNasa H, (ii) opcionalmente al menos uno de los enlaces internucleotídicos del extremo 3' y el 5' de la segunda cadena de ácido nucleico es más resistente a nucleasas que un enlace internucleotídico natural, y (iii) el número total de nucleótidos en la segunda cadena de ácido nucleico es de al menos 8; y

la región de oligonucleótido terapéutico de la primera cadena de ácido nucleico no es capaz de hibridarse con la segunda cadena de ácido nucleico en una célula de mamífero a una temperatura fisiológica.

(17) Una composición farmacéutica que comprende el agente de ácido nucleico de doble cadena del artículo (16) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

(18) Un método de reducción del nivel de expresión de un gen en una célula que comprende etapa de administración de una cantidad eficaz a la célula de la composición del artículo (16) o (17).

(19) Un método de modificación de la función de un producto de transcripción en una célula que comprende la etapa de administrar a la célula la composición del artículo (16 o 17).

(20) Un método de cambio del nivel de expresión de una proteína en una célula que comprende la etapa de administración a la célula a la composición del artículo (16 o 17).

(21) Un método de cambio de la estructura de una proteína en una célula que comprende la etapa de administración a la célula la composición de los artículos (16 o 17).

(22) Un método para el tratamiento de un paciente que tiene una afección caracterizada por el cambio del nivel de expresión, función o edición de un gen diana, que comprende:

la administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende

- (a) al menos un agente de ácido nucleico de doble cadena del artículo (16); y
- (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Ciertos aspectos incluyen un agente de ácido nucleico de doble cadena purificado o aislado, que comprende una primera cadena, que comprende una primera región complementaria y una región de oligonucleótido terapéutico, y una segunda cadena que comprende una segunda región complementaria, que está hibridada con la primera cadena. En ciertos aspectos, dicho agente de ácido nucleico de doble cadena comprende adicionalmente un resto de direccionamiento.

De acuerdo con ciertos aspectos, se puede suministrar un agente de ácido nucleico de doble cadena en un sitio diana con alta especificidad y alta eficacia asociando un resto funcional, por ejemplo, un resto de suministro, con el complejo de doble cadena.

### Efectos ventajosos de la invención

El agente de ácido nucleico de doble cadena de la presente invención se puede suministrar en un sitio diana con alta especificidad y alta eficacia, y la región de oligonucleótido terapéutico en el ácido nucleico que presenta efectos terapéuticos excelentes en el sitio diana.

### Breve descripción de los dibujos

[fig. 1] La FIG. 1 es un diagrama que ilustra los mecanismos generales de ciertos métodos antisentido. Como se ilustra en el diagrama, cuando un oligonucleótido (un oligonucleótido antisentido (ASO)) ("ADN" en el diagrama) que es complementario de una secuencia parcial del ARNm de un gen diana se introduce en una célula, la expresión de una proteína que está codificada por el gen diana se inhibe selectivamente. En el cuadrado sombreado, se muestra un mecanismo de degradación en el que la RNasa H escinde el ARNm en una localización en la que se hibrida a un ASO. Como resultado de la escisión por RNasa H, el ARNm generalmente no se traducirá para producir un producto de expresión genética funcional.

[fig. 2] La FIG. 2 es un diagrama esquemático que ilustra las estructuras de ARN, ADN y un nucleótido LNA.

[fig. 3] Las FIG. 3A-3B son ilustraciones esquemáticas de realizaciones adecuadas de agentes de ácido nucleico de doble cadena capaces de suministrar un oligonucleótido terapéutico. La Fig. 4A muestra la estructura de nucleótido básica, y la Fig. 4B añade a esta, restos funcionales opcionales "X", que puede representar independientemente un lípido (por ejemplo, colesterol o tocoferol), un azúcar o similar, o una proteína, un péptido (por ejemplo, un anticuerpo) o similar, y que puede servir como resto de direccionamiento.

[fig. 4] Las FIG. 4A-4F son ilustraciones esquemáticas de distintas estructuras para una primera cadena y una segunda cadena, y la relación de la parte de oligonucleótido terapéutico de la primera cadena a regiones complementarias de la primera y segunda cadenas.

[fig. 5] Las FIG. 5A-5D son diagramas esquemáticos que ilustran un mecanismo por el cual el oligonucleótido terapéutico se puede liberar del agente de ácido nucleico de doble cadena.

[fig. 6] La FIG. 6 muestra la fórmula estructural de distintos restos de ácidos nucleicos o análogos de ácido nucleico modificados y naturales.

[fig. 7-1] Las FIG. 7-1A a 7-1C son ilustraciones esquemáticas de las estructuras de los agentes de ácido nucleico de doble cadena que se utilizan en el Ejemplo 1.

[fig. 7-2] Las FIG. 7-2A a 7-2E muestra los análisis de transferencia de Northern de los experimentos del Ejemplo 1.

[fig. 8] La FIG. 8 muestra en la parte superior de la figura, la secuencia y composición de los oligonucleótidos utilizados en el Ejemplo 2, y muestra en la parte inferior un gráfico de los resultados del Ejemplo 2, en el que se ensayó la supresión *in vivo* del microARN 122 (miR122) en ratones por el agente de ácido nucleico de doble cadena.

[fig. 9] La FIG. 9 muestra la secuencia y composición de los oligonucleótidos utilizados en el Ejemplo 3.

[fig. 10a] La FIG. 10A muestra un gráfico de los resultados del Ejemplo 3, en el que se ensayó la supresión *in vivo* del microARN 122 (miR122).

[fig. 10b] La FIG. 10B muestra un gráfico de los resultados del Ejemplo 3, en el que se ensayó la expresión de aldolasa A (ALDOA) en ratones por el agente de ácido nucleico de doble cadena.

[fig. 10c] La FIG. 10C muestra un gráfico de los resultados del Ejemplo 3, en el que se ensayó la expresión de la deshidrogenasa cinasa de cetoácido de cadena ramificada (BCKDK) en ratones por el agente de ácido nucleico de doble cadena.

[fig. 10d] La FIG. 10D muestra un gráfico de los resultados del Ejemplo 3, en el que se ensayó el nivel sérico de LDL en ratones por el agente de ácido nucleico de doble cadena.

[fig. 10e] La FIG. 10E muestra un gráfico de los resultados del Ejemplo 3, en el que se ensayó el nivel sérico de LDL en ratones por el agente de ácido nucleico de doble cadena.

[fig. 10f] La FIG. 10F muestra el efecto fenotípico dependiente de la dosis para el nivel sérico de colesterol total.

[fig. 11] La FIG. 11 muestra la secuencia y composición de los oligonucleótidos utilizados en el Ejemplo 4.

5 [fig. 12] La FIG. 12 muestra un gráfico de los resultados del Ejemplo 4 que compara el efecto de omisión de exón del ácido nucleico de doble cadena con el del ácido nucleico de cadena sencilla.

[fig. 13] La FIG. 13 muestra la secuencia y composición de los oligonucleótidos utilizados en el Ejemplo 5.

[fig. 14] La FIG. 14 muestra un gráfico de los resultados del Ejemplo 5 que demuestra la inhibición de la expresión de ARNm de ApoB por direccionamiento al intrón del pre-ARNm de ApoB con el ácido nucleico de doble cadena.

10 [fig. 15] La FIG. 15 muestra la secuencia y composición de los oligonucleótidos utilizados en el Ejemplo 6.

[fig. 16] La FIG. 16 muestra un gráfico de los resultados del Ejemplo 6 que compara la inhibición de la expresión del miR122 por el ácido nucleico de doble cadena con el del ácido nucleico de cadena sencilla.

[fig. 17] La FIG. 17 muestra la secuencia y composición de los oligonucleótidos utilizados en el Ejemplo 7.

15 [fig. 18] La FIG. 18 muestra un gráfico de los resultados del Ejemplo 7 que demuestran la inhibición de la expresión del ARNm de ApoB por direccionamiento al intrón del pre-ARNm de ApoB con el ácido nucleico de doble cadena.

[fig. 19] La FIG. 19 muestra la secuencia y composición de los oligonucleótidos utilizados en el Ejemplo 8.

[fig. 20] La FIG. 20 muestra un gráfico de los resultados del Ejemplo 8 que demuestran la inhibición del ARNm de ApoB por direccionamiento al intrón del ARNm de ApoB con el ácido nucleico de doble cadena.

20 [fig. 21] La FIG. 21 muestra la secuencia y composición de los oligonucleótidos utilizados en el Ejemplo 9.

[fig. 22] La FIG. 22 muestra un gráfico de los resultados del Ejemplo 8 que demuestran los efectos terapéuticos del antimir-3' y el antimir-5'.

### Descripción de las realizaciones

25 El "efecto antisentido" significa la supresión de la expresión de un gen diana o el nivel de un producto de la transcripción dirigida, que se produce como resultado de la hibridación del producto de transcripción dirigido (cadena en sentido de ARN) con, por ejemplo, una cadena de ADN, o más generalmente, una cadena diseñada para producir el efecto antisentido, complementario a una secuencia parcial del producto de transcripción o similar. En ciertos casos la inhibición de la traducción o efecto de modificación de la función de corte y empalme tal como omisión de exón (véase la descripción de la parte superior fuera del área rodeada por las líneas de puntos en la FIG. 1) puede producirse al cubrir el producto de transcripción por el producto de hibridación, y/o puede producirse la descomposición del producto de transcripción como resultado del reconocimiento de la parte hibridada (véase la descripción en el área rodeada por las líneas punteadas en la FIG. 1). Además, en ciertos casos, el efecto antisentido se produce por direccionamiento del intrón del pre-ARNm.

35 El efecto antisentido lo posee la parte de oligonucleótido terapéutico del agente de doble cadena para suministrar el polinucleótido terapéutico de la presente invención. El efecto antisentido puede poseerlo una primera cadena de ácido nucleico. En este caso el efecto terapéutico aumenta sinérgicamente por la parte de oligonucleótido y la primera cadena de ácido nucleico.

40 El "gen diana" o "producto de transcripción direccionado" cuya expresión se suprime por el efecto antisentido no está limitado particularmente, y los ejemplos de los mismos incluyen los genes cuya expresión está aumentada en distintas enfermedades. También, el "producto de transcripción del gen diana" es un ARNm transcrito a partir del ADN genómico que codifica el gen diana, y también indica un ARNm que no se ha sometido a una modificación de bases, un precursor de ARNm que no se ha cortado y empalmado, y similar. Más en general, el "producto de transcripción" puede ser cualquier ARN sintetizado por una ARN polimerasa dependiente de ADN.

50 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "ácido nucleico" puede referirse a un nucleótido monomérico o nucleósido o puede significar un oligonucleótido que consiste en una pluralidad de monómeros. El término "polinucleótido" y "cadena de ácido nucleico" también se utiliza en el presente documento para referirse a un oligonucleótido. Las cadenas de ácido nucleico pueden prepararse en total o en parte por métodos de síntesis química, incluyendo las que utilizan un sintetizador automático o por procesos enzimáticos, que incluyen, pero no se limitan a reacciones con polimerasa, ligasa o de restricción.

55 El término "complementario" como se utiliza en el presente documento significa una relación en la cual se pueden formar los denominados pares de bases de Watson-Crick (pares de bases de tipo natural) o pares de bases no de Watson-Crick (pares de bases de Hoogsteen y similares) se pueden formar mediante enlaces de hidrógeno. No es necesario que la secuencia de bases de (a) la primera región complementaria y la segunda región complementaria, o (b) el producto de transcripción direccionado, por ejemplo el producto de transcripción de un gen diana, y la secuencia de bases del oligonucleótido terapéutico, son perfectamente complementarias, y es aceptable si las secuencias de bases tienen una complementariedad de al menos un 70 % o más, preferentemente un 80 % o más, y más preferentemente un 90 % o más (por ejemplo, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más). La complementariedad de secuencias se puede determinar utilizando un programa BLAST o similar. Una primera cadena se puede "emparejar" o "hibridar" con una segunda cadena cuando las secuencias son complementarias. Un experto habituado en la técnica puede determinar fácilmente las condiciones (temperatura, concentración salina, etc.) en las que se pueden hibridar dos cadenas, teniendo en cuenta el grado de complementariedad entre las cadenas. También, un experto habituado

en la técnica puede diseñar fácilmente primeras y segundas regiones complementarias, y un oligonucleótido terapéutico complementario del producto de transcripción basándose en la información de la secuencia de bases de, por ejemplo, el gen diana.

5 La longitud de la primera y segunda regiones complementarias o la región del oligonucleótido terapéutico no está particularmente limitada, pero la longitud de cada región habitualmente es al menos de 8 bases, al menos de 10 bases, al menos 12 bases, o al menos 13 bases. La longitud de cada región puede ser de hasta 20 bases, 25 bases, o 35 bases o más. La longitud total de la primera cadena puede ser incluso hasta aproximadamente 100 bases de larga. En algunas realizaciones, variación de la longitud de la segunda cadena puede ser de 10 a 35 bases, 12 a 25 bases, o 13 a 20 bases.

15 La elección de la longitud de la primera y segunda regiones complementarias depende del equilibrio de la afinidad de unión de cada base opuesta, el grado de complementariedad, y la temperatura de la muestra biológica con la que se va a poner en contacto el agente de ácido nucleico de doble cadena. La longitud de la parte de la primera y segunda regiones complementarias que se unen entre ellas debería ser lo suficientemente larga de manera que la estabilidad termodinámica de las cadenas hibridadas favorezca que las dos cadenas se mantengan sustancialmente unidas entre ellas durante el tiempo en que el agente se pone en contacto con la muestra biológica. Otros factores, tales como proteínas, enzimas, u otros componentes celulares pueden producir que las cadenas se separen o se desenrollen.

20 En algunas realizaciones la región del oligonucleótido terapéutico contiene algunas bases que se unen con la segunda región complementaria en el agente de doble cadena hibridada. La elección de la longitud de esta "región de solapamiento" depende de la temperatura de la muestra biológica con la que se pone en contacto el agente. En general, la región del oligonucleótido terapéutico de la primera cadena no es capaz de hibridarse con la segunda cadena a la temperatura de operación. La temperatura de operación puede ser una temperatura de incubación o la temperatura corporal fisiológica del sujeto o paciente.

La elección de la longitud del oligonucleótido terapéutico depende en general de un equilibrio entre la fuerza del efecto antisentido con la especificidad de la secuencia de ácido nucleico por la diana, entre otros factores tales como el coste, rendimiento sintético, y similares.

30 En algunas realizaciones, la elección de la longitud del oligonucleótido terapéutico y el grado de complementariedad entre este y el producto de transcripción direccionado también puede depender de la afinidad de unión entre el oligonucleótido terapéutico y la diana después de que la diana se haya escindido por la RNasa H. La potencia de un oligonucleótido terapéutico depende tanto de la afinidad de unión del oligonucleótido terapéutico por la diana antes de la escisión, así como por la velocidad de disociación del material escindido para disociarse del oligonucleótido terapéutico de manera que es liberado para unirse a otra cadena diana.

40 La primera y segunda regiones complementarias pueden comprender nucleótidos naturales y/o no naturales. El tipo de nucleótidos seleccionados por las regiones complementarias determina mucho el tipo de mecanismos por los que se puede liberar el oligonucleótido terapéutico. Por ejemplo, incluyendo el ARN y/o nucleótido tipo ARN en la primera cadena y ADN y/o nucleótidos tipo ADN en la segunda cadena se produce la formación de estructuras de heterodúplex de ADN/ARN que pueden ser reconocidas por la RNasa H. Por lo tanto, es posible un mecanismo de acción dependiente de la RNasa H en este caso, en cuyo caso la primera cadena puede ser escindida por la RNasa H.

45 Dicho proceso se ilustra en la FIG. 5A-5D. Las FIG. 5A muestra un dúplex hibridado que se forma entre (i) una primera cadena (cadena inferior en la figura) que contiene una primera región complementaria tipo oligómero con huecos 2'-OMe ARN/ARN y un oligómero terapéutico tipo antagomir 2'-OMe ARN y (ii) una segunda cadena (cadena superior en la figura) que tiene una segunda región complementaria tipo oligómero con huecos LNA/ADN. La primera cadena también contiene un resto de colesterol que puede suministrar el agente de doble cadena, por ejemplo, al hígado. Una vez que se suministra el agente, por ejemplo, al hígado, y entra en una célula, como se muestra en la FIG. 5B, la RNasa H reconoce el heterodúplex ADN/ARN y escinde la secuencia de ARN en la primera cadena. Esto separa el oligonucleótido terapéutico del resto de direccionamiento y deja que unas pocas bases unan el corte de la primera cadena a la segunda cadena. Y, esto expone algunas bases de ARN en el extremo de la primera cadena que se acaba de escindir. La FIG. 5C ilustra que la primera cadena escindida se separa de la segunda cadena que se convierte en un oligonucleótido de cadena sencilla libre y, las bases de ARN expuestas se someten a la escisión por una exonucleasa. Como se ilustra en la FIG. 5D, la actividad de la exonucleasa puede recortar la cadena liberada hasta justo la región del oligonucleótido, y de esta manera el agente de doble cadena puede servir para suministrar el oligonucleótido terapéutico en una muestra biológica.

60

Por otra parte, si el ADN y/o nucleótidos tipo ADN se excluyen de la segunda región complementaria, entonces se espera que se produzcan mecanismos independientes de la RNasa H. Por supuesto, incluso si se forman estructuras heterodúplex ADN/ARN, pueden existir mecanismos independientes de la RNasa H.

- 5 En algunas realizaciones, la segunda región complementaria comprende al menos 5 nucleótidos que cuando se hibridan con un polinucleótido ARN, el dúplex entre la primera/segunda regiones complementarias es reconocido por la RNasa H.

10 Los “al menos 5 nucleótidos” que cuando se hibridan con el ARN son “reconocidos por la RNasa H” habitualmente es una región que comprende de 5 a 20 bases consecutivas, una región que comprende de 5 a 16 bases consecutivas, una región que comprende de 5 a 12 bases consecutivas, o una región que comprende de 5 a 8 bases consecutivas. Además, los nucleótidos que se pueden utilizar en esta región son los que, como el ADN natural, son reconocidos por la RNasa H cuando se hibridan con nucleótidos ARN, en el que la RNasa H escinde la cadena de ARN. Los nucleótidos adecuados, tales como nucleótidos de ADN modificado y otras bases se conocen en la técnica. En algunas realizaciones, los nucleótidos de ADN natural y ADN modificado pueden mezclarse en una disposición tipo oligómero mixto y aun así inducen la actividad de la RNasa H. Se sabe que los nucleótidos que contienen un grupo 2'-hidroxi, como un nucleótido ARN no son adecuados. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la idoneidad de un nucleótido para su uso en esta región de “al menos 5 nucleótidos” cuando se desea un efecto dependiente de RNasa H. En algunas realizaciones los nucleótidos de la región complementaria se seleccionan independientemente de entre nucleótidos de ADN y ADN fosforotioato.

25 En algunas realizaciones, la segunda región complementaria puede comprender como poco 4 nucleótidos que cuando se hibridan a un polinucleótido de ARN, la región del dúplex nucleótido central/polinucleótido de ARN es reconocido y escindido por la RNasa H.

En algunas realizaciones, la primera región complementaria puede tener 2, 3, 4, o 5, o más nucleótidos de ARN natural consecutivos, y esta subsecuencia puede ser escindida por la RNasa H en una estructura de heterodúplex adecuada.

30 Como se utiliza en el presente documento, “nucleótido de ADN” significa un nucleótido de ADN natural, o un nucleótido de ADN con una subunidad de base, azúcar, o enlace de fosfato que se ha modificado. De manera similar, un “nucleótido de ARN” significa un nucleótido de ARN natural, o un nucleótido de ARN con una subunidad de base, azúcar, o enlace fosfato que se ha modificado. Una subunidad de base, azúcar, o enlace fosfato que se ha modificado es en la que se ha añadido o sustituido un sustituyente en una subunidad, y la subunidad como un todo no se ha sustituido por un grupo químico diferente. Desde el punto de vista de que una parte o la totalidad de las cadenas de ácido nucleico tengan alta resistencia a la desoxirribonucleasa y similares, el ADN puede ser un nucleótido modificado. Ejemplos de dicha modificación incluyen la 5-metilación, 5-fluoración, 5-bromación, 5-yodación, y N4-metilación de citosina; 5-desmetilación, 5-fluoración, 5-bromación, y 5-yodación de timidina; N5-metilación y 8-bromación de adenina; N2-metilación y 8-bromación de guanina; fosforotioación, metilfosfonación, metilfosfonación, metilfosfonación quiral, fosforoditioación, fosforoamidación, 2'-O-metilación, 2'-metoxietil (MOE)ación, 2'-aminopropil(AP)ación, y 2'-fluoración. Sin embargo, desde el punto de vista de su farmacocinética excelente, se prefiere la fosforotioación. Dicha modificación se puede llevar a cabo de manera que el mismo ARN puede someterse a una pluralidad de clases de modificación en combinación, Y, como se expone posteriormente, los nucleótidos de ARN se pueden modificar para conseguir un efecto similar.

45 En ciertos casos, el número de ADN y ARN modificados y la posición de la modificación pueden afectar al efecto antisentido y similar proporcionado por el oligonucleótido terapéutico como se desvela en el presente documento. Como estas realizaciones pueden variar con la secuencia del complemento y similares, puede depender de circunstancias, por un experto habituado en la técnica puede determinar las realizaciones adecuadas remitiéndose a las descripciones de documentos relacionados con los métodos antisentido. Además, cuando se mide el efecto antisentido que posee un oligonucleótido terapéutico o la liberación del oligonucleótido terapéutico después de la modificación, si el valor medido obtenido de esta manera no es significativamente menor que el valor medido del oligonucleótido terapéutico antes de la modificación (por ejemplo, si el valor obtenido de la medición después de la modificación es menor del 30 % o más que el valor medido del oligonucleótido terapéutico antes de la modificación), se puede evaluar la modificación relevante. La medición del efecto antisentido se puede llevar a cabo, como se indica en los Ejemplos posteriores, introduciendo un agente de doble cadena candidatos bajo ensayo en una célula o similar, y midiendo la cantidad de expresión (cantidad de ARNm, cantidad de ADNc, cantidad de una proteína, cantidad de un microARN, o similar) del producto de transcripción direccionado en la célula en la que la expresión está suprimida por el efecto antisentido proporcionado por el agente candidato bajo ensayo, utilizando apropiadamente técnicas conocidas tales como la transferencia de Northern, PCR cuantitativa, y transferencia de Western. El agente candidato puede ser el propio oligonucleótido terapéutico, o como una parte de un agente de ácido nucleico de doble cadena.

65 Como se utiliza en el presente documento, un “nucleótido de ARN” significa un nucleótido de ARN de origen natural, o un nucleótido de ARN con una subunidad de base, azúcar, o enlace de fosfato que se ha modificado. Una subunidad de base, azúcar o enlace fosfato que se ha modificado en la que se ha añadido o sustituido un único sustituyente en una subunidad, y la subunidad como un todo no se ha sustituido con un grupo químico diferente.

Una parte de la totalidad de las cadenas de ácido nucleico puede ser un nucleótido modificado, desde el punto de vista de que tengan una alta resistencia a una nucleasa tal como una ribonucleasa (RNasa). Ejemplos de dicha modificación incluyen 5-metilación, 5-fluoración, 5-bromación, 5-yodación, y N4-metilación de citosina; 5-desmetilación, 5-fluoración, 5-bromación, y 5-yodación de timidina; N5-metilación y 8-bromación de adenina; N2-metilación y 8-bromación de guanina; fosforotioación, metilfosfonación, metiltiofosfonación, metilfosfonación quiral, fosforoditioación, fosforoamidación, 2'-O-metilación, 2'-metoxietil(MOE)ación, 2'-aminopropil(AP)ación, y 2'-fluoración. También, un nucleótido de ARN con una base de timidina sustituida por una base de uracilo también se contempla. Sin embargo, desde el punto de que tenga una farmacocinética excelente, se utiliza la fosforotioación. Además, dicha modificación se puede llevar a cabo de manera que el mismo ácido nucleico se pueda someter a varias formas de modificación en combinación. Por ejemplo, como se utiliza en los Ejemplos descritos posteriormente, el mismo ARN puede someterse a fosforotioación y 2'-O-metilación con el fin de proporcionar resistencia a la escisión enzimática. Sin embargo, cuando se espera o se desea que un nucleótido de ARN sea escindido por la RNasa H, entonces solamente se aplica en general la fosforotioación o la 2'-O-metilación.

Como se utiliza en el presente documento, "análogo de nucleótido" significa un nucleótido de origen no natural, en el que la subunidad de base, azúcar o enlace de fosfato tiene más de un sustituyente que se ha añadido o sustituido en una subunidad, o que la subunidad como un todo se ha sustituido por un grupo químico diferente. Un ejemplo de un análogo como más de una sustitución es un ácido nucleico unido, en el que la unidad de unión se ha añadido gracias a dos sustituciones en el anillo del azúcar, normalmente unido a los átomos de carbono 2' y 4'. Con respecto a ciertas realizaciones, desde el punto de vista de aumentar la afinidad respecto a una secuencia parcial del producto de transcripción direccionado y/o la resistencia de la cadena a una nucleasa, la cadena de polinucleótido antisentido comprende adicionalmente un análogo de nucleótido. El "análogo de nucleótido" puede ser cualquier ácido nucleico en el que, debido a las modificaciones (grupos de unión, sustituyentes, etc.), la afinidad respecto a una secuencia parcial del complemento o el producto de transcripción direccionado y/o la resistencia del ácido nucleico a una nucleasa se ha aumentado, y ejemplos de los mismos incluyen los ácidos nucleicos que se desvela como adecuado para su uso en los métodos antisentido en los documentos JP 10-304889 A, WO 2005/021570, JP 10-195098 A, JP 2002-521310 W, WO 2007/143315, WO 2008/043753, WO 2008/029619, y WO 2008/049085 (a los que se hará referencia de aquí en adelante como "documentos relacionados con los métodos antisentido"). Es decir, ejemplos de los mismos incluyen los ácidos nucleicos desvelados en los documentos descritos anteriormente: un ácido nucleico de hexitol (HNA), un ácido nucleico ciclohexanos (CeNA), un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico de glicol (GNA), un ácido nucleico de treosa (TNA), un ácido nucleico de morfolino, un triciclo-ADN (tcADN), un ácido nucleico 2'-O-metilado, un ácido nucleico 2'-MOE(2'-O-metoxietil)ado, un 2'-AP (2'-O-aminopropil)ado, un ácido nucleico 2'-fluorado, un ácido 2'-F-arabinonucleico (2'-F-ANA), y un ANB (ácido nucleico puenteado).

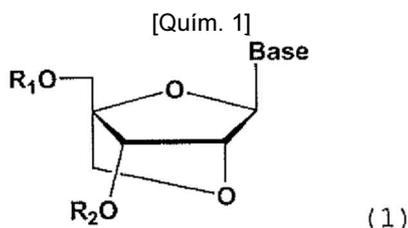
El BNA de acuerdo con ciertas realizaciones puede ser cualquier ribonucleótido o desoxirribonucleótido en el cual el átomo de carbono 2' y el átomo de carbono 4' están puenteados por dos o más átomos. Los ejemplos de ácidos nucleicos puenteados son conocidos por los expertos en la técnica. Un subgrupo de dichos BNA se pueden describir como que tienen el átomo de carbono en la posición 2' y el átomo de la posición 4' puenteados por 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-O-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-S-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-OCO-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sub>3</sub>)-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-2' (aquí, p, m y n representan un número entero del 1 al 4, un número entero del 0 al 2, y un número entero del 1 al 3 respectivamente; y R<sub>3</sub> representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alquililo, un grupo cicloalquilo, un grupo arilo, un grupo aralquilo, un grupo acilo, un grupo sulfonilo, y una unidad sustituyente (una molécula marcadora fluorescente o quimioluminiscente, un grupo funcional que tiene una actividad de escisión de ácido nucleico, un péptido de señal de localización intracelular o intranuclear, o similares)). Además, con respecto al BNA de acuerdo con ciertas realizaciones, en el sustituyente OR<sub>2</sub> sobre el átomo de carbono de la posición 3' y el sustituyente OR<sub>1</sub> sobre el átomo de carbono en la posición 5', R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son normalmente átomos de carbono, pero pueden ser idénticos o diferentes entre ellos, y también pueden ser un grupo protector de un grupo hidroxilo para la síntesis de ácido nucleico, un grupo alquilo, un grupo alquililo, un grupo cicloalquilo, un grupo arilo, un grupo aralquilo, un grupo acilo, un grupo sulfonilo, un grupo sililo, un grupo de ácido fosfórico, un grupo de ácido fosfórico protegido por un grupo protector para la síntesis de ácido nucleico, o -P(R<sub>4</sub>)R<sub>5</sub> (aquí, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, que pueden ser idénticos o diferentes entre ellos, representan cada uno un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido por un grupo protector para la síntesis de ácido nucleico, un grupo mercapto, un grupo mercapto protegido por un grupo protector para la síntesis de ácido nucleico, un grupo amino, un grupo alcoxi, que tiene 1 a 5 átomos de carbono, un grupo alquilio que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo cianoalcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, o un grupo amino sustituido con un grupo alquilo que tiene 1 a 5 átomos de carbono). Ejemplos no limitantes de dicho BNA incluyen alfa-L-metilenoxi (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA o beta-D-metilenoxi (4'-CH<sub>2</sub>-O-2')BNA, que también se conocen como LNA (Ácido Nucleico Bloqueado (marca registrada), 2',4'-BNA), etilenoxi(4'-CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2')BNA que también se conoce como ENA, beta-D-tio(4'-CH<sub>2</sub>-S-2')BNA, aminooxi(4'-CH<sub>2</sub>-O-N(R<sub>3</sub>)-2')BNA, oxiamino(4'-CH<sub>2</sub>-N(R<sub>3</sub>)-O-2')BNA que también se conoce como 2',4'-BNA<sup>NC</sup>, 2',4'-BNA<sup>COC</sup>, 3-amino-2',4'-BNA, 5'-metil BNA, (4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2')BNA, que también se conoce como cEt BNA, (4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2')BNA, que también se conoce como cMOE BNA, amidaBNA (4'-C(O)-N(R)-2')BNA (R=H, Me), que también se conoce como AmNA, y otros BNA conocidos por los expertos en la técnica.

Además, en el análogo de nucleótidos de acuerdo con ciertas realizaciones, un resto de base se puede modificar. Ejemplos de la modificación en un resto de base incluye la 5-metilación, 5-fluoración, 5-bromación, 5-yodación, y N4-metilación de citosina; 5-desmetilación, 5-fluoración, 5-bromación, y 5-yodación de timidina; N5-metilación y 8-bromación de adenina; N2-metilación y 8-bromación de guanina; fosforotioación, metilfosfonación, metiltiofosfonación,

metilfosfonación quiral, fosforoditioación, fosforoamidación, 2'-O-metilación, 2'-metoxietil (MOE)ación, 2'-aminopropil(AP)ación, y 2'-fluoración. Además, en el ácido nucleico modificado de acuerdo con ciertas realizaciones, se puede modificar un sitio de unión de diéster de ácido fosfórico. Ejemplos de la modificación del sitio de unión de diéster del ácido fosfórico incluyen fosforotioación, metilfosfonación, metiltiofosfonación, metiltiofosfonación quiral, fosforoditioación y fosforoamidación. Sin embargo, desde el punto de vista de tener una farmacocinética excelente se puede utilizar la fosforotioación. También, dicha modificación de un resto de bases o modificación de un sitio de unión diéster del ácido fosfórico se puede llevar a cabo de manera que el mismo ácido nucleico se pueda someter a una pluralidad de tipos de modificaciones en combinación.

En general, los nucleótidos modificados y los análogos de nucleótido modificados no se limitan a los que se ejemplifican en el presente documento. Se conocen en la técnica numerosos nucleótidos modificados y análogos de nucleótido modificados, tales como, por ejemplo, los desvelados en la Patente de EE. UU. N.º 8,299,039 de Tachas et al., particularmente en las col. 17-22, y se pueden utilizar en las realizaciones de la presente solicitud. Ejemplos de nucleótidos naturales, nucleótidos modificados y análogos de nucleótidos se muestran en la FIG. 6.

Un experto habituado en la técnica puede seleccionar y utilizar apropiadamente un análogo de nucleótido entre dichos ácidos nucleicos modificados mientras que tenga en consideración el efecto antisentido, la afinidad para una secuencia parcial del producto de transcripción del gen diana, la resistencia a una nucleasa, y similar. Sin embargo, el análogo de nucleótido en algunas realizaciones es un LNA representado por la siguiente fórmula (1):



En la fórmula (1), "Base" representa un grupo aromático heterocíclico o un grupo en anillo aromático de hidrocarburo que se puede sustituir, por ejemplo, por un resto base (base purínica o base pirimidínica) de un nucleósido natural, o un resto de base de un nucleósido no natural (modificado), en los que los ejemplos de modificación del resto de base incluyen los descritos anteriormente; y

R1 y R2 que pueden ser idénticos o diferentes entre ellos, representan cada uno un átomo de hidrógeno, un grupo protector de un grupo hidroxilo para la síntesis de ácido nucleico, un grupo alquilo, un grupo alquenoilo, un grupo cicloalquilo, un grupo arilo, un grupo aralquilo, un grupo acilo, un grupo sulfonilo, un grupo sililo, un grupo de ácido fosfórico, un grupo de ácido fosfórico protegido por un grupo protector para la síntesis de ácido nucleico, o -P(R4)R5 (aquí, R4 y R5, que pueden ser idénticos o diferentes entre ellos, representan cada uno un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido por un grupo protector para la síntesis de ácido nucleico, un grupo mercapto, un grupo mercapto protegido por un grupo protector para la síntesis de ácido nucleico, un grupo amino, un grupo alcoxi, que tiene 1 a 5 átomos de carbono, un grupo alquiltio que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo cianoalcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, o un grupo amino sustituido con un grupo alquilo que tiene 1 a 5 átomos de carbono.

Los compuestos que se muestran por la fórmula química anterior se representan como nucleósidos, pero el "LNA" y más generalmente, el BNA de acuerdo con ciertas realizaciones incluye las formas de nucleótido en las que el grupo derivado del ácido fosfórico se une al nucleósido (nucleótido) relevante. En otras palabras, los BNA, tales como el LNA, se incorporan como nucleótidos en las cadenas nucleicas que comprende en complejo de ácido nucleico de doble cadena.

Un "nucleótido de afinidad proteica baja" es un nucleótido que es (i) más resistente a la DNasa o RNasa que un nucleótido de ADN o ARN natural y (ii) posee una baja afinidad de unión con proteínas o componentes celulares tipo proteicos. En particular, el nucleótido tiene una afinidad de unión menor hacia las proteínas que un nucleótido fosforotioado. En consecuencia, un nucleótido de afinidad proteica baja es un nucleótido modificado o un análogo de nucleótido como se ha descrito anteriormente, pero el nucleótido no está fosforotioado.

Ejemplos de nucleótidos de afinidad proteica baja incluyen los nucleótidos 2'-O-metil ARN, nucleótidos 2'-O-metoxietil ARN, LNA, cMOE BNA, nucleótidos 2-fluoro ARN, nucleótidos boranofosfato, nucleótidos metilfosfonato, nucleótidos fosforoamidita, 5-metilcitosina, y 5-propiniluridina.

Cuando el agente de ácido nucleico de doble cadena de cierta realización es reconocido por la RNasa H en la célula y la primera cadena de ácido nucleico se escinde, liberando el oligonucleótido terapéutico, la segunda cadena se libera sin cambios en la solución. En algunas realizaciones, la propia segunda cadena puede tener actividad antisentido. En algunas realizaciones, el agente de ácido nucleico de doble cadena comprende más de dos cadenas de polinucleótido. Por ejemplo, dos primeras cadenas pueden formar un complejo de doble cadena con una segunda cadena. Cada primera cadena puede comprender la misma región de oligonucleótido terapéutico, o tienen

oligonucleótidos terapéuticos diferentes que actuarían en el mismo o diferente producto de transcripción direccionado. Se pueden preparar otras construcciones multicadena para el suministro de múltiples oligonucleótidos terapéuticos en vista de la descripción proporcionada en el presente documento.

- 5 En el agente de ácido nucleico de doble cadena, uno o más de los polinucleótidos constituyentes pueden comprender adicionalmente un resto funcional.

En algunas realizaciones, la primera o segunda cadena puede comprender un resto funcional unido al polinucleótido. En referencia de nuevo a la FIG. 3B, se ilustra un resto funcional "X" unido a las partes terminales de las dos cadenas.

- 10 El resto funcional, descrito adicionalmente posteriormente, se podría unir a alguno de estos extremos. O a una posición interna de los polinucleótidos. En otras realizaciones. La cadena complementaria comprende más de un resto funcional, que se puede unir en una pluralidad de posiciones, y/o unirse como un grupo a una posición del polinucleótido.

- 15 La unión entre el polinucleótido (por ejemplo, la primera cadena o la segunda cadena) y el resto funcional puede unirse directamente, o puede unirse indirectamente mediado por otro material. Sin embargo, en ciertas realizaciones, es preferible que un resto funcional se una directamente al polinucleótido mediante un enlace covalente, enlace iónico, enlace de hidrógeno o similares, y desde el punto de que pueda obtenerse una unión más estable el enlace covalente es más preferido. El resto funcional también se puede unir al polinucleótido mediante un grupo de unión escindible.

- 20 Por ejemplo, el resto funcional puede unirse mediante un enlace disulfuro.

No existen limitaciones particulares en la estructura del "resto funcional" de acuerdo con ciertas realizaciones, a condición de que confiriera la función deseada al polinucleótido quimérico. Las funciones deseadas incluyen una función de marcado, una función de purificación, y una función de suministro. Ejemplos de restos que proporcionan una función de marcador incluyen compuestos tales como proteínas fluorescentes, luciferasa, y similares. Ejemplos de restos que proporcionan una función de purificación incluyen compuestos tales como biotina, avidina, péptido marcador HIS, un péptido de marcador GST, un péptido de marcador FLAG, y similares.

- 25

Además, desde el punto de vista del suministro del agente de doble cadena a un sitio diana con alta especificidad y alta eficacia, y de esta manera suprimir muy eficazmente la expresión de un gen diana por el ácido nucleico relevante, es preferible que una molécula que tenga una actividad de suministro del agente de doble cadena de algunas realizaciones a un "sitio diana" en el cuerpo, esté unido a un resto funcional en la primera cadena. En algunas realizaciones, se prefiere que el resto funcional se una a la primera cadena en el extremo que esté más cercano a primera región complementaria, es decir, el extremo más distante de la región del oligonucleótido terapéutico.

- 30

El resto que tiene una "función de suministro dirigido" puede ser, por ejemplo, un lípido, desde el punto que sea capaz de suministrar el agente de doble cadena de ciertas realizaciones al hígado o similar con alta especificidad y alta eficacia. Ejemplos de dichos lípidos incluyen los lípidos tales como el colesterol y ácidos grasos (por ejemplo, vitamina E (tocoferoles, tocotrienoles), vitamina A, y vitamina D); vitaminas liposolubles tales como la vitamina K (por ejemplo, acilcarnitina); metabolitos intermedios tales como acil-CoA, glicolípidos, glicéridos, y derivados de los mismos. Sin embargo, entre estos, desde el punto de vista de su mayor seguridad, en ciertas realizaciones, se utilizan el colesterol y la vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles). Además, desde el punto de ser capaces de suministrar el agente de doble cadena de ciertas realizaciones al cerebro con alta especificidad y alta eficacia, los ejemplos de "resto funcional" de acuerdo con ciertas realizaciones incluyen azúcares (por ejemplo, glucosa y sacarosa). También desde el punto de vista de que sean capaces de suministrar el agente de doble cadena a distintos órganos con alta especificidad y alta eficacia uniéndose a distintas proteínas presentes en la superficie celular de distintos órganos, los ejemplos del "resto funcional" de acuerdo con ciertas realizaciones incluyen péptidos o proteínas tales como ligandos de receptores y anticuerpos y/o fragmentos de los mismos.

- 35

Las técnicas para acoplar marcadores a la cadena de ácido nucleico varían con la naturaleza del resto marcador y el punto de unión en el ácido nucleico, y estos se conocen bien en la técnica. Aunque no se ilustra, los restos funcionales se pueden unir al polinucleótido en sitios internos y no en los sitios de los extremos de la cadena. De nuevo dichas técnicas se conocen bien en la técnica.

- 50

Por lo tanto, se han descrito algunas realizaciones a modo de ejemplo adecuadas del agente de doble cadena de algunas realizaciones, pero el agente de doble cadena no tiene la intención de limitarse a las realizaciones a modo de ejemplo descritas anteriormente. Además, cualquier experto habituado en la técnica puede producir polinucleótidos que producen el agente de ácido nucleico de doble cadena de acuerdo con las distintas realizaciones seleccionando apropiadamente un método conocido. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de acuerdo con algunas realizaciones se pueden producir diseñando las respectivas secuencias de bases de los ácidos nucleicos basándose en la información de la secuencia de bases del producto de transcripción direccionado (o, en algunos casos, la secuencia de bases de un gen direccionado), sintetizar los ácidos nucleicos utilizando un sintetizador de ácidos nucleicos automático disponible en el mercado (productos de Applied Biosystems, Inc.; productos de Beckman Coulter, Inc.; y similares), y posteriormente purificar los oligonucleótidos resultantes utilizando una columna de fase inversa o similar. Los ácidos nucleicos producidos de esta manera se mezclan en una solución tampón apropiada y se desnaturalizan a aproximadamente 90 grados C a 98 grados C durante varios minutos (por ejemplo, durante 5 minutos), posteriormente

- 55

- 60

- 65

los ácidos nucleicos se hibridan a aproximadamente 30 grados C a 70 grados C durante aproximadamente 1 a 8 horas, y así se puede producir el agente de ácido nucleico de doble cadena de algunas realizaciones. Además, un polinucleótido que alberga un resto funcional se puede producir uniendo un resto funcional a la cadena de oligonucleótido durante o después de la síntesis de oligonucleótido. Son bien conocidos en la técnica numerosos métodos para unir restos funcionales a los ácidos nucleicos.

Por lo tanto, se han descrito las realizaciones a modo de ejemplo adecuadas de la primera cadena y la segunda cadena. También se desvelan realizaciones adicionales en los siguientes Ejemplos. Sin embargo, el agente de doble cadena como se contempla por los inventores no se limita por las realizaciones a modo de ejemplo descritas anteriormente, o en los Ejemplos posteriores.

también se contemplan las composiciones para la modificación de la expresión de un gen diana o nivel de transcripción del producto direccionado por medio de un efecto antisentido.

El agente de ácido nucleico de doble cadena de algunas realizaciones se puede suministrar en un sitio diana con alta especificidad y alta eficacia y puede suprimir muy eficazmente la expresión de un gen diana o el nivel de un producto de transcripción, como se desvelará en los Ejemplos descritos posteriormente. Por lo tanto, algunas realizaciones, proporcionan una composición que contiene el agente antisentido de doble cadena de algunas realizaciones como el ingrediente activo y que se intenta modificar o suprimir, por ejemplo, la expresión de un gen diana o la actividad de un microARN mediante un efecto antisentido. Particularmente, el agente de doble cadena de algunas realizaciones puede dar una alta eficacia incluso cuando se administra a bajas concentraciones, y el diseño también presente una toxicidad reducida. Además, direccionando el agente de doble cadena a un órgano particular, los efectos secundarios adversos se pueden reducir. Por lo tanto, algunas realizaciones también pueden proporcionar una composición farmacéutica que pretende tratar y prevenir enfermedades que se asocia c, por ejemplo, con el aumento de expresión de un gen direccionado, tal como enfermedades metabólicas, tumores, e infecciones.

La composición que contienen el agente de doble cadena de algunas realizaciones puede formularse por métodos farmacéuticos conocidos. Por ejemplo, la composición se puede utilizar por vía enteral (peroral o similar) en forma de cápsulas, comprimidos, píldoras, líquidos, polvos, gránulos, gránulos finos, agentes de revestimiento tipo película, aglomerados, trociscos agentes sublinguales, peptizadores, preparaciones bucales, pastas, jarabes, suspensiones, elixires, emulsiones, agentes de revestimiento, ungüentos, pomadas, cataplasmas, preparaciones transdérmicas. Lociones, inhaladores, aerosoles, inyecciones y supositorios, o no enteral.

Con respecto a la formulación de estas preparaciones, se pueden incorporar apropiadamente vehículos farmacológicamente aceptables o los vehículos aceptables como alimento y bebida, específicamente agua esterilizada, solución salina fisiológica, aceites vegetales, disolventes, bases, emulsionantes, agentes suspensores, tensioactivos, agentes de ajuste del pH, estabilizadores, saborizantes, aromatizantes, excipientes, vehículos, antisépticos, aglutinantes, diluyentes, agentes isotónicos, agentes de inyección, agentes extensores, desintegrantes, agentes tampón, agentes de revestimiento, agentes lubricantes, colorantes, agentes edulcorantes, agentes espesantes, correctores, ayudas a la disolución y otros aditivos.

Con ocasión de la formulación, como se devela en el Documento No patente 2, el agente de doble cadena de algunas realizaciones al que se une un lípido como resto funcional puede producir que se forme un complejo con una lipoproteína, tal como un quilomión o un resto de quilomión. Además, desde el punto de vista de aumentar la eficacia de la administración enteral, también se pueden utilizar complejos (micelas y emulsiones mezcladas) con sustancias que tienen una permeabilidad del epitelio de la mucosa del colon que aumentan la acción (por ejemplo, ácidos grasos de cadena media, ácidos grasos saturados de cadena larga, o derivados de los mismos (sales, formas éster, formas éter)) y tensioactivos (tensioactivos no iónicos y tensioactivos aniónicos), además de las lipoproteínas.

No existen limitaciones particulares en la forma de administración preferida de la composición de algunas realizaciones, y ejemplos de la misma incluyen la administración enteral (peroral o similar) o no enteral, más específicamente, la administración intravenosa, administración intraarterial, administración intraperitoneal, administración subcutánea, administración intracutánea, administración traqueobronquial, administración rectal, y administración intramuscular, y administración por transfusión.

La composición de algunas realizaciones se puede utilizar para animales que incluyen seres humanos como sujetos. Sin embargo, no existen limitaciones particulares sobre los animales excluyendo los seres humanos, y pueden ser los sujetos de algunas realizaciones distintos animales domésticos, aves domésticas, mascotas, animales de experimentación y similares.

Cuando la composición de algunas realizaciones se administra o ingiere, la cantidad de administración o la cantidad de ingestión puede seleccionarse apropiadamente de acuerdo con la edad, peso corporal, síntomas y estado de salud del sujeto, tipo de composición (producto farmacéutico, alimento y bebida, o similar), y similares. Sin embargo, la cantidad eficaz de ingestión de la composición de acuerdo con ciertas realizaciones es de 0,001 mg/kg/día a 50 mg/kg/día del oligonucleótido terapéutico.

El agente de doble cadena de algunas realizaciones se puede suministrar en el sitio diana con alta especificidad y alta eficacia, y puede modificar o suprimir la expresión de un gen diana o el nivel de un producto de transcripción muy eficazmente, como se desvelará en los Ejemplos siguientes. Por lo tanto, la presente solicitud proporciona un método de administración del agente de doble secuencia de algunas realizaciones a un sujeto y suprimiendo la expresión de un gen diana o el nivel del producto de transcripción por medio de un efecto antisentido. Además, también se puede proporcionar un método de tratamiento o prevención de distintas enfermedades que se asocian con, por ejemplo, el aumento de expresión de genes dianas, administrando la composición de algunas realizaciones a un sujeto.

### Ejemplos

De aquí en adelante, algunas realizaciones se describirán más específicamente por medio de Ejemplos y Ejemplos Comparativos, pero las realizaciones no pretenden limitarse a los Ejemplos siguientes.

#### Ejemplo 1

Se llevó a cabo un experimento *in vivo* que demostró la utilidad de una estructura tipo oligómero con huecos u oligómero mixto para la segunda cadena en un agente nucleico de doble cadena de acuerdo con una realización. Las estructuras de los agentes de doble cadena y los resultados del experimento se muestran en la FIG. 7-1 y 7-2.

La primera cadena comprende una región complementaria basada en ARN con una estructura tipo oligómero con huecos y un oligonucleótido terapéutico que estaba parcialmente fosforotioado, antagomir 2'-OMe ARN. La primera cadena también tenía un grupo tocoferol unido en la posición del extremo 5' como resto de direccionamiento, para suministrar el agente de doble cadena al hígado. La primera cadena se ilustra esquemáticamente en las Fig. 7A y 7B. Además, como control, se preparó de manera similar una primera cadena comprendida completamente por nucleótidos 2'-OMe ARN. Reemplazando los nucleótidos de ARN con nucleótidos 2'-OMe ARN, se espera que la región complementaria basada en ARN sea resistente a la escisión por RNasa H.

La segunda cadena era un oligonucleótido LNA/ADN 13mero tipo oligómero con huecos (Fig. 7-1A, 7-1C) o un tipo oligómero mixto (Fig. 7-1B). Cada posición entre nucleótidos estaba fosforotioada. El oligómero con huecos tenía una región central de 8 bases de bases ADN que era totalmente complementaria con la secuencia de la primera cadena. El oligómero mixto tenía intervalos de tres bases, dos bases y tres bases se parados por bases LNA como se ilustra. La segunda cadena es complementaria de un ARNm de ApoB (NM\_009693).

La secuencia, composición y longitud de la cadena de la primera y segunda cadenas eran las siguientes:

#### Primera cadena

(SEQ ID NO: 1) 31mero Toc-ARNc-G  
 5'-Toc-u\*g\*a\*AUACCAAUg\*c\*uacgcauacgcacca\*c\*c\*a-3'  
 (SEQ ID NO: 2) 31mero Toc-2'OMeARN  
 5'-Toc-u\*g\*a\*auaccaaug\*c\*uacgcauacgcacca\*c\*c\*a-3'

#### Segunda cadena

(SEQ ID NO: 3) 13mero LNA/ADN oligómero con huecos  
 5'-G\*C\*a\*t\*t\*g\*g\*t\*a\*t\*T\*C\*A-3'  
 (SEQ ID NO: 4) 13 mero LNA/ADN oligómero mixto  
 5'-G\*c\*a\*t\*T\*g\*g\*T\*a\*t\*t\*C\*A-3'

En mayúsculas/Subrayado: LNA (C = metilcitosina LNA)  
 En minúsculas: ADN  
 En mayúsculas: ARN  
 En minúsculas/Subrayado: 2'-O-Me ARN

\*: enlace internucleotídico de fosforotioato

También se prepararon oligonucleótidos de ARN que varían de 20 a 31 bases para su uso como referencias de migración en los análisis de transferencia de Northern:

(SEQ ID NO: 5) 20mero ARNc  
 5'-GCUACGCAUACGCACCACCA-3'  
 (SEQ ID NO: 6) 22mero ARNc  
 5'-AUGCUACGCAUACGCACCACCA-3'  
 (SEQ ID NO: 7) 23mero ARNc  
 5'-AAUGCUACGCAUACGCACCACCA-3'  
 (SEQ ID NO: 8) 24mero ARNc

5'-CAAUGCACGCAUACGCACCACCA-3'

(SEQ ID NO: 9) 25mero ARNc

5'-CCAAUGCACGCAUACGCACCACCA-3'

(SEQ ID NO: 10) 31mero ARNc

5'-UGAAUACCAAUGCACGCAUACGCACCACCA-3'

(las abreviaturas son como anteriormente)

También se preparó una sonda de ADN marcada con digoxigenina (DIG) para el análisis de transferencia de Northern:

(SEQ ID NO: 11) 28mero 3'DIG-ADN

5'-tggtagcgtatgtagcagtggtattca-DIG-3'

(las abreviaturas son como anteriormente)

Los oligonucleótidos LNA/ADN se sintetizaron por Gene Design (Osaka, Japón), y los ARNc se sintetizaron en Hokkaido System Science (Sapporo, Japón). La sonda de ADN DIG se preparó marcando el oligonucleótido de ADN con digoxigenina-ddUTP, utilizando un kit de marcador del extremo 3' de oligonucleótido DIG, de 2ª generación (Roche Diagnostics).

Los agentes de doble cadena compuestos por el 31mero Toc-ARNc-G con el 13mero oligómero en huecos LNA/ADN (Fig. 7-1A) o el 13mero del oligómero mixto (LNA/ADN) (Fig. 7-1B), o el 31mero Toc-2'-OMeARN con el 13mero del oligómero con huecos LNA/ADN se prepararon mezclando cantidades equimolares de cada cadena en una solución salina de tampón fosfato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), calentado la solución a 95 grados C durante 5 minutos y entonces enfriándola y manteniéndola a 37 grados C durante una hora para hibridar de esta manera las cadenas de ácido nucleico y forman el agente de ácido nucleico de doble cadena. Los ácidos nucleicos hibridados se almacenaron a 4 grados C o en hielo. Los agentes de doble cadena se formularon como una solución de PBS para los experimentos *in vivo*.

Estudio *in vivo* de liberación del oligonucleótido terapéutico en ratones. Se mantuvieron ratones hembra de tipo silvestre Crlj:CD1 (ICR) de 4-5 semanas de edad (Oriental Yeast, Tokyo, Japón) en un ciclo de 12 h de luz/oscuridad en unas instalaciones animales libres de patógeno con libre acceso al agua y el alimento. Los agentes de doble cadena se administraron una vez, a un ratón, respectivamente, por inyección intravenosa, se recolectaron los hígados para el análisis de transferencia de Northern. El ARN total en el hígado se extrajo utilizando el kit ISOGEN II (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japón).

Análisis de transferencia de Northern. Se separó el ARN total (30 microg) por electroforesis en un gel de urea poliacrilamida al 18 %. Las referencias de migración de SEQ ID NO: 4-9, así como la primera cadena como cadena sencilla se incluyeron en calles separadas como controles. Los materiales sometidos a electroforesis se transfirieron a una membrana de Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La transferencia se hibridó con la sonda 3'-DIG ADN, y se visualizó con el instrumento Gene images. El resultado de la comparación del oligómero con huecos y el oligómero mixto (Fig. 7-1A vs 7-1B) se muestra en la Fig. 7-2D. El resultado de la comparación del agente de doble cadena que tiene una primera cadena con una región complementaria basada en ARN escindible frente a una con una cadena de ARN 2'-O metilado (Fig. 7-1A vs 7-1C) se muestra en la Fig. 7-2E. Las transferencias separadas se hibridaron con la secuencia de microARN U6 de ratón como un control interno (no mostrado).

Resultados. El análisis de transferencia de la Fig. 7-2D muestra que la primera cadena Toc-ARNc-G de los agentes de doble cadena se escindieron *in vivo* hasta una longitud más corta. En comparación con el control Toc-ARNc-G no procesado (calle M7), el agente oligómero con huecos de doble cadena (Calle 1) revelaba esencialmente la conversión completa de la primera cadena Toc-ARNc-G a una longitud más corta. De manera similar el agente oligómero mixto de doble cadena (Calle 2) demostraba la conversión significativa a sondas de longitud más corta. La primera cadena en ambos casos se procesó a oligonucleótidos que tiene desde 20 a aproximadamente 26 bases, basándose en la comparación de las distancias de migración del ARNc de control en las calles M1-M5.

El análisis de transferencia de la Fig. 7-2E muestra que mientras que la cadena Toc-ARNc-G (con el ARN en la región complementaria basada en ARN) (calle 1) se escindió en fragmentos más cortos, la primera cadena completamente 2'-O-metilada (calle 2) no se escindió, y en vez de migrar aproximadamente la misma distancia que la longitud completa de los 31meros de control de las calles M6 y M7.

La aparición de los fragmentos más cortos de la primera cadena de las Calles 1-2 de la Fig. 7-2D y la calle 1 pero no la calle 2 de la Fig. 7-2E demuestra que los agentes de doble cadena se suministraban al hígado *in vivo*, y la región complementaria del heterodúplex ADN/ARN de doble cadena era reconocida por la RNasa H y la primera cadena se escindía. La aparición de algunos productos 20méricos en las calles 1-2 de la Fig. 7-2D y la calle 1 de la Fig. 7-2E demuestra que se producía algún procesamiento adicional de la primera cadena escindida, probablemente por una exonucleasa que recorta el oligonucleótido hasta una posición resistente a la nucleasa conferida por el enlace fosforotioato.

**Ejemplo 2**

5 Se llevó a cabo un experimento que evalúa la potencia de inhibición *in vivo* de la expresión del microARN por un agente de ácido nucleico de doble cadena de acuerdo con una realización. Se compararon controles de oligonucleótidos antisentido de cadena sencilla convencionales con el agente de doble cadena. Las estructuras se muestran en la FIG. 8.

10 Los controles eran el antimir oligomérico mixto LNA/ADN conocidos como miravirsen (marca registrada), y un antagomir ARN 2'-O metilado que contenía un resto de colesterol. Este último se hibridó con el oligómero con huecos LNA/ADN para formar el agente de doble cadena utilizado en el ejemplo. La secuencia, composición, y longitud de cadena de las cadenas era la siguiente:

15 Primera cadena

(SEQ ID NO: 12) 36mero cadena de ARN  
5'-a\*c\*aaacaccauugucacacuc\*c\*a\*UGAAUACCAAU\*g\*c-3'-col

20 Segunda cadena

(SEQ ID NO: 13) complemento 13mérico de oligómero con huecos LNA/ADN  
5'-G\*C\*a\*t\*t\*g\*t\*a\*t\*T\*C\*A-3'

25 Control de cadena sencilla

(SEQ ID NO: 14) AntimiR(miR122)  
5'-C\*c\*A\*t\*t\*G\*T\*c\*a\*C\*a\*C\*C\*C-3'

30 (Abreviaturas como anteriormente)

Para preparar el agente de doble cadena, el complemento LNA/ADN y la cadena de ARN 36mérico se mezclaron en cantidades equimolares, la solución se calentó a 95 grados C durante 5 minutos y entonces se enfrió y se mantuvo a 37 grados C durante una hora para hibridar de esta manera las cadenas de ácido nucleico y formar el agente de ácido nucleico de doble cadena. Los ácidos nucleicos hibridados se almacenaron a 4 grados C o sobre hielo.

35 Experimento *in vivo*. Los ratones eran ratones ICR hembras de 4 a 6 semanas de edad con pesos corporales de 20 a 25 g. Los experimentos utilizando los ratones se llevaron a cabo con n = 3. Los agentes nucleicos se inyectaron por vía intravenosa a un ratón en una cantidad de 0,75 mg/kg cada uno a través de la vena caudal. También, se prepararon como grupo de control negativo, ratones a los que solo se inyectó PBS (en vez de agentes de ácido nucleico).

40 Setenta y dos horas después de la inyección, los ratones se perfundieron con PBS, y entonces los ratones se disecaron para extraer el hígado. Posteriormente, se extrajo el ARNm utilizando el kit Isogen (Gene Design, Inc.) de acuerdo con el protocolo. Se sintetizó el ADNc utilizando un Superscript III (Invitrogen, Inc.) de acuerdo con el protocolo. Se llevó a cabo una RT-PCR cuantitativa por TaqMan (Roche Applied Bioscience Corp.). Los cebadores utilizados en la RT-PCR cuantitativa eran productos diseñados y producidos por Life Technologies Corp. Basándose en distintas cantidades de genes. Las condiciones de amplificación (temperatura y tiempo) eran: 15 segundos a 95 grados C, 30 segundos a 60 grados C, y 1 segundo a 72 grados C (un ciclo) se repitió durante 40 ciclos. Basándose en los resultados de la RT-PCR cuantitativa obtenidos de esta manera, la cantidad de expresión de microARN (miR122)/cantidad de expresión de microARN (SN0234; gen convencional interno) se calcularon respectivamente, y los resultados de cada grupo se compararon y evaluaron por un ensayo t. Los resultados se presentan en la parte inferior de la FIG. 8.

50 Resultados. Como se muestra por los resultados de la FIG. 8, los tres reactivos de ácido nucleico muestran una inhibición de la expresión de miR122 con respecto al control negativo (con PBS solo). Sin embargo, el grado de inhibición que se consigue con el agente de doble cadena de acuerdo con una realización es mayor que la que se consigue con los oligonucleótidos de cadena sencilla y la diferencia es estadísticamente significativa.

**Ejemplo 3**

55 Se llevó a cabo un experimento que demostraba la utilidad de un agente de ácido nucleico de doble cadena químico para la inhibición de microARN *in vivo*. Específicamente no solo se evaluó el efecto inhibitor para el microARN122 (miR122) que es una diana directa del ácido nucleico utilizado en el presente experimento sino también el efecto inhibitor de la expresión de aldolasa A (ALDOA) y ARNm de la cinasa de la cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada (BCKDK) que son dianas corriente abajo del miR122. También se evaluaron el colesterol sérico total y el valor de la lipoproteína de baja densidad (LDL) que son fenotípicas de la ALDOA. Se utilizó un agente de ácido nucleico de doble cadena conocido que inhibe miR122 como control y el agente de ácido nucleico de control se compararon con un heterodúplex de ácido nucleico en el que se introdujo el ácido nucleico de cadena sencilla conocido. Las estructuras de ácido nucleico se muestran en la Fig. 9. El antimir oligomérico mixto LNA/ADN (se utilizó el miravirsen

(marca registrada) como control positivo. Un grupo al que se administró PBS se utilizó como control negativo. La secuencia, composición, y longitud de la cadena de las cadenas eran las siguientes:

Primera cadena

5 (SEQ ID NO: 15) cadena del 28mero de ARN  
5'-C\*c\*A\*t\*t\*G\*T\*c\*a\*C\*a\*C\*t\*C\*CGCGAUACCAAU\*c\*g-3'

Segunda cadena

10 (SEQ ID NO: 16) 13mero del complemento de oligómero con huecos LNA/ADN  
5'-C\*G\*a\*t\*t\*g\*t\*a\*t\*C\*G\*C-3'

Control de cadena sencilla

15 (SEQ ID NO: 14) AntimiR(miR122)  
5'-C\*c\*A\*t\*t\*G\*T\*c\*a\*C\*a\*C\*t\*C-3'

(las abreviaturas son como anteriormente)

20 El agente de doble cadena se preparó como en los Ejemplos 1 y 2. Es decir, el complemento LNA/ADN y la cadena de ARN se mezclaron en cantidades equimolares. La solución se calentó a 94 grados C durante 5 minutos y entonces se enfrió y se mantuvo a 37 grados C durante una hora para de esta manera hibridar las cadenas de ácido nucleico y formar el agente de ácido nucleico de doble cadena. Los ácidos nucleicos hibridados se almacenaron a 4 grados C o sobre hielo.

Experimento *in vivo*

30 Los ratones eran ratones ICR hembras de 4 semanas de edad con pesos corporales de 20 a 25 g. Los experimentos que utilizaban los ratones se llevaron a cabo todos con n = 3. Los agentes de ácido nucleico se inyectaron por vía intravenosa a un ratón mediante la vena caudal. Los agentes de ácido nucleico se inyectaron a un ratón en una cantidad de 0,1 mg/kg cada uno una vez en un experimento para evaluar el efecto inhibitor del miR122 (Fig. 10a). Entonces los ratones se perfundieron con PBS 72 horas después de la inyección y se recolectó el lóbulo hepático izquierdo. Los agentes de ácido nucleico se inyectaron en un ratón con una cantidad de 0,75 mg/kg cada uno, tres veces a la semana en un experimento para la evaluación de ALDOA (Fig. 10b) y BCKDK (Fig. 10c) que son dianas corrientes abajo del miR122 y el colesterol sérico total (Fig. 10c). Entonces se recolectó sangre al inyectarlo y 168 horas después de esto y se recolectó el tejido hepático también. Se llevó a cabo la extracción de ARNA, la síntesis de ADNc y la PCR cuantitativa por el mismo protocolo del Ejemplo 2. En la evaluación del fenotipo, la reducción desde las 9 horas después de la inyección a las 168 horas del colesterol sérico total (Fig. 10d) y LDL (lipoproteína de baja densidad) (Fig. 10e) se midieron y compararon con un grupo en el que se inyectó PBS. Para la evaluación del efecto dependiente de la dosis sobre el fenotipo, los agentes de ácido nucleico se inyectaron en una cantidad de 0,1, 0,75 y 1,5 mg/kg cada uno tres veces a la semana y se evaluó la reducción del colesterol sérico total (Fig. 10f) igual que antes.

45 Resultados. Como se muestra por los resultados de la FIG. 10a, los tres reactivos de ácido nucleico demuestran que una inhibición de la expresión de miR122 con respecto al control negativo (solo PBS). Sin embargo, el grado de inhibición conseguida con el agente de doble cadena de acuerdo con una realización es mayor que la que se consigue con los oligonucleótidos de cadena sencilla, y que la diferencia es estadísticamente significativa. Como se muestra en la Fig. 10b y c, el antimiR de doble cadena demostraba una elevación estadísticamente significativa de la expresión de las dianas corrientes abajo (ALDOA, BCKDK) de miR122 en comparación con un ácido nucleico de cadena sencilla. Como se muestra en las Fig. 10d y 10e, el antimiR de doble cadena presentaba una reducción estadísticamente significativa del colesterol sérico total y LDL en comparación con un ácido nucleico de cadena sencilla. Como se muestra en la Fig. 10f, el antimiR de doble cadena demostraba un efecto fenotípico dependiente de la dosis superior al antimiR de cadena sencilla.

#### 55 Ejemplo 4

60 Los inventores llevaron a cabo un experimento que evaluaba la aplicación de un agente de ácido nucleico de doble cadena respecto a otro tipo de oligonucleótido, que es otra diana y la interacción con el ARN diana. El ARN diana era un pre-ARNm de distrofina, que es el gen responsable de la distrofia muscular de Duchenne (DMD). El oligonucleótido del ejemplo 4 es un oligonucleótido conmutador de corte y empalme (SSO), que induce la omisión del exón 58 de la distrofina. Las estructuras de polinucleótido se muestran en la FIG. 11.

65 Los controles eran SSO de cadena sencilla. La secuencia, composición, y longitud de cadena de las cadenas eran las siguientes:

Primera cadena

(SEQ ID NO: 17) cadena de ARN 28mérico  
 5'-t\*C\*t\*g\*C\*g\*c\*I\*c\*c\*I\*g\*I\*aGCGAUACCAAU\*c\*g.-3'

5

Segunda cadena

(SEQ ID NO: 16) complemento oligomérico con huecos de LNA/ADN 13mérico  
 5'-C\*G\*a\*t\*t\*g\*t\*a\*t\*C\*G\*C-3'

10

Control de cadena sencilla

(SEQ ID NO: 18) SSO 15mérico  
 5-t\*C\*t\*g\*C\*g\*c\*I\*c\*c\*I\*g\*I\*a-3\*

15

(Abreviaturas como anteriormente)

El agente de doble cadena se preparó como en los Ejemplos 1 a 3. ES decir, el complemento LNA/ADN y la cadena de ARN se mezclaron en cantidades equimolares, la solución se calentó a 95 grados C durante 5 minutos y entonces se enfrió y se mantuvo a 37 grados C durante una hora para hibridar de esta manera las cadenas de ácido nucleico y formar el agente de ácido nucleico de doble cadena. Los ácidos nucleicos hibridados se almacenaron a 4 grados C o sobre hielo.

20

Para el experimento, se construyó un plásmido de expresión estable de un fragmento genético de distrofina humana y se establecieron las líneas celulares estables que contenían la construcción. El fragmento de gen de distrofina tenía una secuencia de longitud completa desde el exón 57 al exón 59 excepto el intrón 47, que se acortó por conveniencia debido a su longitud. Se esperaba que la expresión del fragmento de distrofina en la línea celular estable diera lugar normalmente a un ARNm que comprende los exones 57, 58, y 59. En presencia del oligonucleótido conmutador de corte y empalme, que tiene la capacidad de producir la omisión del exón 58 durante el procesamiento del pre-ARNm, sin embargo, se esperaba que el ARNm expresado comprendiera el exón 57 y 59 pero carecería del exón 58.

25

30

En el experimento, hasta la extensión que el oligonucleótido antisentido (ASO) es capaz de alcanzar el núcleo, el ASO debería ser capaz de alterar el corte y empalme del producto de ARNm expresado a partir del gen de distrofina, y por lo tanto la cantidad del fragmento de tres exones (exones 57, 58 y 59) de la distrofina mostrarían una disminución correspondiente.

35

Los oligonucleótidos antisentido de cadena sencilla puque pueden causar la omisión del exón 58 se preparó y ensayo. El ASO se une a una secuencia del exón 58.

40 Construcción de plásmidos de expresión del gen de distrofina

El plásmido de partida para la construcción era el vector pcDNA5/FRT (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para generar el fragmento que contenía el marcador Flag, se hibridaron en conjunto dos oligonucleótidos, 5'-AGCTTACCATGGATTACAAGGACGACGACGACAAGGGGGTAC-31 (SEQ ID NO: 19) (que incluye el sitio HindIII y KpnI, subrayados) y 5'-CCC-CTTGTCTCGTCTCGTCCCTTGTAAATCCATGGTA-3' (SEQ ID NO: 20). Después de la hibridación, el fragmento se clonó en los sitios HindIII/KpnI del vector pcDNA5/FRT (pcDNA5/FRT-FLAG). El marcador Flag contiene dos mutaciones silentes para evitar las expresiones de una primera metionina extra accidentalmente.

45

Utilizando el vector pcDNA3-EGFP como armazón, el fragmento EGFP se amplificó utilizando un cebador directo 5'-CCCGGGTGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT-3' (SEQ ID NO: 21) (incluyendo el sitio SmaI, subrayado) y un cebador inverso 5'-ATAGGGCCC TTACTTGTACAGCTCGTCCAT-3' (SEQ ID NO: 22) (incluyendo un sitio ApaI, subrayado). Las condiciones de ciclado eran: 94 grados C durante 2 min, después 98 grados C 0,5 min, 63 grados C durante 0,5 min, 68 grados C durante 0,75 min durante 35 ciclos, y 68 grados C durante 3 min. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando el KOD FX NEO (TOYOBO, Osaka) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El fragmento EGFP se insertó en el vector pcDNA5/FRT-FLAG digerido con SmaIV, ApaI (pcDNA5/FRT-FLAG-EGFP).

50

55

Utilizando el vector pDsRed-Express-NI como armazón, el fragmento de EGFP se amplificó utilizando un cebador directo 5'-ATATGGATCCAACCGGT GTGGCCTCCTCC-GAGGACGTCA-3' (SEQ ID NO: 23) (incluyen el sitio BamHI y AgeI, subrayados) y un cebador inverso 5'-CGGTCTACAGGAACAGGTGGTGGC-3' (SEQ ID NO: 24). Las condiciones de ciclado eran: 94 grados C durante 2 min, luego 98 grados C durante 0,5 min, 63 grados C durante 0,5 min, 68 grado C durante 0,75 min durante 35 ciclos, y 68 grados C durante 3 min. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando un KOD FX NEO (TOYOBO, Osaka, Japón) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El fragmento de EGFP se insertó en el vector pcDNA5/FRT-FLAG-DsRed digerido con BamHIV SmaI (pcDNA5/FRT-FLAG-DsRed-EGFP).

60

65

Para recolectar las proteínas fluorescentes en el núcleo, se insertó la secuencia NLS (Señal localizada en el núcleo)

se insertó en el pcDNA5/FRT-Flag-DsRed-EGFP digerido con BamHI. La secuencia NLS se preparó hibridando dos oligonucleótidos 5'- ATGCCC-CAAAAAAAAAACGCAAAGTGGAGGCCAAAGGTACCAAAG-3' (SEQ ID NO: 25) y 5'- GATCCTTTGGTACCTTTGGGTCCTC-CACTTTGCGTTTTTTTTTTGGGGCATGTAC-3' (SEQ ID NO: 26) (pcDNA5/FRT-Flag-NLS-DsRed-EGFP).

5 Para generar los plásmidos de expresión estable del gen de distrofina humana, se obtuvo un fragmento genético de distrofina humana por medio de PCR con un genoma HepG2. El plásmido que contiene el fragmento del gen de distrofina tiene una secuencia de longitud completa del exón 37 al exón 39 excepto el intrón 57. La secuencia del intrón 47 (17683 pares de bases) es demasiado larga para insertarla en un plásmido, por lo tanto, una parte del intrón 57, la  
10 secuencia de +207 a +17486 se eliminó mediante la PCR utilizando un cebador directo 5'-AACGGTACC AACGCTGCT-GTTCTTTTTCA-3' (SEQ ID NO: 27) (incluyendo el sitio KpnI, subrayado), un cebador inverso 5'-AAATCGTCCATTACAAACACAGCGCTTTCC-3' (SEQ ID NO: 28) y un cebador directo 5'-GTGTTTGTAAATGGAC GATTTCTTAAAGGGTATT-3' (SEQ ID NO: 29), cebador inverso 5'-AGACCGGTACTCCTCAGCCTGCTTTTCGTA-3' (SEQ ID NO: 30) (incluyendo el sitio AgeI, subrayado). El fragmento se clonó en el vector pcDNA5/FRT-Flag-NLS-DsRed-EGFP digerido con KpnI/AgeI (pcDNA5/FRT-Flag-NLS-DMD-Exon57\_58\_59(intrón 57 corto)-DsRed-EGFP).

Todas las construcciones se verificaron con el analizador ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA. EE. UU.) o se secuenciaron con Fasmac (Kanagawa, Japón).

20 Establecimiento de línea celular estable. Se cultivaron las células Flp-In-293 (Invitrogen, Carlsbad, CA) en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Nacalaitesque, Kyoto, Japón) suplementado con un 10 % de suero bovino fetal (FBS) (Biowest, Nuaille, France), un 2 % de solución mixta de penicilina-estreptomicina (penicilina 10.000 unidades/ml, estreptomicina 10.000 microg/ml) (Nacalaitesque, Kyoto, Japón) y se seleccionaron con 100 mg/ml de Zeocina a 37 grados C. Se co-transfectaron el pcDNA5/FRT-Flag-Dys57>59di-NLS-DsRed-EGFP y pOG44 (plásmido de expresión de recombinasa Flp) (Invitrogen, Carlsbad, CA) en las células Flp-In-293. Las líneas celulares estables  
25 se seleccionaron en basándose en la resistencia a la Higromicina B 50 mg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Cultivo celular. La línea celular estable se cultivó en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Nacalaitesque, Kyoto, Japón) que contenía un 10 % de suero bovino fetal (FBS) (Biowest, Nuaille, France), un 2 % de solución mixta de penicilina-estreptomicina (penicilina 10.000 unidades/ml, estreptomicina 10.000 microg/ml) (Nacalaitesque, Kyoto, Japón).

Experimento *in vitro*. Las células se colocaron en placas en medio que contenía suero sin antibióticos en placas de 24 pocillos. Para las transfecciones basadas en lípidos, tanto los agentes de doble cadena como el control de cadena sencilla se mezclaron con lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante y se incubaron con las células en medio libre de suero durante 4 horas. Las células se lavaron una vez con PBS y se incubaron durante 20 horas en medio completo que contenía antibióticos, antes de la extracción de ARN. El ARNm se extrajo utilizando el kit Isogen (Gen Design, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc se sintetizó utilizando un Transcriptor Universal cDNA Master (Roche Applied Bioscience Corp.) de acuerdo con el protocolo. Se llevó a cabo una RT-PCR con SYBR Green Real Time PCR Master Mix (Roche Applied Bioscience Corp). Las secuencias de cebadores se muestran posteriormente.

Cebadores de análisis de omisión del Exón 58:

45 SEQ ID NO: 31 5'- AACGGTACCAACGCTGCTGTTCTTTTTCA-3'  
SEQ ID NO: 32 5'- CTTGGAGCCGTAAGTGA-3'

Cebadores del análisis de GAPDH:

50 SEQ ID NO: 33 5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'  
SEQ ID NO: 34 5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

Todos los cebadores se sintetizaron en Hokkaido System Sciences (Sapporo, Japón). Las condiciones de amplificación (temperatura y tiempo) eran: 10 segundos a 98 grados C, 15 segundos a 55 grados C, y 15 segundos a 72 grados C (un ciclo) se repitió durante 35 ciclos. Basándose en los resultados de la RT-PCR cuantitativa así obtenida, la cantidad de expresión de distrofina con omisión de exón/cantidad de expresión de gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; gen de referencia interno) se calcularon respectivamente, y los resultados de cada grupo se compararon con el grupo de control y se evaluaron mediante un ensayo t. Los resultados se presentan en el gráfico de la FIG. 12.

60 Resultados. Como se muestra por los resultados de la FIG. 12, el grado de omisión de exón conseguido con el agente de doble cadena de acuerdo con una realización es mayor que el que se consigue con los oligonucleótidos de cadena sencilla, y esa diferencia es estadísticamente significativa.

65 **Ejemplo 5**

Los inventores llevaron a cabo un experimento para evaluar la aplicación de un agente de ácido nucleico de doble cadena respecto a otro tipo de oligonucleótido antisentido, que tiene otra diana y estructura química. La diana era el intrón del pre-ARNm, apolipoproteína B. Las estructuras de polinucleótido que se muestran en la FIG. 13.

- 5 Los controles eran los LNA/ADN oligomérico con huecos. La secuencia, composición, y longitud de cadena de las cadenas eran las siguientes:

Primera cadena

- 10 (SEQ ID NO: 35) cadena de ARN 29mérico  
5'-C\*T\*C\*c\*c\*a\*c\*c\*a\*c\*a\*t\*a\*G\*C\*AGCGAUACCAAU\*C\*g-3'

Segunda cadena

- 15 (SEQ ID NO: 16) complemento de oligómero con huecos LNA/ADN 13mérico  
5'-C\*G\*a\*t\*t\*g\*t\*a\*t\*C\*G\*C-3'

Control de cadena sencilla

- 20 (SEQ ID NO: 36) intrón oligomérico con huecos 16mérico  
5'-C\*T\*C\*c\*c\*a\*c\*c\*a\*c\*a\*t\*a\*G\*C\*A-3'

(Las abreviaturas son como anteriormente)

- 25 El agente de doble cadena se preparó como en los Ejemplos 1 a 3. Es decir, el complemento de LNA/ADN y la cadena de ARN se mezclaron en cantidades equimolares, la solución se calentó a 95 grados C durante 5 minutos y depuse se enfrió y se mantuvo a 37 grados C durante una hora para hibridar de esta manera las cadenas de ácido nucleico y formar el agente de ácido nucleico de doble cadena. Los ácidos nucleicos hibridados se almacenaron a 4 grados C o sobre hielo.

- 30 Experimento *in vitro*. Las células Huh-7 (línea celular 7 de carcinoma hepatocelular humano) se cultivaron en condiciones de medio recomendadas. Las células se colocaron en placas en un medio que contenía medio sin antibióticos en placas de 24 pocillos. Para las transfecciones basadas en lípidos, el control de cadena sencilla y los agentes de doble cadena se mezclaron con lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen, ) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se incubaron con las células en medio libre de suero durante 4 horas. Las células se lavaron una vez con PBS y se incubaron durante 20 horas en medio completo que contenía antibióticos antes de la extracción de ARN. Se extrajo el ARNm utilizando el kit Isogen (Gene Design, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sintetizó el ADNc utilizando el Transcriptor Universal cDNA Master (Roche Applied Bioscience Corp.) de acuerdo con el protocolo. La RT-PCR cuantitativa se llevó a cabo por TaqMan (Roche Applied Bioscience Corp.). Los cebadores utilizados en la RT-PCR cuantitativa eran productos diseñados y producidos por Life Technologies Corp. Basándose en el número de distintos genes. Las condiciones de amplificación (temperatura y tiempo) eran: 15 segundos a 95 grados C, 30 segundos a 50 grados C, y 1 segundo a 72 grados C (un ciclo) se repitió durante 40 ciclos. Basándose en los resultados de la RT-PCR cuantitativa obtenida de esta manera, se calcularon respectivamente, la cantidad de expresión de ApoB/cantidad de expresión de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; gen de referencia interno), y los resultados para cada grupo se compararon y evaluaron por un ensayo t. Los resultados se presentan en el gráfico de la FIG. 14.

- 50 Resultados. Como se muestra en los resultados de la FIG. 14, el oligómero con huecos del intrón de cadena sencilla no mostraba una inhibición de la expresión de ARNm de ApoB con respecto al control negativo (solo con lipofectamina). Sin embargo, el agente de doble cadena de acuerdo con una realización conseguía una inhibición significativa del ARNm de ApoB.

### Ejemplo 6

- 55 Los inventores llevaron a cabo un experimento de evaluación de la aplicación de un agente de ácido nucleico de doble cadena, cuya segunda cadena se cambió del oligómero con huecos LNA/ADN 13mérico por un oligómero mixto LNA/ADN 13mérico. La diana era la misma que en los Ejemplos 2-3, el microARN122. Las estructuras de polinucleótido se muestran en la FIG. 15.

- 60 Los controles eran un antagomir 2'-O metilado ARN. La secuencia, composición, y longitud de cadena en las cadenas son las siguientes:

Primera cadena

- 65 (SEQ ID NO: 37) cadena de ARN 36mérico  
5'- a\*c\*aaacaccauugucacacuc\*c\*a\*UGAAUACCAAU\*g\*c-3'

## Segunda cadena

(SEQ ID NO: 4) complemento de oligómero mixto LNA/ADN 13mérico  
 5'-G\*c\*a\*t\*T\*g\*T\*a\*t\*t\*C\*A-3'

## Control de secuencia sencilla

(SEQ ID NO: 38) antagomiR(miR122) 23mérico  
 5'-a\*c\*aaacaccauugucacacuc\*c\*a-3'

(abreviaturas como anteriormente)

El agente de doble cadena se preparó como en los Ejemplos 1 a 5. ES decir, el complemento LNA/ADN y la cadena de ARN se mezclaron en cantidades equimolares. La solución se calentó a 95 grados C durante 5 minutos y después se enfrió y se mantuvo a 37 grados C durante una hora para hibridar de esta manera las cadenas de ácido nucleico y formar el agente de ácido nucleico. Los ácidos nucleicos se almacenaron a 4 grados C o sobre hielo.

Experimento in vitro. Las células Huh-7 (línea celular 7 de carcinoma hepatocelular humano) en condiciones de medio recomendadas. Las células se colocaron en placas en medio que contenía suero sin antibióticos en placas de 24 pocillos. Las transfecciones basadas en lípidos, el control de cadena sencilla y los agentes de doble cadena se mezclaron con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante y se incubaron con las células en medio libre de suero durante 4 horas. Las células se lavaron una vez con PBS y se incubaron durante 20 horas en medio completo que contenía antibióticos, antes de la extracción de ARN. Se extrajo el ARNm utilizando el kit Isogen (Gene Design, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sintetizó el ADNc utilizando el Transcriptor Universal cDNA Master (Roche Applied Bioscience Corp.) de acuerdo con el protocolo. La RT-PCR cuantitativa se llevó a cabo por TaqMan (Roche Applied Bioscience Corp.). Los cebadores utilizados en la RT-PCR cuantitativa eran productos diseñados y producidos por Life Technologies Corp. Basándose en el número de distintos genes. Las condiciones de amplificación (temperatura y tiempo) eran: 15 segundos a 95 grados C, 30 segundos a 50 grados C, y 1 segundo a 72 grados C (un ciclo) se repitió durante 40 ciclos. Basándose en los resultados de la RT-PCR cuantitativa obtenida de esta manera, se calcularon respectivamente la cantidad de expresión de microARN122 (miR122)/cantidad de expresión de microARN (U6; gen de referencia interno), y los resultados de cada grupo se compararon y evaluaron por un ensayo t. Los resultados se presentan en el gráfico de la FIG. 16.

Resultados. Ambos reactivos de ácido nucleico muestran una inhibición de la expresión de miR122 con respecto al control negativo (solo Lipofectamina). Sin embargo, el grado de inhibición conseguido con el agente de doble cadena de acuerdo con una realización es mayor que el que se consigue con los oligonucleótidos de cadena sencilla, y esa diferencia es estadísticamente significativa.

#### 40 Ejemplo 7

Los inventores llevaron a cabo un experimento de evaluación de la aplicación de otro agente de ácido nucleico de doble cadena, en la cual la segunda cadena se cambió del oligómero con huecos LNA/ADN 13mérico por un oligómero mixto LNA/ADN 13mérico. La diana era la misma que en el Ejemplo 4, el pre-ARNm de distrofina. El oligonucleótido en el ejemplo 6 es el oligonucleótido conmutador de corte in empalme (SSO), que inducía la omisión del exón 58 de la distrofina. Las estructuras de polinucleótido se muestran en la FIG. 17.

Los controles eran SSO de cadena sencilla. La secuencia, composición, y longitud de cadena de las cadenas eran las siguientes:

50

Primera cadena

(SEQ ID NO: 17) cadena de ARN 28mérico  
 5'-t\*C\*t\*g\*C\*g\*c\*I\*c\*c\*I\*g\*I\*aGCGAUACCAAU\*c\*g-3'

5

Segunda cadena

(SEQ ID NO: 4) complemento de oligomérico mixto LNA/ADN 13mérico  
 5'-G\*c\*a\*t\*I\*g\*I\*a\*t\*t\*C\*A-3'

10

Control de cadena sencilla

(SEQ ID NO: 18) SSO 15mérico  
 5'-t\*C\*t\*g\*C\*g\*c\*I\*c\*c\*I\*g\*I\*a-3'

15

(Abreviaturas como anteriormente)

El agente de doble cadena se preparó como en los Ejemplos 1 a 6. ES decir, el complemento LNA/ADN y la cadena de ARN se mezclaron con cantidades equimolares, la solución se calentó a 95 grados C durante 5 minutos y después se enfrió y se mantuvo a 37 grados C durante una hora para hibridar de esta manera las cadenas de ácido nucleico y formar el agente de ácido nucleico de doble cadena. Los ácidos nucleicos hibridados se almacenaron a 4 grados C o sobre hielo.

20

Experimento *in vitro*. Las condiciones experimentales eran las mismas que en el Ejemplo 4.

25

Resultados. Como se muestra por los resultados en la FIG. 18, el grado de omisión de exón conseguido con el agente de doble cadena de acuerdo con una realización es mayor que el que se consigue con los oligonucleótidos de cadena sencilla, y la diferencia es estadísticamente significativa.

### 30 Ejemplo 8

Los inventores llevaron a cabo un experimento para evaluar la aplicación de otro agente de ácido nucleico de doble cadena, en el que la segunda cadena se cambió del oligómero con huecos LNA/ADN 13mérico por un oligómero mixto LNA/ADN 13mérico. La diana era la misma que en el Ejemplo 5, el pre-ARNm del intrón, apolipoproteína B. Las estructuras polinucleotídicas se muestran en la FIG. 19.

35

Los controles eran el oligómero con huecos LNA/ADN. La secuencia, composición, y longitud de cadena de las cadenas eran de la siguiente manera:

40

Primera cadena

(SEQ ID NO: 35) Cadena de ARN 29mérico  
 5'-C\*I\*C\*c\*c\*a\*c\*c\*a\*t\*a\*G\*C\*AGCGAUACCAAU\*c\*g-3'

45

Segunda cadena

(SEQ ID NO: 4) complemento oligómero mixto LNA/ADN 13mérico  
 5'-G\*c\*a\*t\*I\*g\*I\*a\*t\*t\*C\*A-3'

50

Control de cadena sencilla

(SEQ ID NO: 36) oligómero con huecos del intrón 16mérico  
 5'-C\*I\*C\*c\*c\*a\*c\*c\*a\*t\*a\*G\*C\*A-3'

55

(Abreviaturas como anteriormente)

El agente de doble cadena se preparó como en los Ejemplos 1 a 3. Es decir, el complemento LNA/ADN y la cadena de ARN se mezclaron en cantidades equimolares, la solución se calentó a 95 grados C durante 5 minutos y después se enfrió y se mantuvo a 37 grados C durante una hora para hibridar de esta manera las cadenas de ácido nucleico y formar el agente de ácido nucleico de doble cadena. Los ácidos nucleicos hibridados se almacenaron a 4 grados C o sobre hielo.

60

Experimento *in vitro*. Las condiciones experimentales eran las mismas que en el Ejemplo 5.

Resultados. Como se muestra por los resultados en la FIG. 20, el oligómero con huecos del intrón de cadena sencilla no mostraba una inhibición en la expresión del ARNm de ApoB con respecto al control negativo (solo Lipofectamina).

65

Sin embargo, el agente de doble cadena de acuerdo con una realización conseguía la inhibición significativa de ARNm ApoB de una manera dependiente de la dosis.

### Ejemplo 9

5 Los inventores llevaron a cabo un experimento que evalúa la aplicación de un agente de ácido nucleico de doble cadena, en el que el lugar del agente de ácido nucleico se cambió desde el extremo 5' de la cadena de ARN al extremo 3'. La diana era la misma que en el Ejemplo 2-3, el microARN122. Las estructuras de polinucleótido se muestran en la FIG. 21.

10 Los controles eran un oligómero mixto LNA/ADN anti-miR122 (el miravirsén (marca registrada)). La secuencia, composición, y longitud de cadena de las cadenas eran de la siguiente manera:

#### Primera cadena

15 (SEQ ID NO: 15) cadena 5' de ARN 28mérica  
 5'-C\*c\*A\*t\*t\*G\*T\*c\*a\*C\*a\*C\*t\*C\*CGCGAUACCAAU\*c\*g.-3'  
 (SEQ ID NO: 39) cadena 3' de ARN 28mérica  
 5'.g\*c\*g\*AUACCAAUCGC\*c\*A\*t\*t\*G\*T\*c\*a\*C\*a\*C\*t\*C\*-3'

#### Segunda cadena

20 (SEQ ID NO: 16) complemento oligómero mixto LNA/ADN 13mérico  
 5'-C\*G\*a\*t\*t\*g\*g\*t\*a\*t\*C\*G\*C'-3'

#### Control de cadena sencilla

25 (SEQ ID NO: 14) AntimiR(miR122) 23mérico  
 5'-C\*c\*A\*t\*t\*G\*T\*c\*a\*C\*a\*C\*t\*C\*-3'

30 (Abreviaturas como anteriormente)

El agente de doble cadena se preparó como en los Ejemplos 1 a 5. Es decir, el complemento LNA/ADN y la cadena de ARN se mezclaron en cantidades equimolares, la solución se calentó a 95 grados C durante 5 minutos y entonces se enfrió y se mantuvo a 37 grados C durante una hora para hibridar de esta manera las cadenas de ácido nucleico y formar el agente de ácido nucleico de doble cadena. Los ácidos nucleicos hibridados se almacenaron a 4 grados C o sobre hielo.

#### Experimento *in vitro*.

40 Se cultivaron las células Huh-7 (línea celular 7 de carcinoma hepatocelular humano) en condiciones de medio recomendadas. Las células se colocaron en placas en un medio que contenía suero sin antibióticos en placas de 24 pocillos. Para las transfecciones basadas en lípidos, el control de cadena sencilla y los agentes de doble cadena se mezclaron con Lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se incubaron con las células en medio libre de suero durante 4 horas. Las células se lavaron una vez con PBS y se incubaron durante 20 horas en medio completo que contenía antibióticos antes de la extracción de ARN. Se extrajo el microARN utilizando el kit Isogen (Gene Design, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sintetizó el ADNc utilizando el Transcriptor Universal cDNA Master (Roche Applied Bioscience Corp.) de acuerdo con el protocolo. Se llevó a cabo la RT-PCR por TaqMan (Roche Applied Bioscience Corp.). Los cebadores utilizados en la RT-PCR cuantitativa eran productos diseñados y producidos por Life Technologies Corp. Basándose en el número de distintos genes. Las condiciones de amplificación (temperatura y tiempo) eran: 15 segundos a 95 grados C, 30 segundos a 60 grados C, y 1 segundo a 72 grados C (un ciclo) se repitió durante 40 ciclos. Basándose en los resultados de la RT-PCR cuantitativa obtenida de esa manera, la cantidad de expresión del microARN (miR122) (U6: gen de referencia interna) se calcularon respectivamente, y los resultados de cada grupo se compararon y evaluaron por un ensayo t. Los resultados se presentaron en el gráfico de la FIG. 22.

Resultados. Tanto el anti-miR-5' y el anti-miR-3' de doble cadena muestra una inhibición de la expresión de miR122 con respecto al control negativo (solo Lipofectamina) y el anti-miR de cadena sencilla. Sin embargo, el grado de inhibición conseguida con el anti-miR-3' de doble cadena es menor que el conseguido con el anti-miR-5' de doble cadena.

#### Resultado

60 Como se muestra por el resultado de la FIG. 22, los tres reactivos de ácido nucleico presentaban una inhibición de la expresión de miR122 con respecto al control negativo (solo PBS). Sin embargo, el grado de inhibición conseguido con el anti-miR-5' de doble cadena es más que el conseguido con el anti-miR-3' de doble cadena, y esa diferencia es estadísticamente significativa.

**Texto libre del listado de secuencias**

5 1-20, 35-39 sintéticas  
21-34 cebadores

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> National University Corporation Tokyo Medical and Dental University  
<120> AGENTES DE DOBLE CADENA PARA EL SUMINISTRO DE OLIGONUCLEÓTIDOS TERAPÉUTICOS  
<130> PH-5873-PCT

15 <150> US 61/829.239  
<151> 30-05-2013  
<160> 39

20 <170> PatentIn versión 3.5  
<210> 1  
<211> 31  
<212> ARN  
25 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sintética

30 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1) .. (2), (2).. (3), (3).. (4), (12) .. (13), (13) .. (14), (28) .. (29),  
(29).. (30), (30).. (31)  
<223> Enlace fosforotioato

35 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(1), (2).. (2), (3).. (3), (12) .. (12), (13) .. (13), (14) .. (14),  
40 (15).. (15), (16).. (16), (17).. (17), (18).. (18), (19) .. (19), (20) .. (20) ,  
(21).. (21), (22).. (22), (23).. (23), (24) .. (24), (25) . . (25), (26) .. (26),  
(27).. (27), (28).. (28), (29) .. (29), (30) .. (30), (31) .. (31)  
<223> 2-o-Me

<400> 1  
ugaauaccaa ugcuaacgcau acgcaccacc a 31

45 <210> 2  
<211> 31  
<212> ARN  
50 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sintética

55 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1) .. (2), (2).. (3), (3).. (4), (12) .. (13), (13) .. (14), (28) .. (29),  
(29).. (30), (30).. (31)  
<223> Enlace fosforotioato

60 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(1), (2).. (2), (3).. (3), (4) .. (4) , (5) .. (5) , (6) .. (6) , (7) .. (7) ,  
65 (8).. (8), (9).. (9), (10).. (10), (11).. (11), (12).. (12), (13) .. (13) ,  
(14).. (14), (15).. (15), (16).. (16), (17).. (17), (18) .. (18), (19) .. (19) ,

ES 2 700 277 T3

(20).. (20), (21).. (21), (22).. (22), (23) .. (23), (24) .. (24), (25) .. (25),  
 (26).. (26), (27).. (27), (28) .. (28), (29) .. (29), (30) .. (30), (31) .. (31)  
 <223> 2-o-Me

5 <400> 2 **ugaauaccaa ugcuaacgcau acgcaccacc a** 31

<210> 3  
 <211> 13

10 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sintética

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1) .. (2) , (2).. (3), (3).. (4), (4) .. (5) , (5) .. (6) , (6) .. (7) , (7) .. (8) ,  
 (8).. (9), (9).. (10), (10).. (11), (11).. (12), (12).. (13)  
 20 <223> Enlace fosforotioato

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1), (2).. (2), (11).. (11), (12).. (12), (13) .. (13)  
 25 <223> LNA

<400> 3  
**gcattggtat tca**

13

30 <210> 4  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Sintética

<220>  
 <221> misc\_feature  
 40 <222> (1) .. (2) , (2).. (3), (3).. (4), (4) .. (5) , (5) .. (6) , (6) .. (7) , (7) .. (8) ,  
 (8).. (9), (9).. (10), (10).. (11), (11).. (12), (12).. (13)  
 <223> Enlace fosforotioato

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1), (5).. (5), (8).. (8), (12) .. (12), (13) .. (13)  
 <223> LNA

<400> 4  
**gcattggtat tca**

13

50 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 55 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sintética

60 <400> 5  
**gcuacgcaua cgcaccacca**

20

<210> 6

	<211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
5	<220> <223> Sintética	
	<400> 6 <b>augcuacgca uacgcaccac ca</b>	<b>22</b>
10	<210> 7 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial	
15	<220> <223> Sintética	
	<400> 7 <b>aaugcuacgc auacgcacca cca</b>	<b>23</b>
20	<210> 8 <211> 24 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> Sintética	
30	<400> 8 <b>caaugcuacg cauacgcacc acca</b>	<b>24</b>
35	<210> 9 <211> 25 <212> ARN <213> Artificial	
40	<220> <223> Sintética	
	<400> 9 <b>ccaaugcuac gc auacgcac cacca</b>	<b>25</b>
45	<210> 10 <211> 31 <212> ARN <213> Artificial	
50	<220> <223> Sintética	
	<400> 10 <b>ugaauaccaa ugc uacgc au acgcaccacc a</b>	<b>31</b>
55	<210> 11 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Sintética	

	<400> 11 tggtgctgat gcgtagcagt ggtattca	28
5	<210> 12 <211> 36 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> Sintética	
	<220> <221> misc_feature	
15	<222> (1) .. (2), (2).. (3), (21).. (22), (22) .. (23), (23) .. (24), (34) .. (35), (35)..(36) <223> Enlace fosforotioato	
	<220> <221> misc_feature	
20	<222> (1)..(1), (2).. (2), (3).. (3), (4) .. (4) , (5) .. (5) , (6) .. (6) , (7) .. (7) , (8).. (8), (9).. (9), (10).. (10), (11).. (11), (12).. (12), (13) .. (13), (14).. (14), (15).. (15), (16).. (16), (17).. (17), (18) .. (18), (19) ..(19) , (20).. (20), (21).. (21), (22).. (22), (23) .. (23), (35) .. (35), (36) ..(36)	
25	<223> 2-o-Me	
	<400> 12 acaaacacca uugucacacu ccaugaauac caaugc	36
30	<210> 13 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Sintética	
	<220> <221> misc_feature	
40	<222> (1) .. (2) , (2).. (3), (3).. (4), (4) .. (5) , (5) .. (6) , (6) .. (7) , (7) .. (8) , (8).. (9), (9).. (10), (10).. (11), (11).. (12), (12).. (13) <223> Enlace fosforotioato	
	<220> <221> misc_feature	
45	<222> (1)..(1), (2).. (2), (11).. (11), (12).. (12), (13) .. (13) <223> LNA	
	<400> 13 gcattggtat tca	13
50	<210> 14 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Sintética	
60	<220> <221> misc_feature	
	<222> (1) .. (2) , (2).. (3), (3).. (4), (4) .. (5) , (5) .. (6) , (6) .. (7) , (7) .. (8) , (8).. (9), (9).. (10), (10).. (11), (11).. (12), (12).. (13), (13) .. (14) , (14)..(15)	

<223> Enlace fosforotioato

<220>  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> (1)..(1), (3).. (3), (6).. (6), (7) .. (7), (10) .. (10), (12) .. (12),  
 (14).. (14), (15).. (15)  
 <223> LNA

<400> 14  
 10 **ccattgtcac actcc** 15

<210> 15  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 15 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sintética

20 <220>  
 <223> molécula ADN/ARN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 25 <222> (1) .. (2) , (2).. (3), (3).. (4), (4) .. (5) , (5) .. (6) , (6) .. (7) , (7) .. (8) ,  
 (8).. (9), (9).. (10), (10).. (11), (11).. (12), (12).. (13), (13) .. (14) ,  
 (14).. (15), (26).. (27), (27).. (28)  
 <223> Enlace fosforotioato

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1), (3).. (3), (6).. (6), (7) .. (7), (10) .. (10), (12) .. (12) ,  
 (14).. (14), (15).. (15)  
 <223> LNA

35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (27).. (27), (28) .. (28)  
 <223> 2-o-Me

40 <400> 15  
**ccattgtcac actccgcgau accaaucg** 28

<210> 16  
 45 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 50 <223> Sintética

<220>  
 <221> misc\_feature  
 55 <222> (1) .. (2) , (2).. (3), (3).. (4), (4) .. (5) , (5) .. (6) , (6) .. (7) , (7) .. (8) ,  
 (8).. (9), (9).. (10), (10).. (11), (11).. (12), (12).. (13)  
 <223> Enlace fosforotioato

<220>  
 <221> misc\_feature  
 60 <222> (1)..(1), (2).. (2), (11).. (11), (12).. (12), (13) .. (13)  
 <223> LNA

<400> 16  
**cgattggtat cgc** 13

- <210> 17  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintética  
  
 10 <220>  
 <223> molécula ADN/ARN  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 15 <222> (1) .. (2) , (2).. (3), (3).. (4), (4) .. (5) , (5) .. (6) , (6) .. (7) , (7) .. (8) ,  
 (8).. (9), (9).. (10), (10).. (11), (11).. (12), (12).. (13), (13) .. (14) ,  
 (14).. (15), (26).. (27), (27).. (28)  
 <223> Enlace fosforotioato  
  
 20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2).. (2), (5).. (5), (8) .. (8), (11) .. (11), (14) .. (14)  
 <223> LNA  
  
 25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (27).. (27), (28) .. (28)  
 <223> 2-o-Me  
  
 30 <400> 17  
 tctgggctcc tggtagcgau accaaucg 28
  
  
 <210> 18  
 <211> 15  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintética  
  
 40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1) .. (2) , (2).. (3), (3).. (4), (4) .. (5) , (5) .. (6) , (6) .. (7) , (7) .. (8) ,  
 (8).. (9), (9).. (10), (10).. (11), (11).. (12), (12).. (13), (13) .. (14) ,  
 45 (14)..(15)  
 <223> Enlace fosforotioato  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 50 <222> (2).. (2), (5).. (5), (8) .. (8), (11) .. (11), (14) .. (14)  
 <223> LNA  
  
 <400> 18  
 tctgggctcc tggta 15
  
 55 <210> 19  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 60 <220>  
 <223> Sintética  
 <400> 19

	agcttaccat ggattacaag gacgacgacg acaagggggt ac	42
5	<210> 20 <211> 34 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Sintética  <400> 20 ccccttgtcg tcgtcgtcct tgtaatccat ggta	34
15	<210> 21 <211> 29 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador  <400> 21 cccgggtgtg agcaagggcg aggagctgt	29
25	<210> 22 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador  <400> 22 atagggccct tacttgtaca gctcgtccat	30
35	<210> 23 <211> 39 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Cebador  <400> 23 atatggatcc aaccgggtgtg gcctcctccg aggacgtca	39
45	<210> 24 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Cebador  <400> 24 cggctctacag gaacaggtgg tggc	24
55	<210> 25 <211> 47 <212> ADN <213> Artificial <220>	
60		

ES 2 700 277 T3

<223> Cebador

<400> 25  
 atgccccaaa aaaaaaacgc aaagtggagg acccaaaggt accaaag 47

5  
 <210> 26  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10  
 <220>  
 <223> Cebador

<400> 26  
 gatcctttgg tacctttggg tcctccactt tgcgtttttt ttttggggca tgtac 55

15  
 <210> 27  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20  
 <220>  
 <223> Cebador

<400> 27  
 aacggtacca acgctgctgt tctttttca 29

25  
 <210> 28  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30  
 <220>  
 <223> Cebador

35  
 <400> 28  
 aaatcgtcca ttacaaacac agcgctttcc 30

40  
 <210> 29  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

45  
 <220>  
 <223> Cebador

<400> 29  
 gtgtttgtaa tggacgattt cttaaagggt att 33

50  
 <210> 30  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

55  
 <220>  
 <223> Cebador

<400> 30  
 agaccggtac tcctcagcct gctttcgta 29

60  
 <210> 31  
 <211> 29

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador	
	<400> 31	
	<b>aacggtacca acgctgctgt tctttttca</b>	<b>29</b>
10	<210> 32	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 32	
	<b>cttggagccg tactggaact</b>	<b>20</b>
20	<210> 33	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 33	
30	<b>accacagtcc atgccatcac</b>	<b>20</b>
	<210> 34	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
40	<400> 34	
	<b>tccaccaccc tgttgctgta</b>	<b>20</b>
	<210> 35	
	<211> 29	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
50	<220>	
	<223> molécula ADN/ARN	
	<220>	
55	<221> misc_feature	
	<222> (1) .. (2) , (2).. (3), (3).. (4), (4) .. (5) , (5) .. (6) , (6) .. (7) , (7) .. (8),	
	(8).. (9), (9).. (10), (10).. (11), (11).. (12), (12).. (13), (13) .. (14) ,	
	(14).. (15), (15).. (16), (27).. (28), (28) .. (29)	
	<223> Enlace fosforotioato	
60	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1), (2).. (2), (3).. (3), (14) .. (14), (15) .. (15), (16) .. (16)	
	<223> LNA	

	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (28)..(28), (29) .. (29)	
5	<223> 2-o-Me	
	<400> 35	
	<b>ctcccaccac atagcagcga uaccaaucg</b>	29
10	<210> 36	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Sintética	
	<220>	
	<221> misc_feature	
20	<222> (1) .. (2) , (2).. (3) , (3).. (4) , (4) .. (5) , (5) .. (6) , (6) .. (7) , (7) .. (8) , (8).. (9) , (9).. (10) , (10).. (11) , (11).. (12) , (12).. (13) , (13) .. (14) , (14).. (15) , (15).. (16)	
	<223> Enlace fosforotioato	
25	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1), (2).. (2) , (3).. (3) , (14) .. (14) , (15) .. (15) , (16) .. (16)	
	<223> LNA	
30	<400> 36	
	<b>ctcccaccac atagca</b>	16
	<210> 37	
	<211> 36	
35	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
40	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) .. (2) , (2).. (3) , (21).. (22) , (22) .. (23) , (23) .. (24) , (34) .. (35) , (35)..(36)	
45	<223> Enlace fosforotioato	
	<220>	
	<221> misc_feature	
50	<222> (1)..(1), (2).. (2) , (3).. (3) , (4) .. (4) , (5) .. (5) , (6) .. (6) , (7).. (7) , (8).. (8) , (9).. (9) , (10).. (10) , (11).. (11) , (12).. (12) , (13) .. (13) , (14).. (14) , (15).. (15) , (16).. (16) , (17).. (17) , (18) .. (18) , (19) . . (19) , (20).. (20) , (21).. (21) , (22).. (22) , (23) .. (23) , (35) .. (35) , (36) .. (36)	
	<223> 2-o-Me	
55	<400> 37	
	<b>acaaacacca uugucacacu ccaugaauac caaugc</b>	36
	<210> 38	
	<211> 23	
60	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Sintética	
65	<220>	

<221> misc\_feature  
 <222> (1) .. (2), (2).. (3), (21).. (22), (22) .. (23)  
 <223> Enlace fosforotioato

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1), (2).. (2), (3).. (3), (4) .. (4) , (5) .. (5) , (6) . . (6) , (7)..(7),  
 (8).. (8), (9).. (9), (10).. (10), (11).. (11), (12).. (12), (13) .. (13) ,  
 (14).. (14), (15).. (15), (16).. (16), (17).. (17), (18) .. (18), (19) .. (19) ,  
 10 (20).. (20), (21).. (21), (22).. (22), (23) ..(23)  
 <223> 2-o-Me

<400> 38  
**acaaacacca uugucacacu cca** 23

15 <210> 39  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Sintética

<220>  
 25 <223> molécula ADN/ARN

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1) .. (2), (2).. (3), (3).. (4), (14) .. (15), (15) .. (16), (16) .. (17),  
 30 (17).. (18), (18).. (19), (19).. (20), (20).. (21), (21) .. (22), (22) .. (23),  
 (23).. (24), (25).. (26), (26) .. (27), (27) .. (28)  
 <223> Enlace fosforotioato

<220>  
 35 <221> misc\_feature  
 <222> (14).. (14), (16).. (16), (19) .. (19), (20) .. (20), (23) .. (23),  
 (25).. (25), (27).. (27), (28) .. (28)  
 <223> LNA

40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1), (2).. (2), (3).. (3)  
 <223> 2-o-Me

45 <400> 39  
**gcgauaccaa ucgccattgt cacactcc** 28

## REIVINDICACIONES

1. Un agente de ácido nucleico de doble cadena que comprende una primera cadena de ácido nucleico hibridada con una segunda cadena de ácido nucleico, en el que:

5 la primera cadena de ácido nucleico comprende (i) una primera región de ARN con al menos 2 nucleótidos de ARN consecutivos que pueden ser reconocidos por una RNasa H cuando la primera cadena de ácido nucleico se hibrida con la segunda cadena de ácido nucleico, (ii) una región de oligonucleótido terapéutico en la que al menos un enlace entre nucleótidos del extremo 3' y el 5' de la región del oligonucleótido terapéutico es más resistente a nucleasas que un enlace entre nucleótidos natural, y (iii) al menos un enlace entre nucleótidos en el extremo 3' y el extremo 5' de la primera cadena de ácido nucleico es más resistente a nucleasas que un enlace entre nucleótidos natural;

10 la segunda cadena de ácido nucleico comprende (i) una primera región de ADN que se hibrida con la primera región de ARN de la primera cadena de ácido nucleico y puede promover el reconocimiento de al menos 2 nucleótidos de ARN consecutivos de la primera cadena de ácido nucleico por la RNasa H, y (ii) al menos un enlace entre nucleótidos en el extremo 3' y el 5' de la segunda cadena de ácido nucleico es más resistente a nucleasas que un enlace entre nucleótidos natural; y

15 la región del oligonucleótido terapéutico de la primera cadena de ácido nucleico que no es capaz de hibridarse con la segunda cadena de ácido nucleico y el agente de ácido nucleico de doble cadena comprenden adicionalmente un resto de direccionamiento que se selecciona de entre un lípido, un azúcar, un péptido y una proteína y se unen al nucleótido del extremo 3' o al nucleótido del extremo 5' de la segunda cadena de ácido nucleico, o al nucleótido del extremo 3' o el nucleótido del extremo 5' de la primera cadena de ácido nucleico.

25 2. El agente de ácido nucleico de doble cadena de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la primera cadena de ácido nucleico y la segunda cadena de ácido nucleico comprenden nucleótidos seleccionados de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ADN, análogos de nucleótido y nucleótidos de PNA.

30 3. El agente de ácido nucleico de doble cadena de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la primera cadena de ácido nucleico comprende nucleótidos seleccionados de entre nucleótidos de ADN, nucleótidos de ARN, análogos de nucleótido y nucleótidos de PNA, y la segunda cadena de ácido nucleico comprende nucleótidos seleccionados de entre nucleótidos de ADN, análogos de nucleótido y nucleótidos de PNA.

35 4. El agente de ácido nucleico de doble cadena de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la región de oligonucleótido terapéutico comprende un oligonucleótido seleccionado de entre un oligonucleótido antisentido, un oligonucleótido antagomir, un oligonucleótido conmutador de corte y empalme, un oligonucleótido de ARNip de cadena sencilla, un ARNip de doble cadena, un microARN, un pre-microARN, y un aptámero.

40 5. El agente de ácido nucleico de doble cadena de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el oligonucleótido antagomir es un oligómero mixto, está compuesto por un tipo de nucleótido o análogo de nucleótido, o es un oligómero con huecos.

45 6. El agente de ácido nucleico de doble cadena de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el oligonucleótido antagomir comprende al menos un nucleótido seleccionad de entre 2'-OMe ARN, MOE, CET, ENA, LNA y AmNA, y al menos un enlace entre nucleótidos está opcionalmente fosforotioado.

7. El agente de ácido nucleico de doble cadena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la segunda cadena de ácido nucleico es un oligómero con huecos o un oligómero mixto.

50 8. El agente de ácido nucleico de doble cadena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la primera cadena de ácido nucleico comprende uno o más nucleótidos seleccionados de entre nucleótidos de ARN modificados y análogos de nucleótido localizados en 5' y localizados en 3' respecto a al menos 2 nucleótidos de ARN consecutivos que pueden ser reconocidos por la RNasa H.

55 9. El agente de ácido nucleico de doble cadena de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el uno o más nucleótidos localizados en 5' y localizados en 3' respecto a al menos 2 nucleótidos de ARN consecutivos que pueden ser reconocidos por la RNasa H se seleccionan independientemente de entre nucleótidos LNA, nucleótidos BNA, nucleótidos de ARN 2'-O-Me y nucleótidos de ARN 2'-O-metoxietil.

60 10. El agente de ácido nucleico de doble cadena de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende un a primea cadena de ácido nucleico hibridada a una segunda cadena de ácido nucleico, en donde:

65 la primera cadena de ácido nucleico comprende (i) una primera región de ARN con al menos 2 nucleótidos de ARN consecutivos que pueden ser reconocidos por la RNasa H cuando la primera cadena de ácido nucleico se hibrida con la segunda cadena de ácido nucleico, (ii) uno o más nucleótidos seleccionados de entre nucleótidos de ARN modificados y análogos de nucleótido localizados en 5' y localizados en 3' respecto a al menos 2 nucleótidos de ARN consecutivos que son reconocidos por la RNasa H, (iii) una región de oligonucleótido terapéutico que

comprende uno o más nucleótidos en los extremos 3' y 5' seleccionados de entre nucleótidos de ARN modificados y análogos de nucleótido y que están opcionalmente fosforotioados independientemente y en el que al menos un enlace entre nucleótidos en los extremos 3' y 5' de la región de oligonucleótido terapéutico es más resistente a nucleasas que un enlace entre nucleótidos natural, (iv) un resto de direccionamiento seleccionado de entre un lípido, un péptido y una proteína unida al nucleótido del extremo 3' y al nucleótido del extremo 5', (v) el número total de nucleótidos en la primera cadena de ácido nucleico es de 12 a 100 y (vi) al menos un enlace entre nucleótidos en los extremos 3' y 5' de la primera cadena de ácido nucleico es más resistente a nucleasas que un enlace entre nucleótidos natural;

la segunda cadena de ácido nucleico comprende (i) una primera región de ADN que se hibrida con la primera región de ARN de la primera cadena de ácido nucleico y puede promover el reconocimiento de al menos 2 nucleótidos de ARN consecutivos de la primera cadena de ácido nucleico por la RNasa H, (ii) uno o más nucleótidos seleccionados de entre nucleótidos de ADN modificado y análogos de nucleótido localizados en 5' o localizados en 3' de la primera región de ADN y que están opcionalmente fosforotioados independientemente, y (iii) al menos un enlace entre nucleótidos en los extremos 3' y 5' de la segunda cadena de ácido nucleico es más resistente a nucleasas que un enlace entre nucleótidos natural; y

la región del oligonucleótido terapéutico de la primera cadena de ácido nucleico no es capaz de hibridarse con la segunda cadena de ácido nucleico.

11. El agente de ácido nucleico de doble cadena de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende un a primera cadena de ácido nucleico hibridada a una segunda cadena de ácido nucleico, en el que:

la primera cadena de ácido nucleico comprende (i) una primera región de ARN con al menos 2 nucleótidos de ARN consecutivos que pueden ser reconocidos por la RNasa H cuando la primera cadena de ácido nucleico se hibrida con la segunda cadena de ácido nucleico, (ii) una región de oligonucleótido terapéutico en la que al menos un enlace entre nucleótidos en los extremos 3' y 5' de la región de oligonucleótido terapéutico es más resistente a nucleasas que un enlace entre nucleótidos natural, (iii), al menos un enlace entre nucleótidos en los extremos 3' y 5' de la primera cadena de ácido nucleico es más resistente a nucleasas que un enlace entre nucleótidos natural, y (iv) el número total de nucleótidos en la primera cadena de ácido nucleico es de 12 a 100 y (vi);

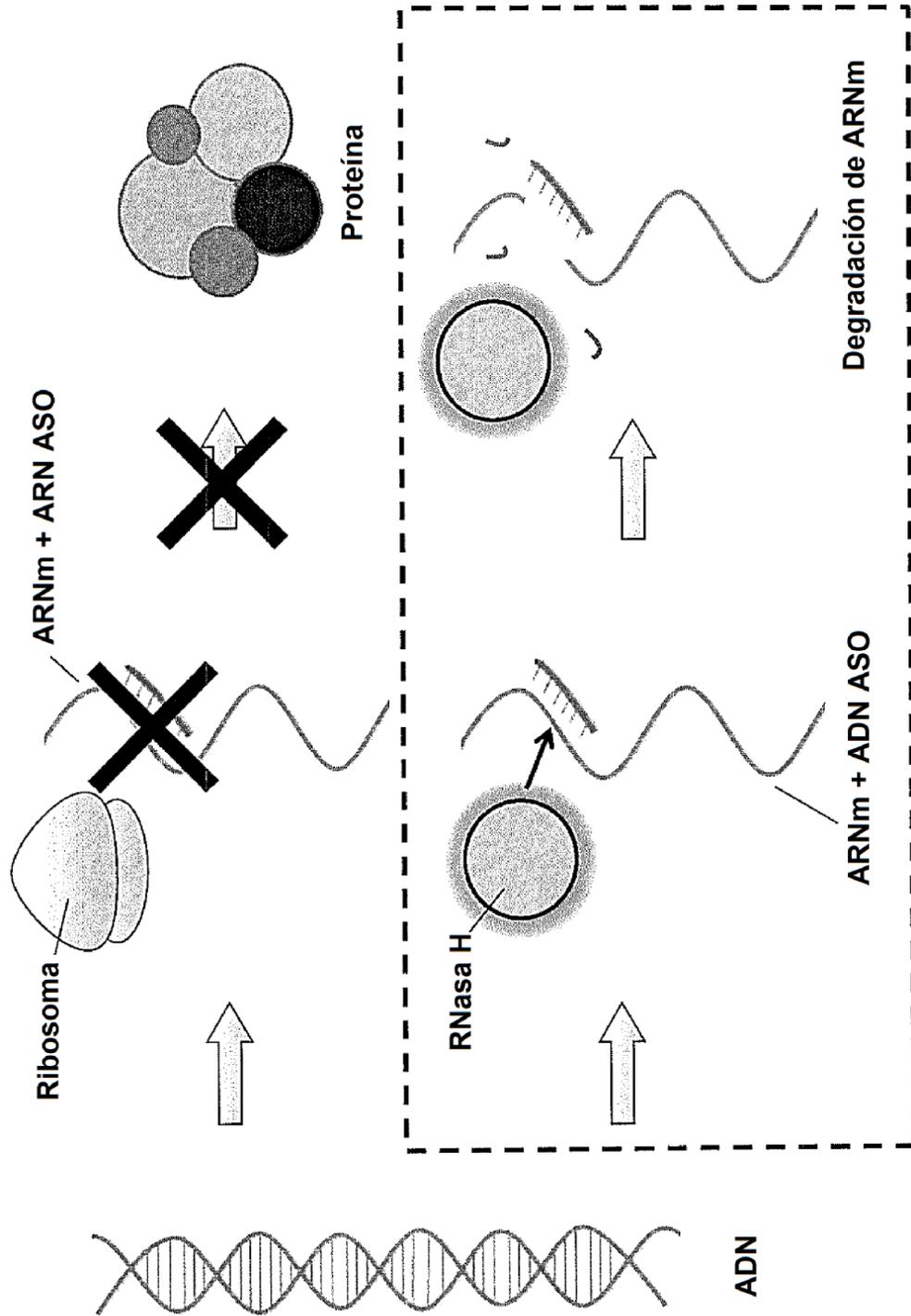
la segunda cadena de ácido nucleico comprende (i) una primera región de ADN que se hibrida con la primera región de ARN de la primera cadena de ácido nucleico y puede promover el reconocimiento de al menos 2 nucleótidos de ARN consecutivos de la primera cadena de ácido nucleico por la RNasa H, (ii) al menos un enlace entre nucleótidos en los extremos 3' y 5' de la segunda cadena de ácido nucleico es más resistente a nucleasas que un enlace entre nucleótidos natural; y (iii) el número total de nucleótidos de la segunda cadena de ácido nucleico es al menos 8; y

la región del oligonucleótido terapéutico de la primera cadena de ácido nucleico no es capaz de hibridarse con la segunda cadena de ácido nucleico en una célula de mamífero a temperatura fisiológica.

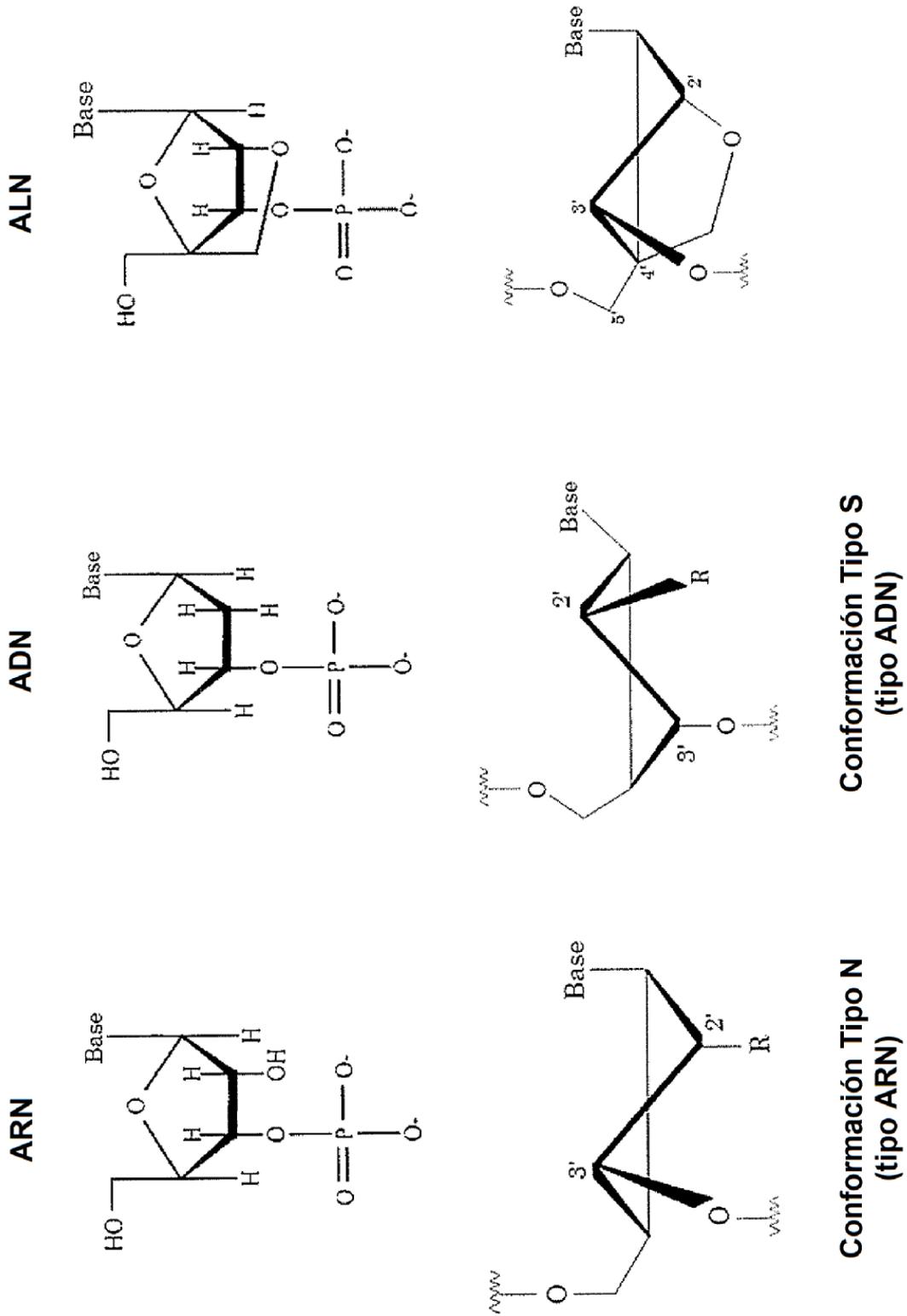
12. Una composición que comprende un agente de ácido nucleico de doble cadena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para su uso en un método de terapia que comprende el suministro del agente terapéutico a una célula.

13. Un método no terapéutico de suministro de un oligonucleótido terapéutico a una célula en una muestra biológica, que comprende poner en contacto la célula con una composición que comprende un agente de ácido nucleico de doble cadena de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

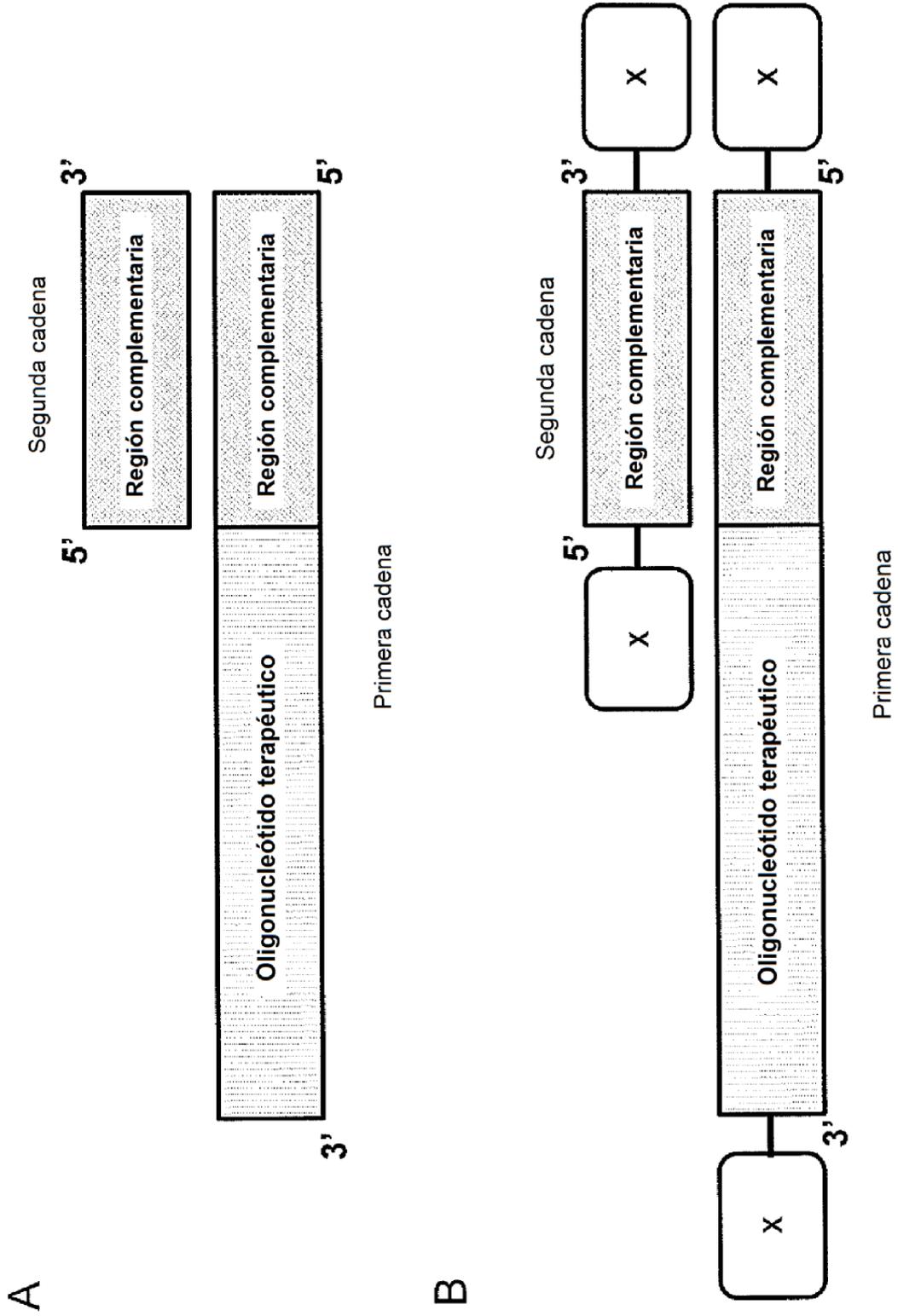
[Fig. 1]



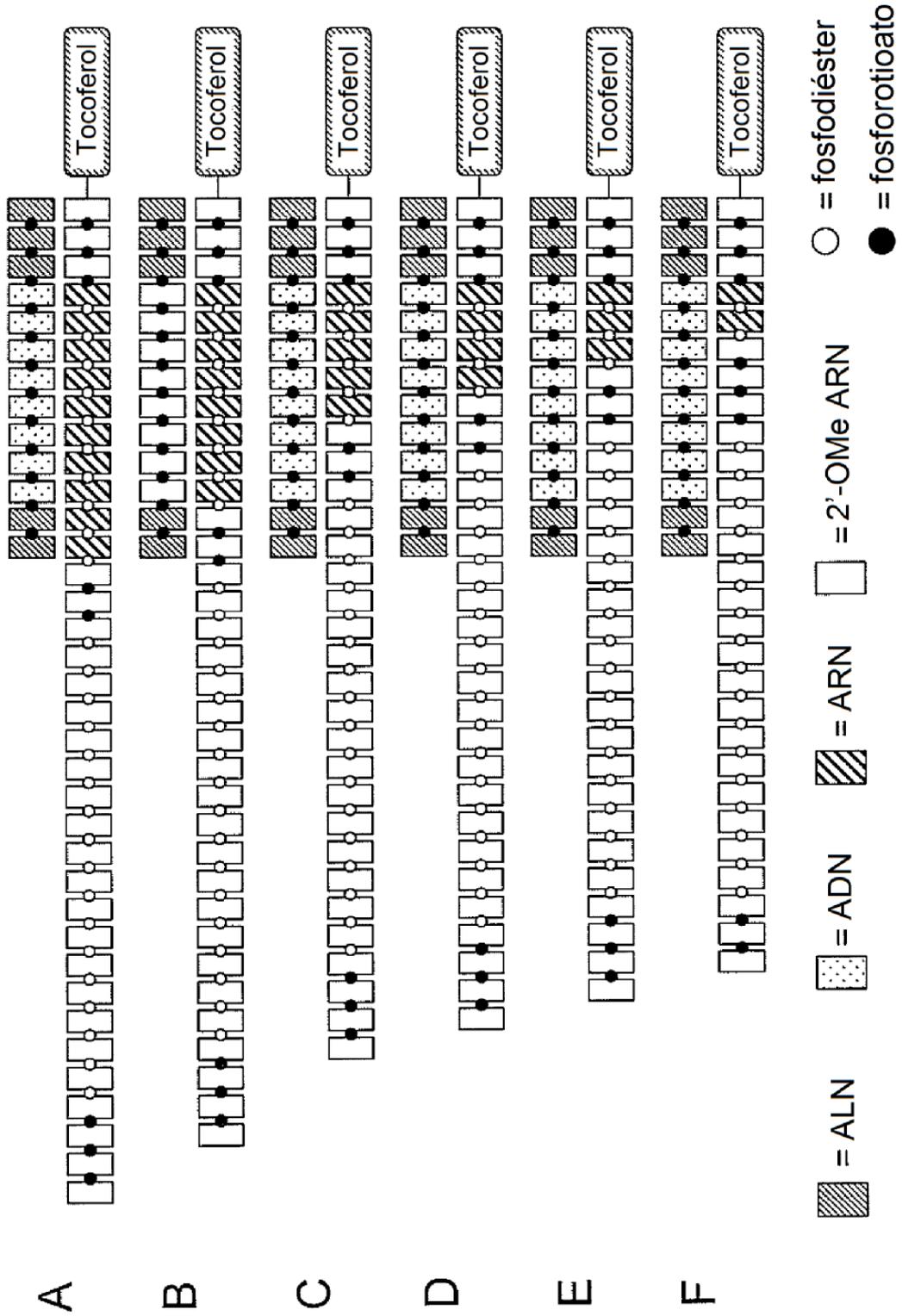
[Fig. 2]



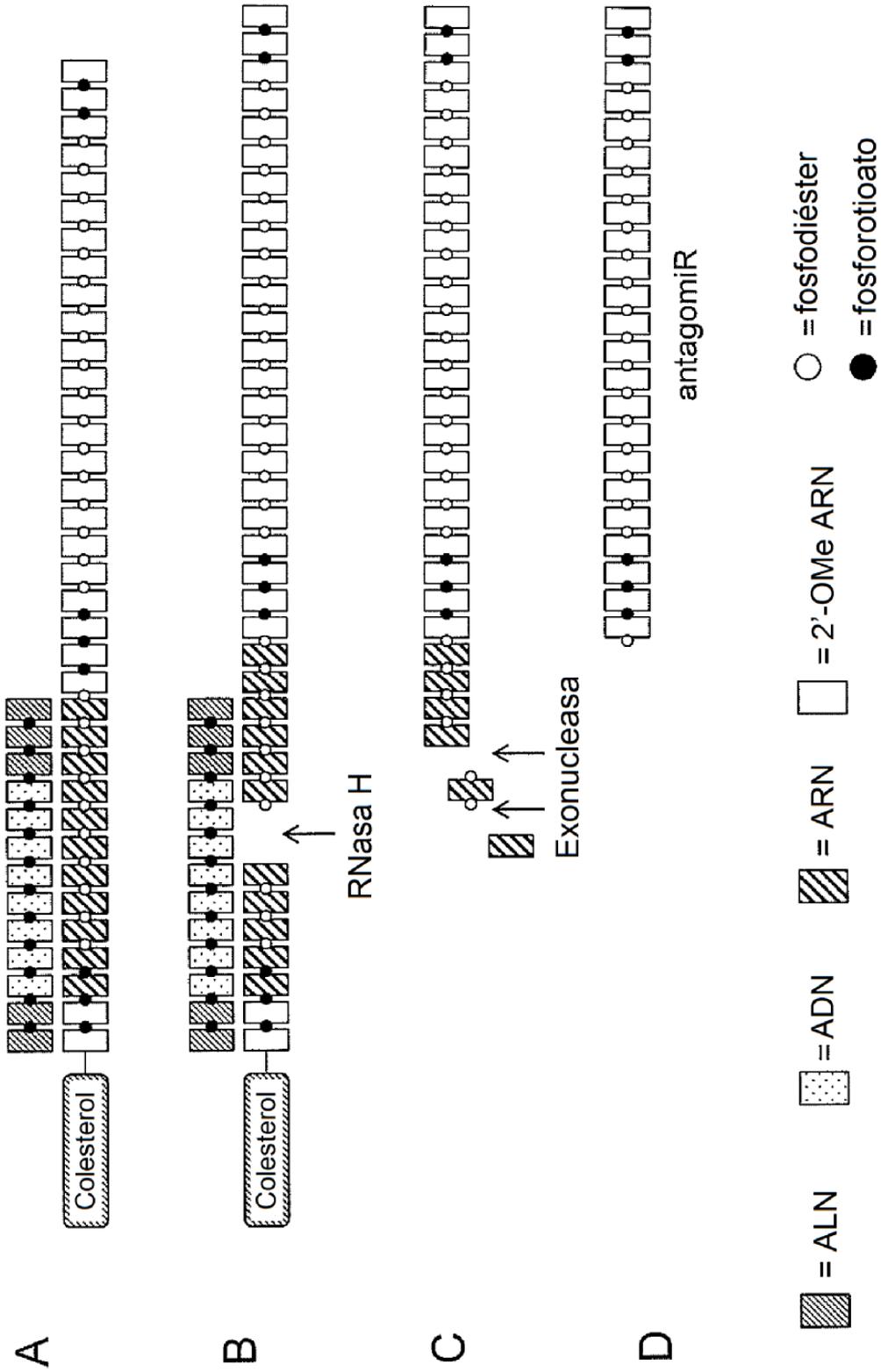
[Fig. 3]



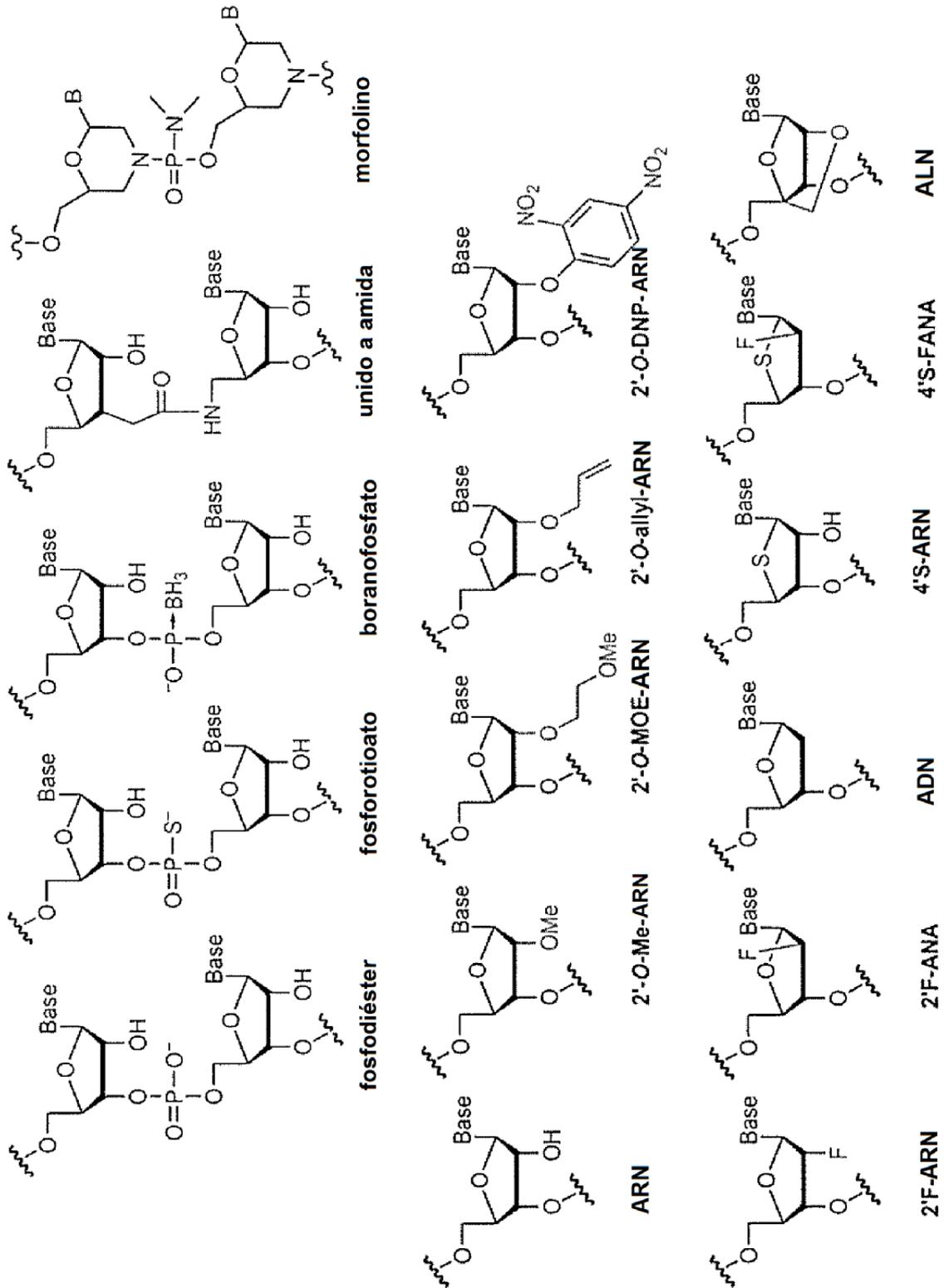
[Fig. 4]



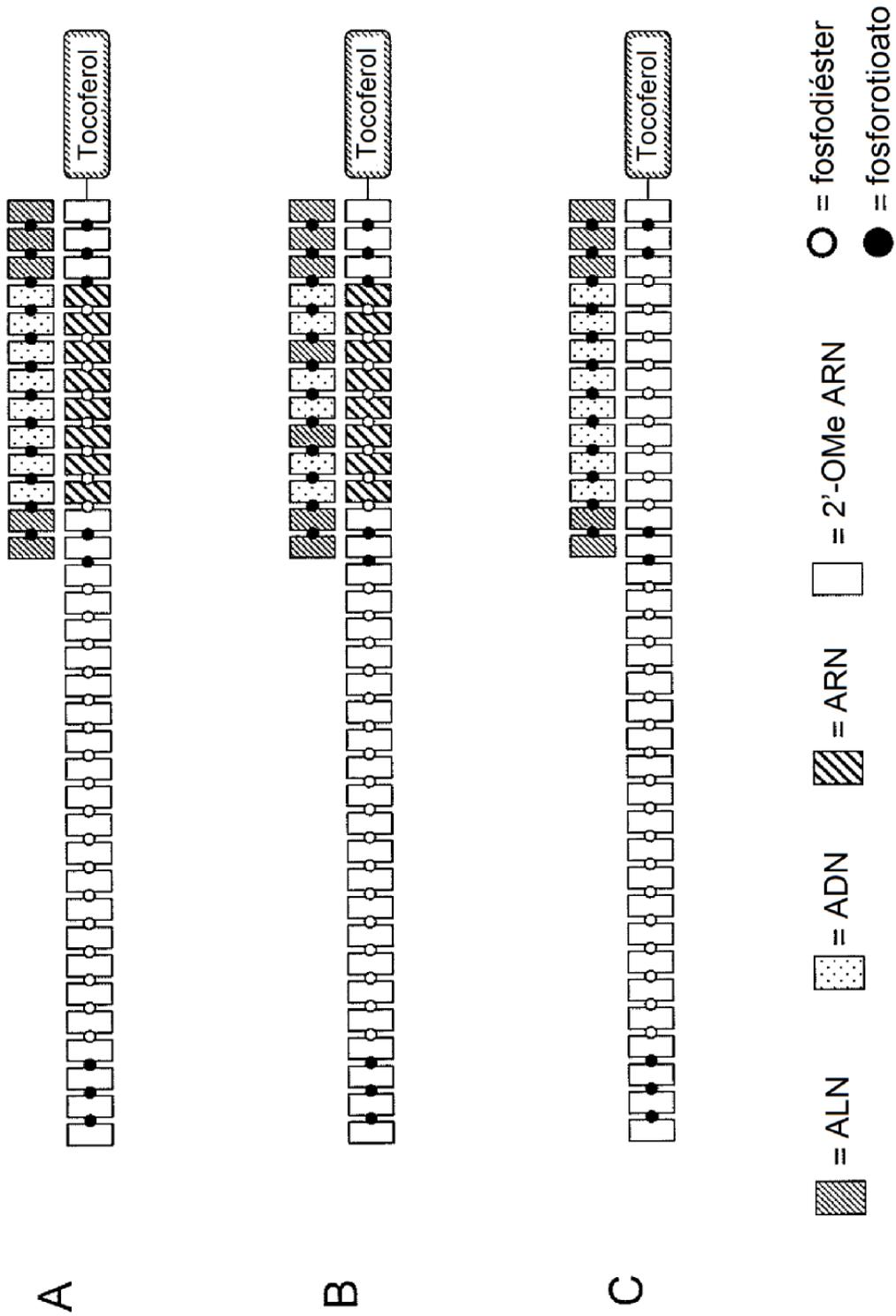
[Fig. 5]



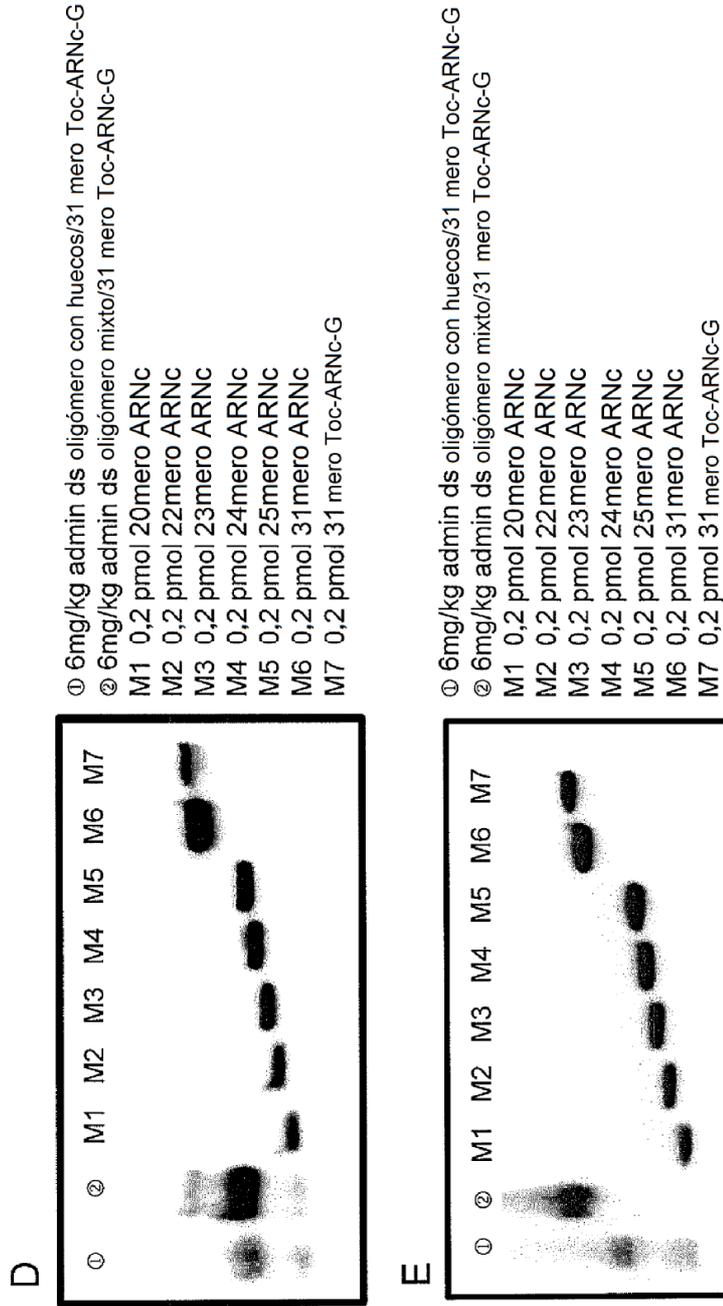
[Fig. 6]



[Fig. 7-1]



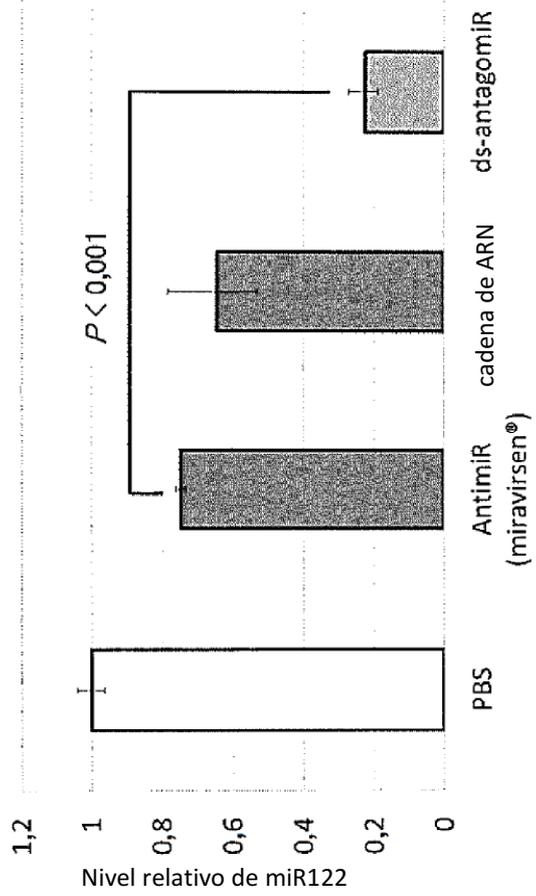
[Fig. 7-2]



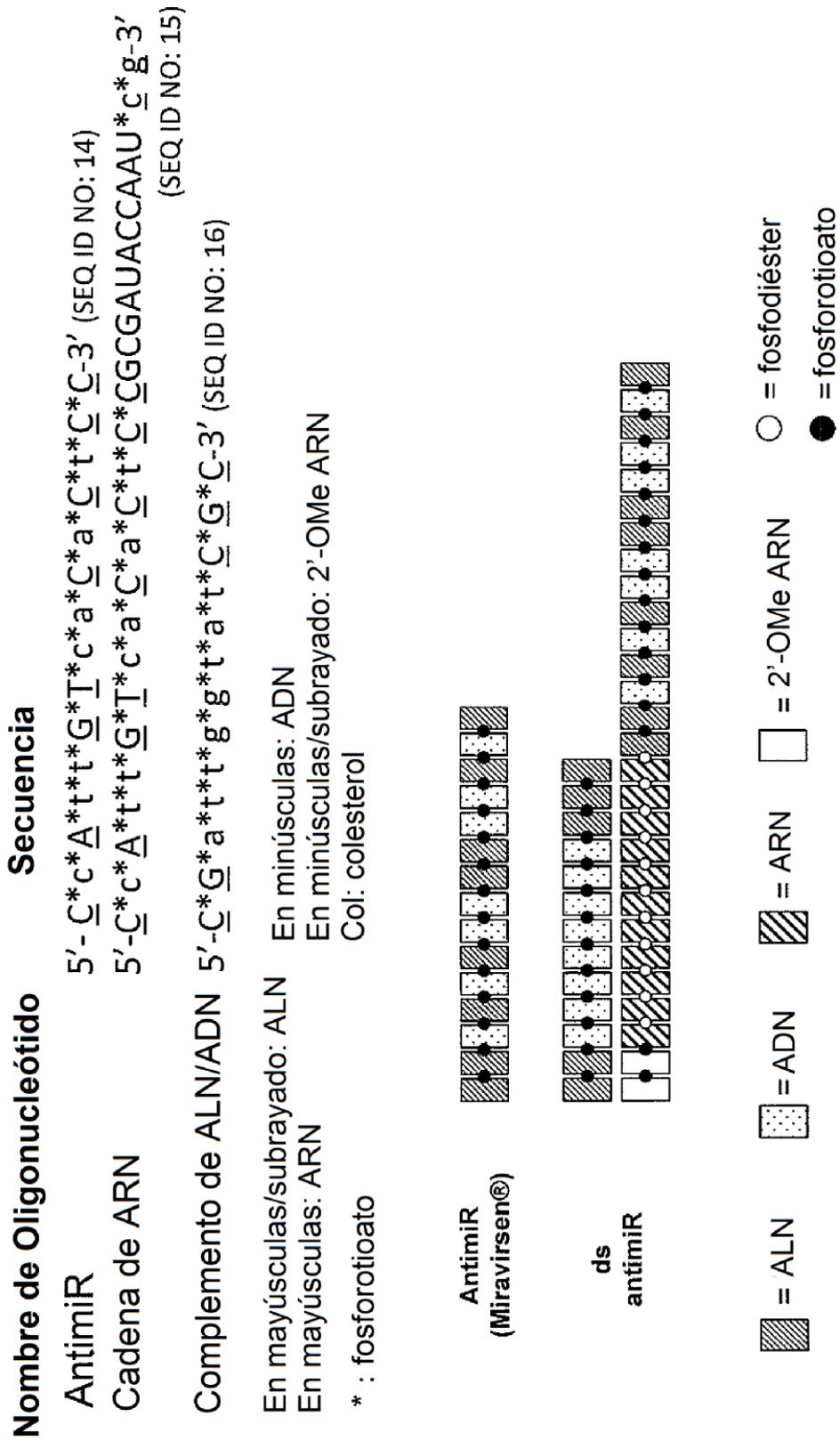
[Fig. 8]

Nombre de Oligonucleótido	Secuencia
AntimiR	5'-C* <u>C</u> *A*t*t* <u>G</u> *I*c*a*C*a*C*t*t*C* <u>C</u> -3' (SEQ ID NO: 14)
Cadena de ARN	5'-a* <u>c</u> *aaacaccauugucacacuc*c* <u>a</u> *UGAAUACCAAU*g* <u>c</u> -3'-col (SEQ ID NO: 12)
Complemento de ALN/ADN	5'-G* <u>C</u> *a*t*t*g*g*t*a*t*I*C*A-3' (SEQ ID NO: 13)

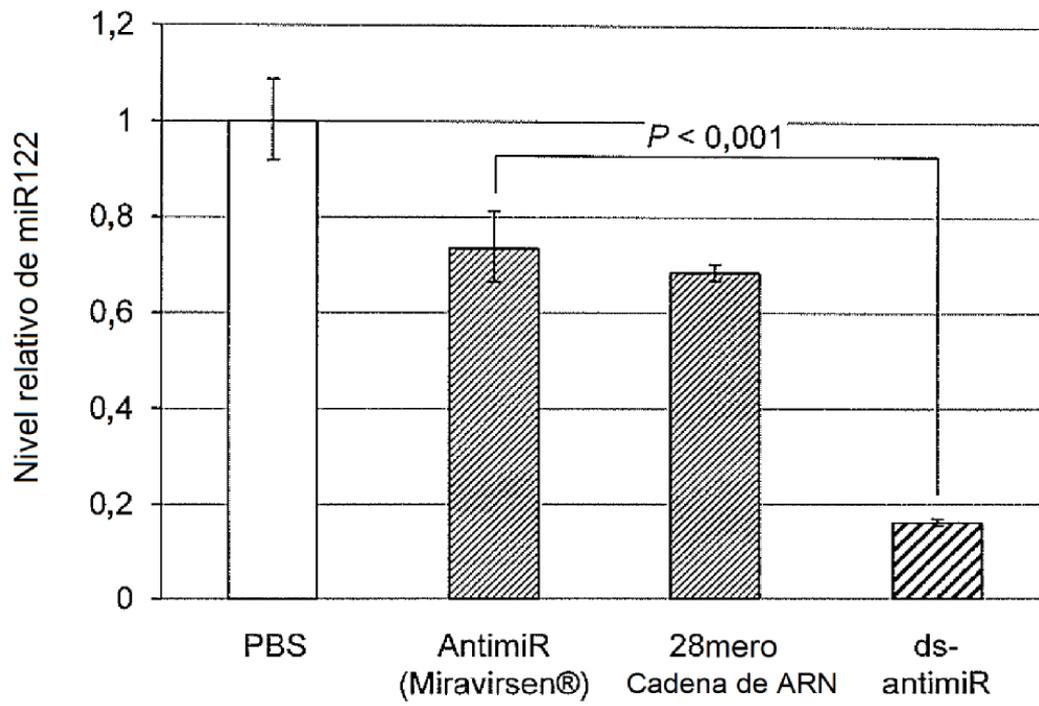
En mayúsculas/subrayado: ALN      En minúsculas: ADN  
 En mayúsculas: ARN                    En minúsculas/subrayado: 2'-OMe ARN  
 \* : fosforotioato                        Col: colesterol



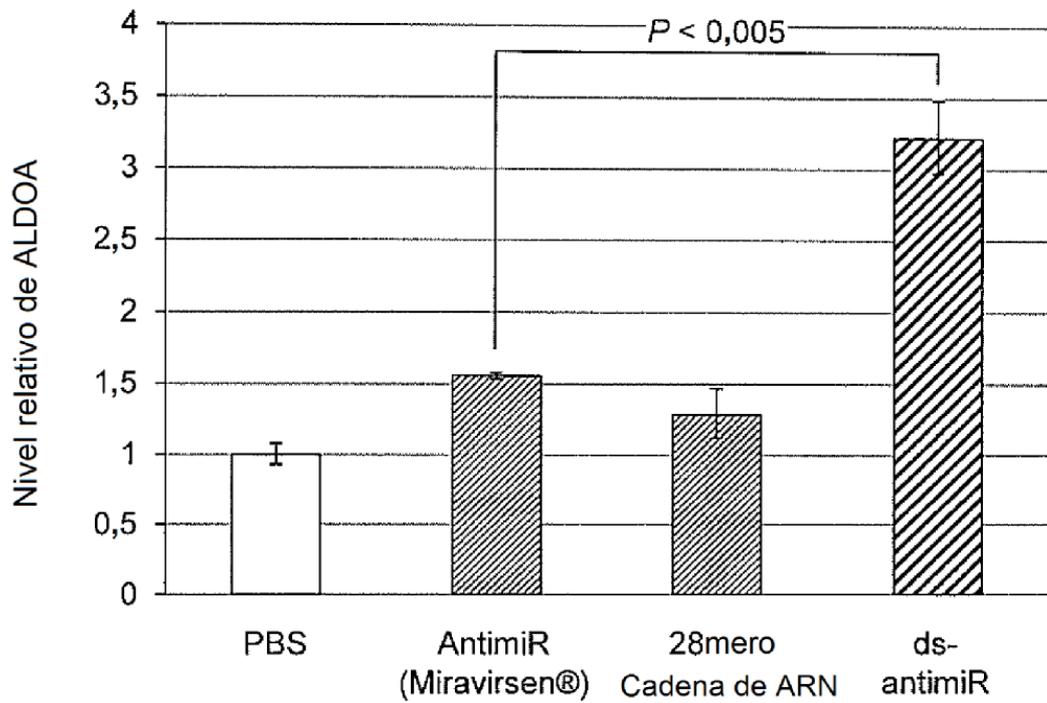
[Fig. 9]



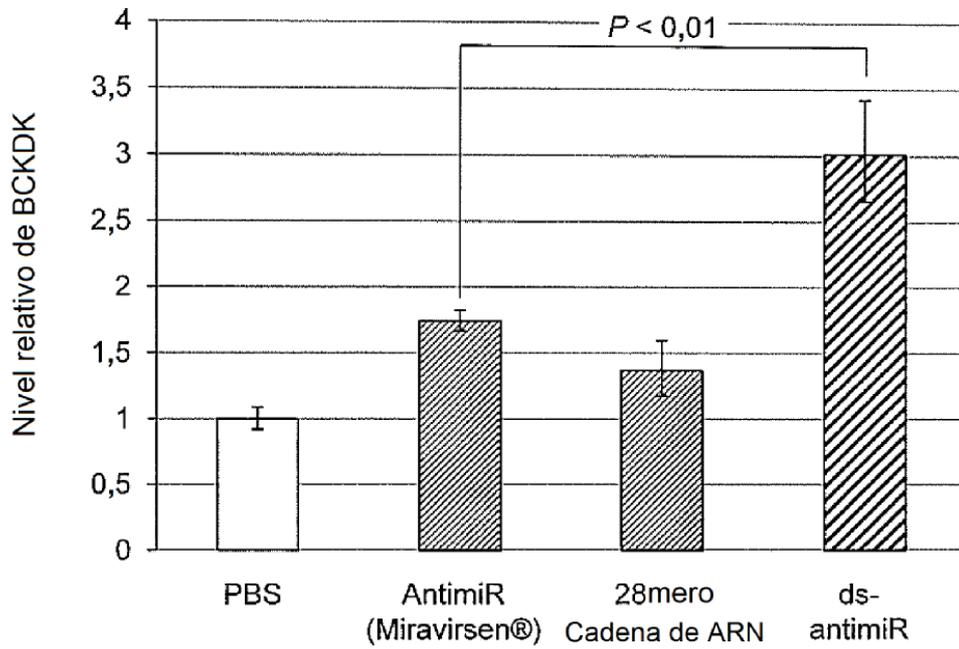
[Fig. 10a]



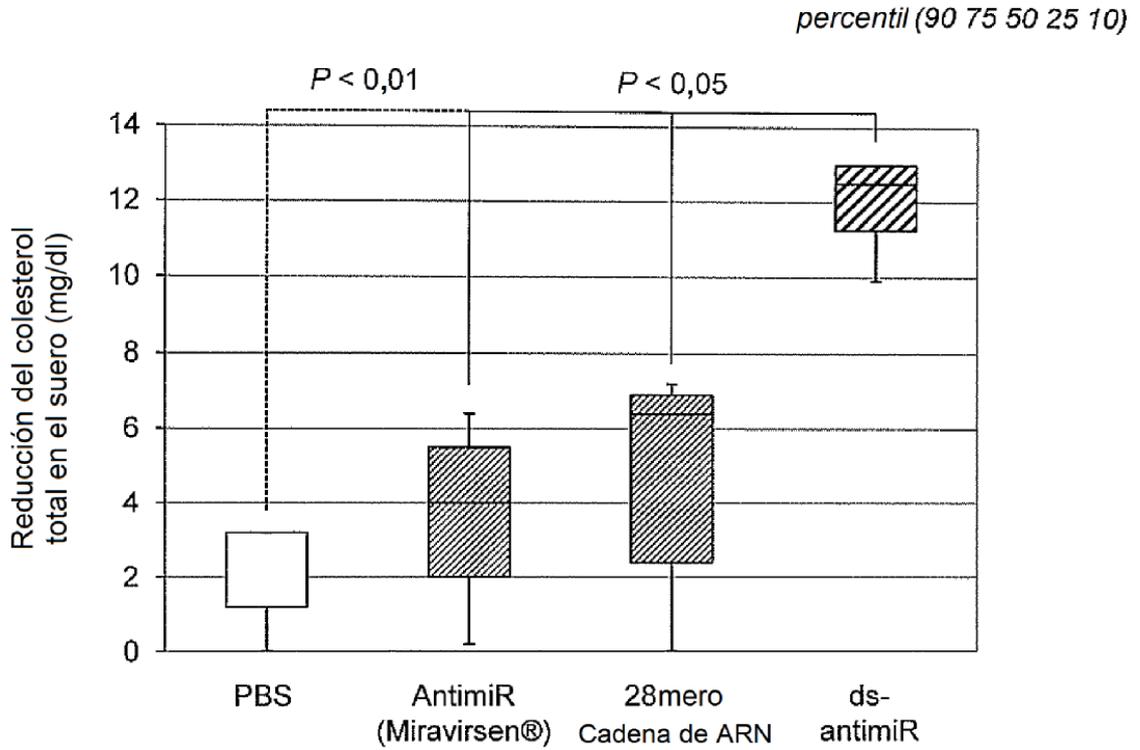
[Fig. 10b]



[Fig. 10c]

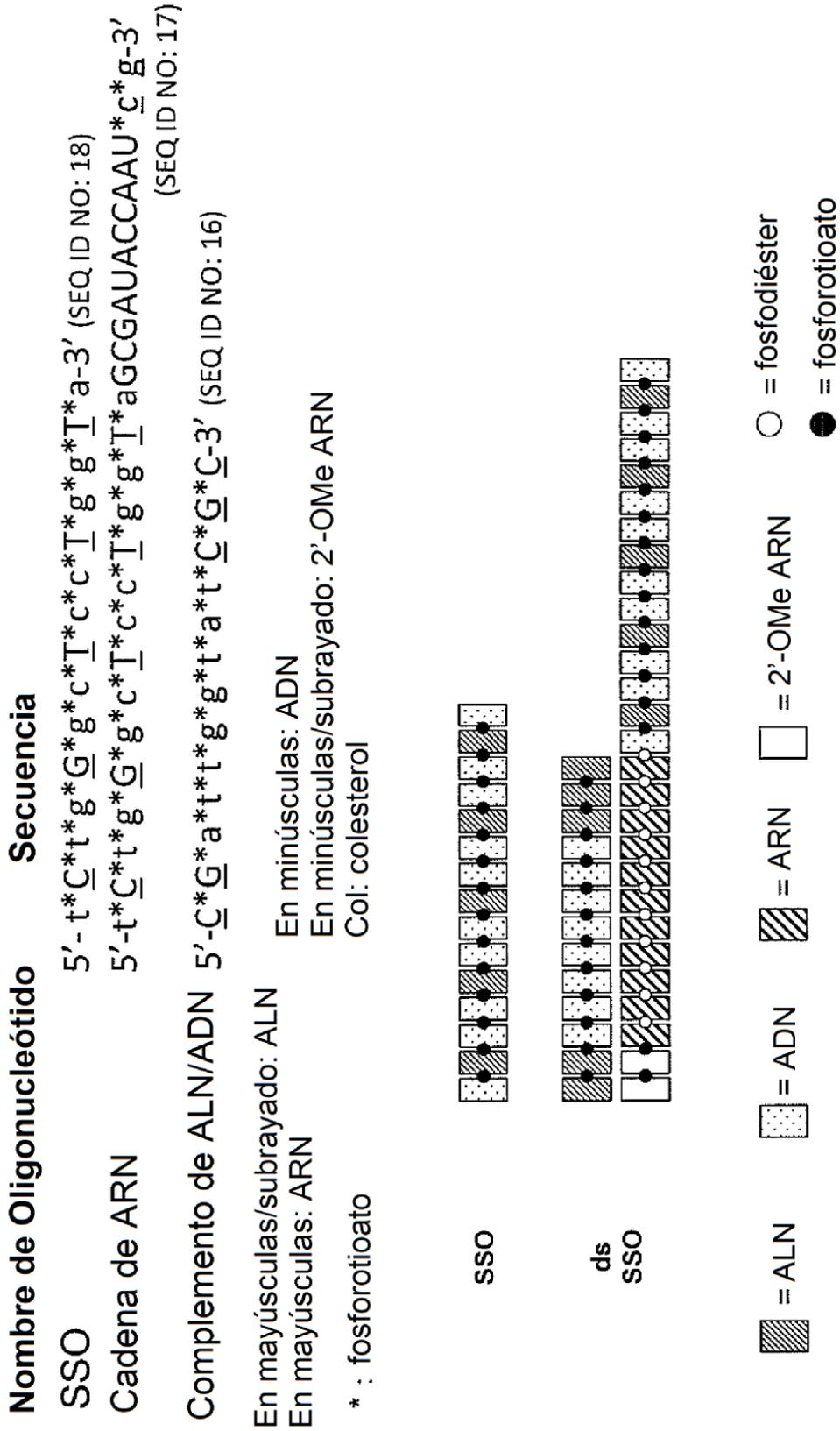


[Fig. 10d]

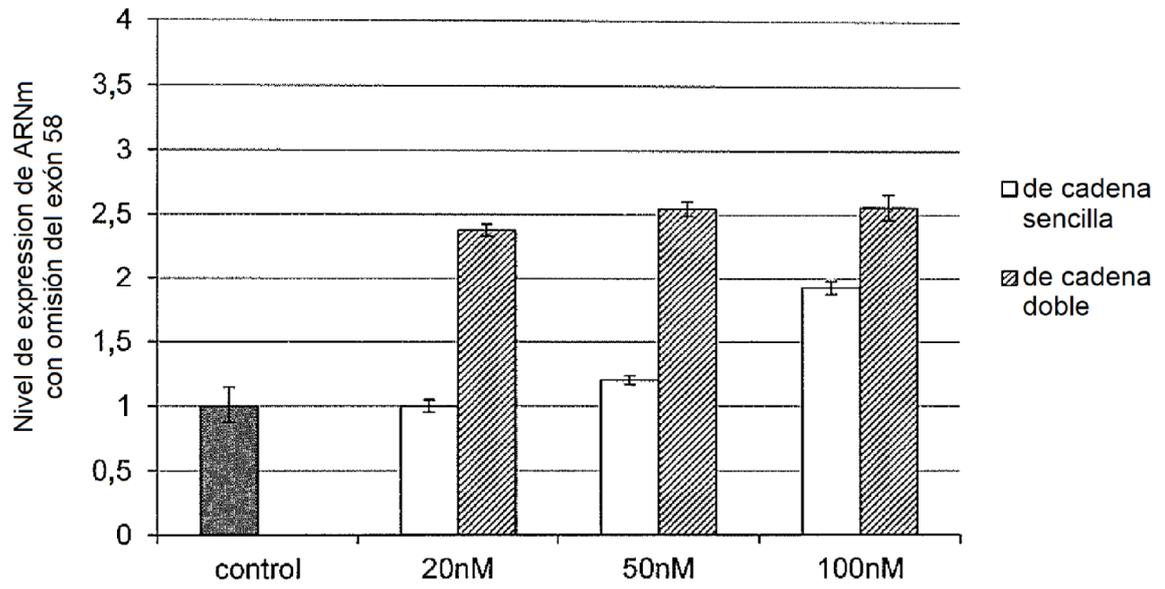




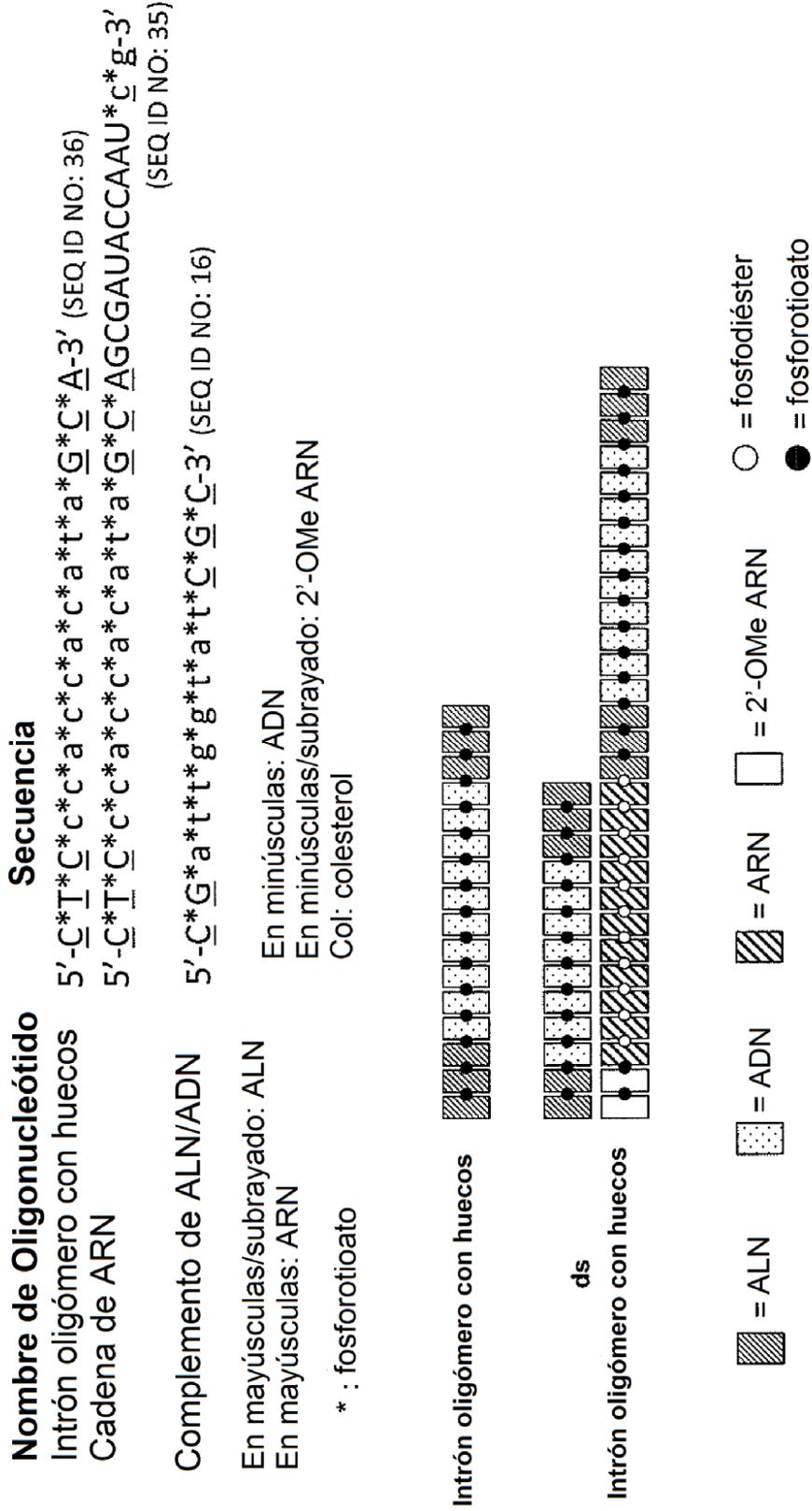
[Fig. 11]



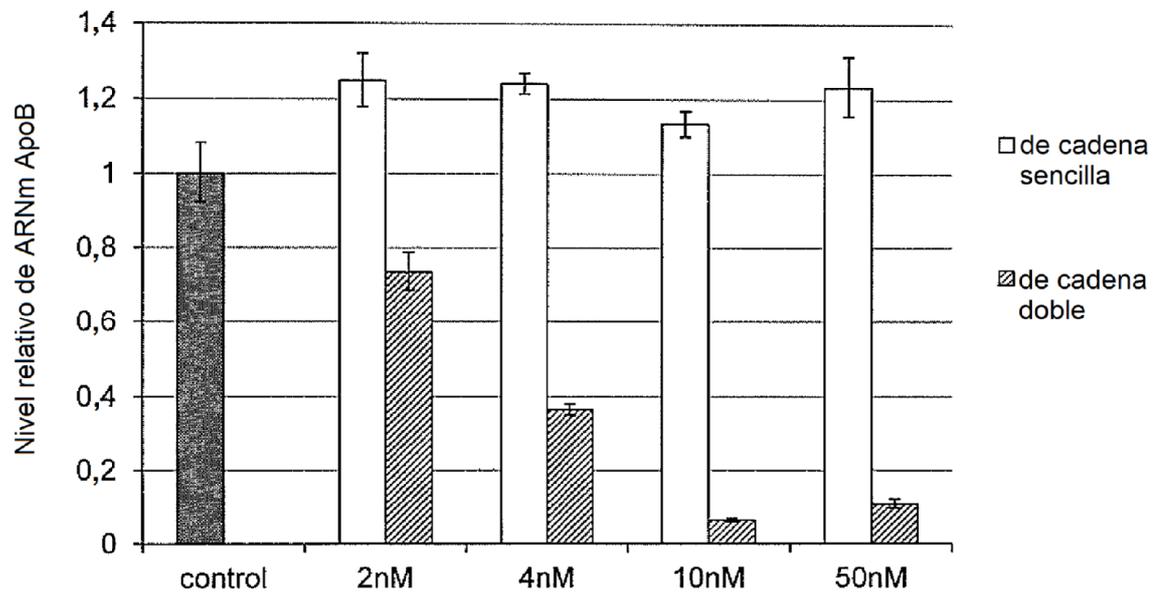
[Fig. 12]



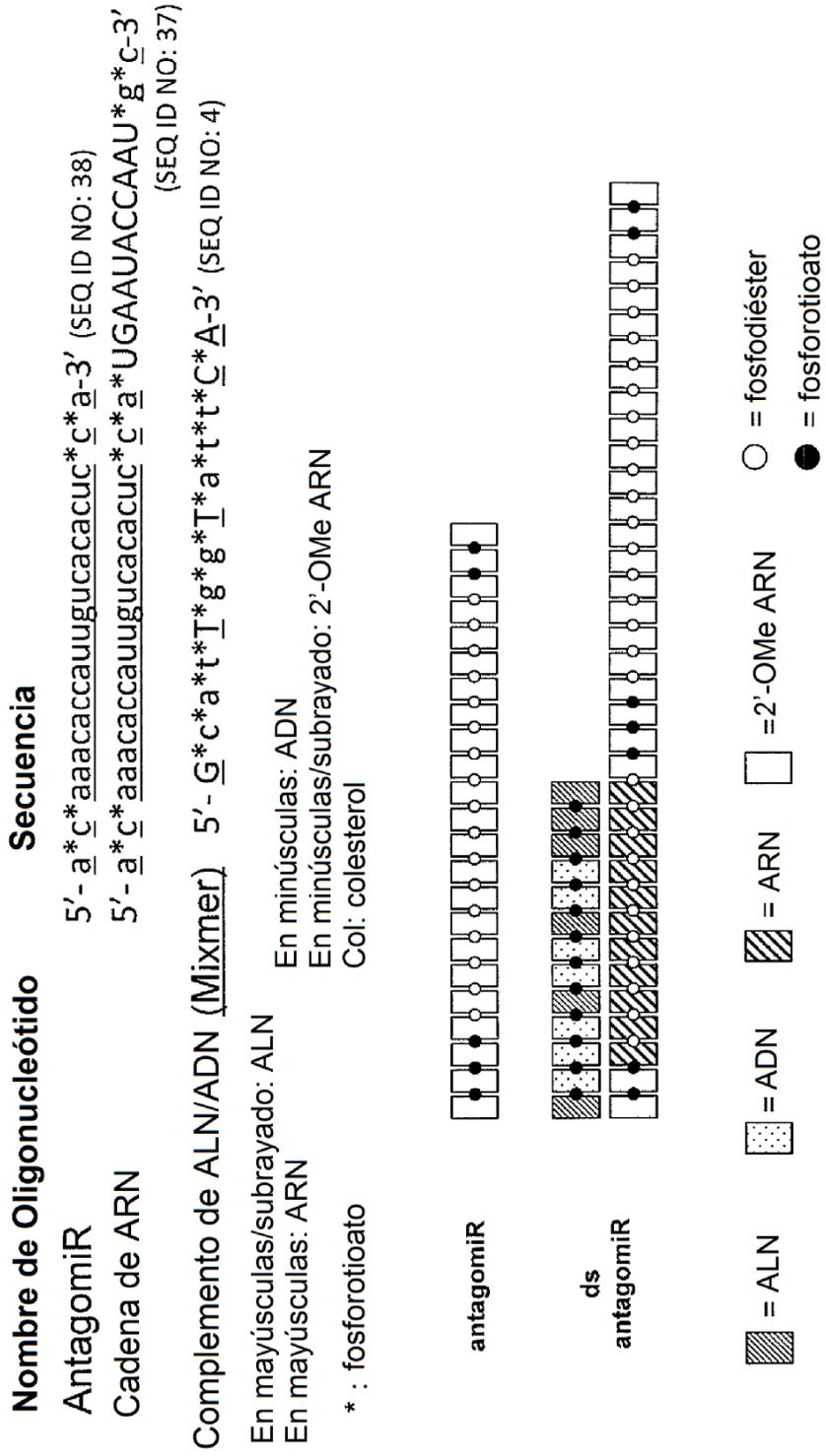
[Fig. 13]



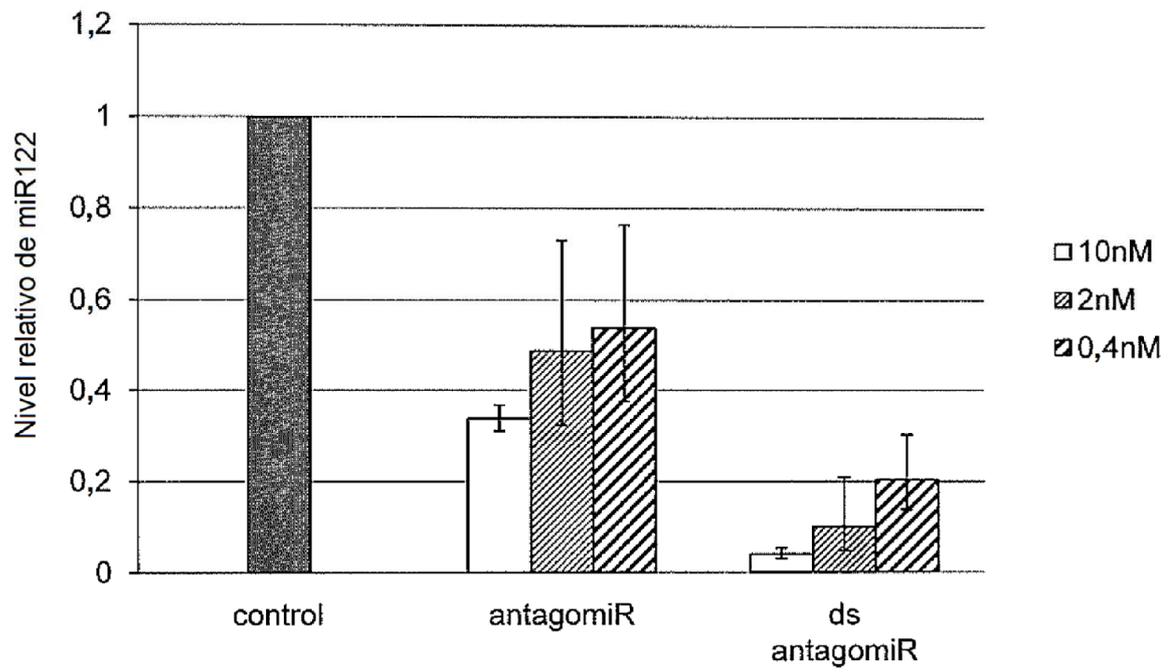
[Fig. 14]



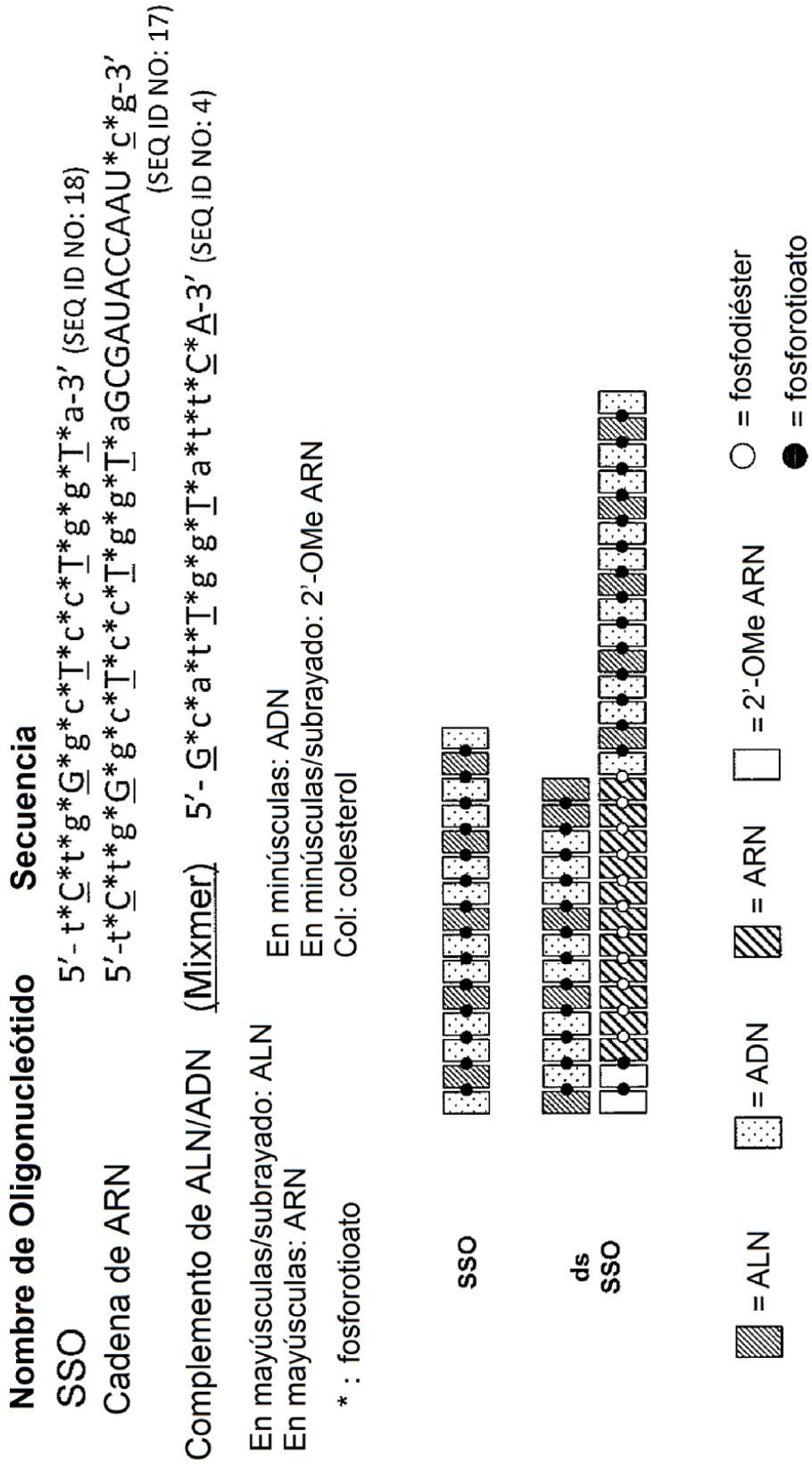
[Fig. 15]



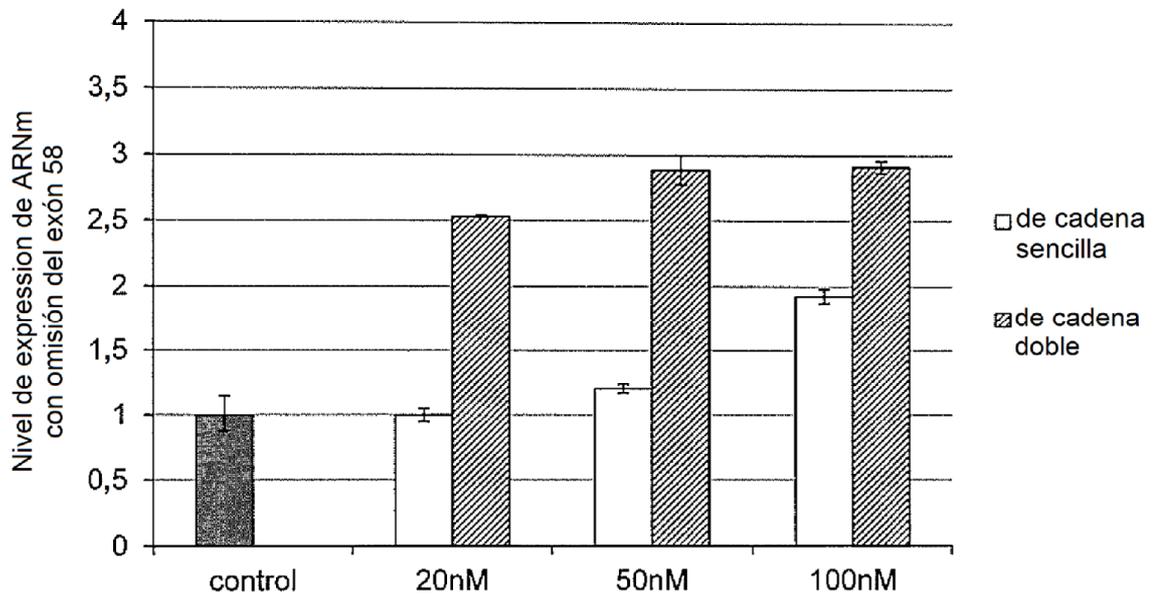
[Fig. 16]



[Fig. 17]



[Fig. 18]



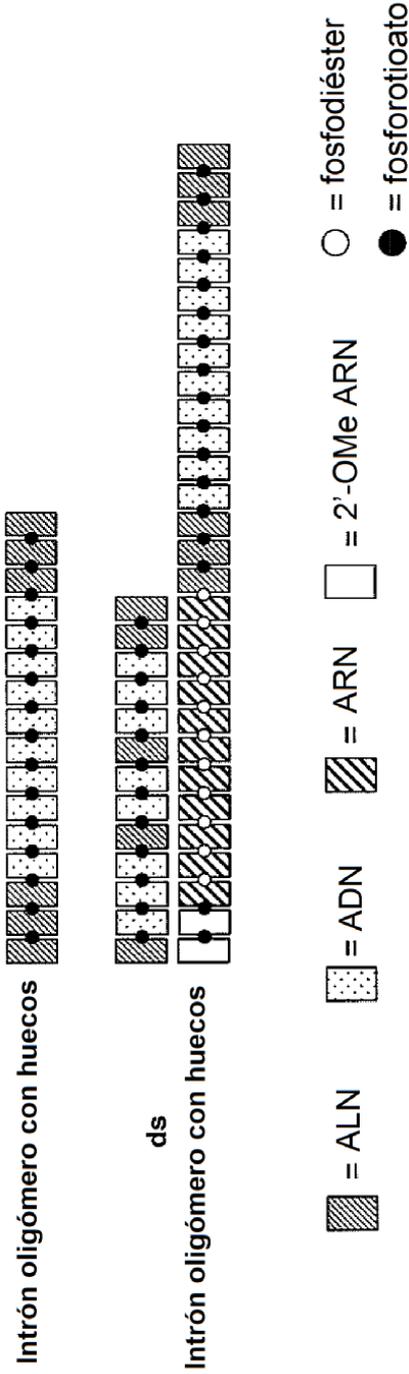
[Fig. 19]

<b>Nombre de Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia</b>
Intrón oligómero con huecos	5'-C*I*C*c*c*a*c*c*a*c*c*a*t*a*G*C*A-3' (SEQ.ID NO: 36)
Cadena de ARN	5'-C*I*C*c*c*a*c*c*a*c*c*a*t*a*G*C*AGCGAUACCAAU*c*g-3' (SEQ.ID NO: 35)
Complemento de ALN/ADN (Mixer)	5-G*c*a*t*I*g*g*I*a*t*t*C*A-3' (SEQ.ID NO: 4)

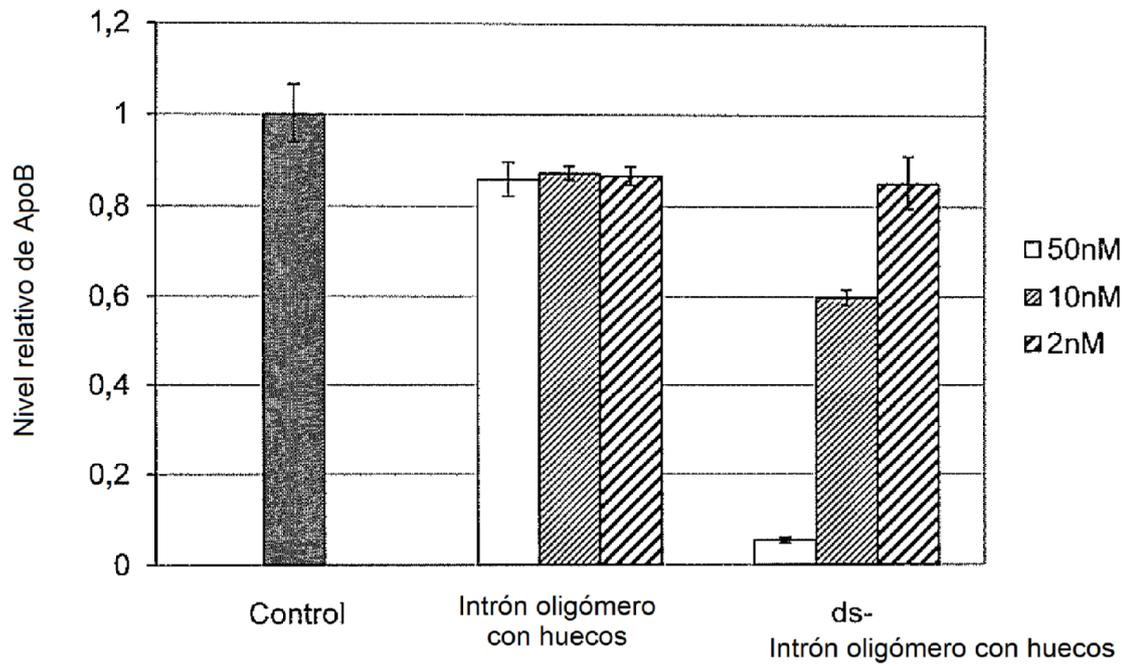
En mayúsculas/subrayado: ALN  
 En mayúsculas: ARN

En minúsculas: ADN  
 En minúsculas/subrayado: 2'-OMe ARN  
 Col: colesterol

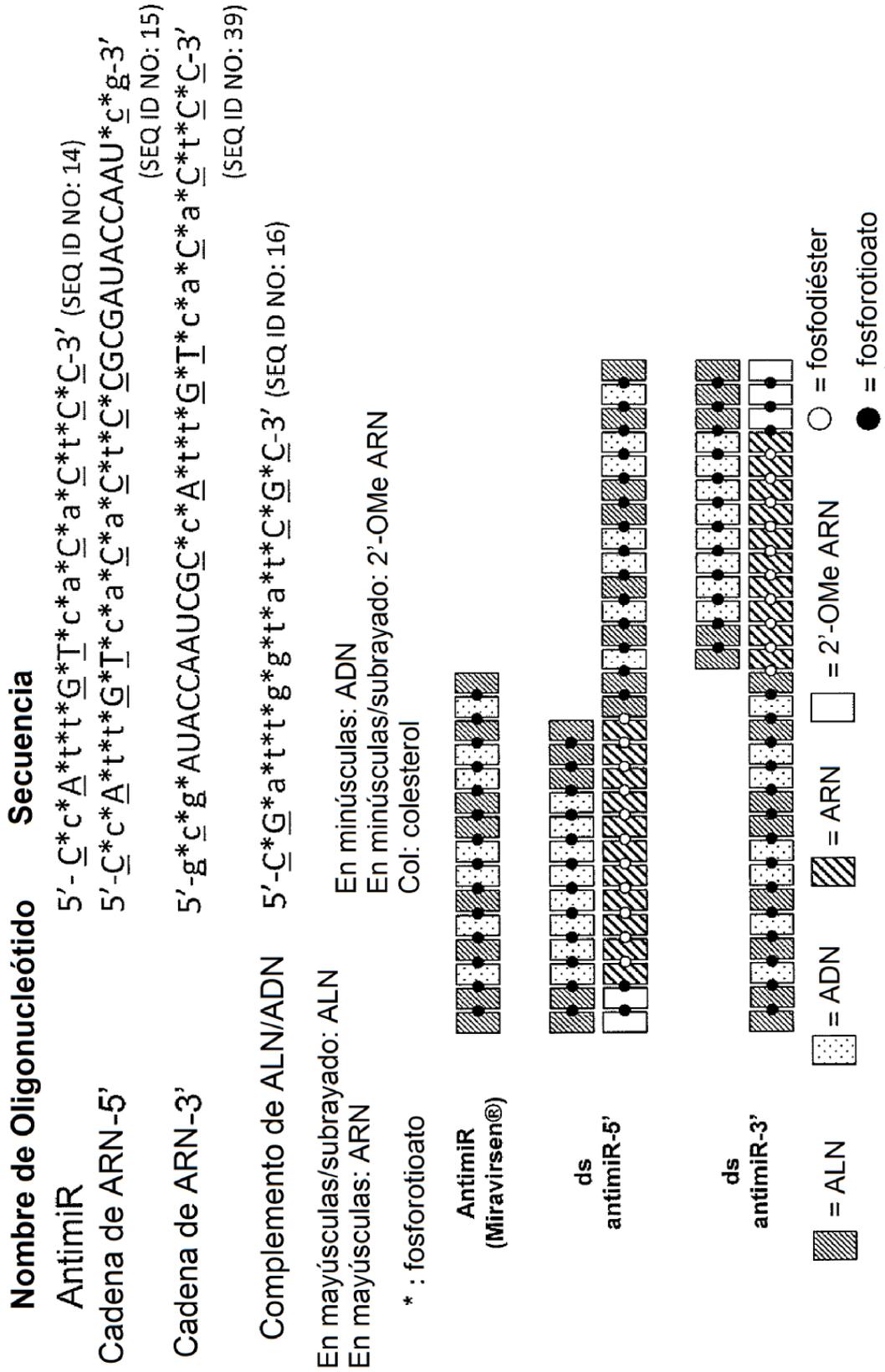
\* : fosforotioato



[Fig. 20]



[Fig. 21]



[Fig. 22]

