

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 942**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

A61K 47/54 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2004 PCT/US2004/011829**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.11.2004 WO04094595**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2004 E 04759946 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 1620544**

54 Título: **Agentes de ARNi modificados**

30 Prioridad:

17.04.2003 US 463772 P
25.04.2003 US 465665 P
25.04.2003 US 465802 P
09.05.2003 US 469612 P
08.08.2003 US 493986 P
11.08.2003 US 494597 P
15.09.2003 US 503414 P
26.09.2003 US 506341 P
09.10.2003 US 510246 P
10.10.2003 US 510318 P
07.11.2003 US 518453 P
08.03.2004 WO PCT/US2004/007070
05.04.2004 WO PCT/US2004/010586
09.04.2004 WO PCT/US2004/011255

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.03.2019

73 Titular/es:

**ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC. (100.0%)
300 Third Street
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

MANOHARAN, MUTHIAH

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 702 942 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 ARNi modificados.

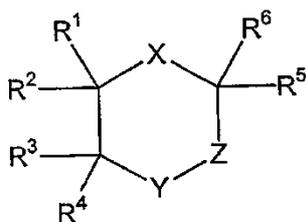
La presente invención se refiere a agentes de ARNi que comprenden una primera cadena y una segunda cadena, en los que al menos una subunidad según la fórmula (I) de la presente invención se incorpora en al menos una de dichas cadenas. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y kits que comprenden dichos agentes de ARNi.

La interferencia por ARN o "iARN" es un término acuñado inicialmente por Fire y colaboradores para describir la observación de que el ARN bicatenario (ARNbc) puede bloquear la expresión génica cuando se introduce en gusanos (Fire *et al.* (1988) *Nature* 391, 806-811). El ARNbc pequeño dirige el silenciamiento post-transcripcional, específico de gen, en muchos organismos, incluyendo vertebrados, y ha proporcionado una nueva herramienta para estudiar la función génica. La iARN puede implicar la degradación de ARNm.

En este contexto, el documento WO 02/094185 A2 describe conjugados y composiciones para la distribución celular, conectores degradables, métodos respectivos de síntesis, y aplicaciones de los mismos. Además, el documento WO 95/18792 A1 describe monómeros de pirrolidina que portan varios grupos funcionales en la preparación de estructuras oligoméricas.

La presente invención se refiere a los siguientes puntos:

1. Un agente de ARNi que comprende una primera cadena y una segunda cadena, en el que al menos una subunidad que tiene una fórmula (I) se incorpora a al menos una de dichas cadenas:



(I)

En el que:

X es N(CO)R⁷ o NR⁷;

Y es CR⁹R¹⁰;

Z está ausente;

Uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁹ y R¹⁰ es OR^a y uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁹ y R¹⁰ es (CH₂)_nOR^b, o

Uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁹ y R¹⁰ es (CH₂)_nOR^a y uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁹ y R¹⁰ es OR^b,

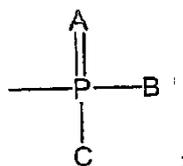
En el que el resto de R¹, R², R³, R⁴, R⁹ y R¹⁰ son H;

Cada uno de R⁵ y R⁶ es, independientemente, H o alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con 1-3 R¹³;

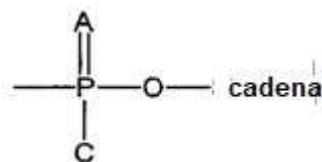
R⁷ es R^d; o alquilo C₁-C₂₀ sustituido con NR^cR^d o NHC(O)R^d;

R¹³ es hidroxilo, alcoxi C₁-C₄, o halo;

R^a es:

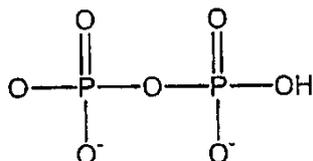


R^b es



Cada uno de A y C es, independientemente, O o S;

B es OH, O⁻, o



- 5 R^c es H o alquilo C₁-C₆;
R^d es un ligando elegido de un radical de colesterol; un radical carbohidrato; y colesterol;
y n es 1-4;
en el que la subunidad se sitúa en el extremo 3' o 5' de la primera cadena o la segunda cadena.
2. El compuesto del punto 1, en el que R¹ es (CH₂)_nOR^b y R³ es OR^a.
- 10 3. El compuesto del punto 2, en el que R¹ y R³ son *cis*.
4. El compuesto del punto 2, en el que R¹ y R³ son *trans*.
5. El compuesto del punto 2, en el que n es 1.
6. El compuesto del punto 2, en el que A es O.
7. El compuesto del punto 2, en el que A es S.
- 15 8. El compuesto del punto 1, en el que R¹ es (CH₂)_nOR^a y R³ es OR^b.
9. El compuesto del punto 2, en el que R⁷ es (CH₂)₅NHR^d o (CH₂)₅NHC(O)R^d.
10. El compuesto del punto 1, en el que R¹ es OR^b y R³ es (CH₂)_nOR^a.
11. El compuesto del punto 1, en el que R¹ es OR^a y R³ es (CH₂)_nOR^b.
12. El compuesto del punto 11, en el que R¹ y R³ son *cis*.
- 20 13. El compuesto del punto 11, en el que R¹ y R³ son *trans*.
14. El compuesto del punto 11, en el que n es 1.
15. El compuesto del punto 1, en el que R¹ es (CH₂)_nOR^b y R⁹ es OR^a.
16. El compuesto del punto 15, en el que R¹ y R⁹ son *cis*.
17. El compuesto del punto 15, en el que R¹ y R⁹ son *trans*.
- 25 18. El compuesto del punto 15, en el que n es 1.
19. El compuesto del punto 1, en el que R¹ es OR^a y R⁹ es (CH₂)_nOR^b.
20. El compuesto del punto 19, en el que R¹ y R⁹ son *cis*.
21. El compuesto del punto 19, en el que R¹ y R⁹ son *trans*.
22. El compuesto del punto 19, en el que n es 1.
- 30 23. El compuesto del punto 1, en el que R¹ es (CH₂)_nOR^a y R⁹ es OR^b.
24. El compuesto del punto 1, en el que R¹ es OR^b y R⁹ es (CH₂)_nOR^a.

25. El compuesto del punto 1, en el que R^3 es $(CH_2)_nOR^b$ y R^9 es OR^a .

26. El compuesto del punto 1, en el que R^3 es $(CH_2)_nOR^a$ y R^9 es OR^b .

27. El compuesto del punto 1, en el que R^3 es OR^a y R^9 es $(CH_2)_nOR^b$.

28. El compuesto del punto 1, en el que R^3 es OR^b y R^9 es $(CH_2)_nOR^a$.

5 29. Una composición farmacéutica que comprende un agente de ARNi del punto 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30. Un kit que comprende un agente de ARNi del punto 1, un recipiente estéril en que el agente de ARNi se describe, e instrucciones para el uso.

10 El inventor ha descubierto, entre otros, que el azúcar ribosa de una o más subunidades de ribonucleótido de un agente de ARNi puede sustituirse con otro resto, p.ej., un vehículo no carbohidrato (preferiblemente cíclico). Una subunidad de ribonucleótido en que el azúcar ribosa de la subunidad se ha sustituido así se denomina en la presente memoria como una subunidad de modificación por sustitución de ribosa (SMSR). Un portador cíclico puede ser un sistema anular carbocíclico, es decir, todos los átomos del anillo son átomos de carbono, o un sistema anular heterocíclico, es decir, uno o más átomos del anillo pueden ser un heteroátomo, p.ej., nitrógeno, oxígeno, azufre. El portador cíclico puede ser un sistema anular monocíclico, o puede contener dos o más anillos, p.ej., anillos condensados. El portador cíclico puede ser un sistema anular totalmente saturado, o puede contener uno o más dobles enlaces.

20 Los vehículos incluyen además (i) al menos dos "puntos de unión a la estructura" y (ii) al menos un "punto de unión al anclaje". Un "punto de unión a la estructura" como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo funcional, p.ej. un grupo hidroxilo, o generalmente, un enlace disponible para, y que es adecuado para la incorporación del vehículo a la estructura, p.ej. el fosfato, o fosfato modificado, p.ej., que contiene azufre, la estructura de un ácido ribonucleico. Un "punto de unión al anclaje" como se usa en la presente memoria se refiere a un átomo del anillo constituyente del portador cíclico, p.ej., un átomo de carbono o un heteroátomo (distinto de un átomo que proporciona un punto de unión a la estructura), que conecta con un resto seleccionado. El resto puede ser, p.ej., un ligando, p.ej., un resto de direccionamiento o de distribución, o un resto que altera una propiedad física. Uno de los restos más preferidos es un resto que promueve la entrada a una célula, p.ej., un resto lipófilo, p.ej., colesterol. Aunque sin desear estar atados por la teoría, se cree que la unión de un agente lipófilo aumenta la lipofilidad de un agente de ARNi. Opcionalmente, el resto seleccionado se conecta por un anclaje intermedio al portador cíclico. Por consiguiente, incluirá a menudo un grupo funcional, p.ej., un grupo amino, o generalmente, proporcionará un enlace, p.ej., un grupo funcional, p.ej., un grupo amino, o generalmente, proporcionará un enlace, que es adecuado para la incorporación o anclaje de otra entidad química, p.ej., un ligando al anillo constituyente.

25 La incorporación de una o más SMSR descritas en la presente memoria en un agente de ARN, p.ej., un agente de ARNi, particularmente cuando se ancla a una entidad apropiada, puede conferir una o más nuevas propiedades al agente de ARN y/o alterar, mejorar o modular una o más propiedades existentes en la molécula de ARN. P.ej., puede alterar una o más de lipofilidad o resistencia a la nucleasa. La incorporación de una o más SMSR descritas en la presente memoria en un agente de ARNi puede, particularmente cuando la SMSR está anclada a una entidad apropiada, modular, p.ej., aumentar, la afinidad de unión de un agente de ARNi a un ARNm diana, cambiar la geometría de la forma doble del agente de ARNi, alterar la distribución o dirigir al agente de ARNi a una parte particular del cuerpo, o modificar la interacción con las proteínas de unión del ácido nucleico (p.ej., durante la formación de RISC y la separación de cadenas).

40 Las figuras muestran:

FIG. 1 un esquema sintético general para la incorporación de monómeros de SMSR en un oligonucleótido.

FIG. 2 es una lista de sustituyentes que pueden estar presentes en silicio en OFG¹.

45 FIG. 3 es una lista de vehículos de SMSR representativos. El panel 1 muestra SMSR basadas en pirrolina; el panel 2 muestra SMSR basadas en 3-hidroxiprolina; el panel 3 muestra SMSR basadas en piperidina; el panel 4 muestra SMSR basadas en morfolina y piperazina; y el panel 5 muestra SMSR basadas en decalina. R1 es succinato o fosforamidato y R2 es H o un ligando conjugado.

FIG. 4 es un esquema de reacción general para la conjugación 3' de péptido en ARNi.

FIG. 5 es un esquema de reacción general para la conjugación 5' de péptido en ARNi.

FIG. 6 es un esquema de reacción general para la síntesis de aza-péptidos.

50 FIG. 7 es un esquema de reacción general para la síntesis de N-metilaminoácidos y péptidos.

FIG. 8 es un esquema de reacción general para la síntesis de β -metilaminoácidos y péptidos Ant y Tat.

FIG. 9 es un esquema de reacción general para la síntesis de oligocarbamatos de Ant y Tat.

FIG. 10 es un esquema de reacción general para la síntesis de oligoureas de Ant y Tat.

FIG. 11 es una representación esquemática de vehículos peptídicos.

FIG. 12 es una representación estructural de emparejamiento de bases en ARNip² pseudocomplementario.

- 5 FIG. 13 es una representación esquemática de ARNip de direccionamiento duales diseñados para fijar como objetivo el genoma de VHC.

FIG. 14 es una representación esquemática de ARNip bifuncionales, pseudocomplementarios, diseñados para fijar como objetivo el genoma de VHC.

FIG. 15 es una lista de agentes de ARNi de control y candidatos.

- 10 FIG. 16 es una representación gráfica de resultados de viabilidad celular relativa.

FIG. 17 es una representación gráfica de resultados de actividad de silenciamiento génico.

FIG. 18 es una lista de monómeros representativos de SMSR anclados a colesterol.

FIG. 19 muestra datos de LCMS para un conjugado de colesterol 3' después de purificación PAGE.

FIG. 20 es una representación gráfica del silenciamiento de Luc sin reactivo de transfección.

- 15 El (ARNbc) bicatenario dirige el silenciamiento específico de la secuencia de ARNm a través de un proceso conocido como interferencia por ARN (iARN). El proceso se da en una amplia variedad de organismos, incluyendo mamíferos y otros vertebrados.

Se ha demostrado que fragmentos de 21-23 nt de ARNbc son mediadores específicos de la secuencia del silenciamiento de ARN, p.ej., provocando la degradación del ARN. Aunque sin desear estar atados por la teoría, puede ser que una señal molecular, que puede ser meramente de la longitud específica de los fragmentos, presente en estos fragmentos de 21-23 nt busque factores celulares que medien la iARN. Se describen en la presente memoria métodos para preparar y administrar estos fragmentos de 21-23 nt, y otros agentes de ARNi, y su uso para inactivar específicamente la función génica. El uso de agentes de ARNi (u oligonucleótidos producidos de forma recombinante o sintetizados de forma química de la misma naturaleza o similar) permite la fijación como objetivo de ARNm específicos para el silenciamiento en células de mamíferos. Además, fragmentos de agente de ARNbc más largos pueden usarse también, p.ej. como se describe a continuación.

20

25

Aunque, en las células de mamíferos, los ARNbc largos pueden inducir la respuesta de interferona que es nociva frecuentemente, los ARNp no desencadenan la respuesta de la interferona, al menos no en un grado que sea nociva para la célula y el huésped. En particular, la longitud de las cadenas de agente de ARNi en un agente de ARNp puede ser menor que 31, 30, 28, 25 o 23 nt, p.ej., suficientemente corta para evitar inducir una respuesta nociva de interferona. Por consiguiente, la administración de una composición de agente de ARNp (p.ej., formulada como se describe en la presente memoria) a una célula de mamífero puede usarse para silenciar la expresión de un gen diana mientras se sortea la respuesta de la interferona. Además, el uso de una especie discreta de agente de ARNi puede usarse para determinar como objetivo de forma selectiva un alelo de un gen diana, p.ej., en un sujeto heterocigótico para el alelo.

30

35

Además, en una realización, una célula de mamífero se trata con un agente de ARNi que altera un componente de la respuesta de la interferona, p.ej., proteína quinasa PKR activada por ARN bicatenario (ARNbc). Dicha célula puede tratarse con un segundo agente de ARNi que incluye una secuencia complementaria a un ARN diana y que tiene una longitud que de otra forma desencadenaría la respuesta de la interferona.

- 40 En una realización típica, el sujeto es un mamífero tal como una vaca, caballo, ratón, rata, perro, cerdo, cabra o un primate. El sujeto puede ser un mamífero lechero (p.ej., una vaca, o cabra) u otro animal de granja (p.ej., un pollo, pavo, oveja, cerdo, pez, gamba). En una realización más preferida, el sujeto es un humano, p.ej., un individuo normal o un individuo que tiene, está diagnosticado con, o se prevé que tenga una enfermedad o trastorno.

Además, puesto que el silenciamiento mediado por un agente de ARNi persiste durante varios días después de administrar la composición de agente de ARNi, en muchos ejemplos, es posible administrar la composición con una frecuencia de menos de una vez al día, o, para algunos ejemplos, solo una vez para el régimen terapéutico completo. Por ejemplo, el tratamiento de algunas células cancerígenas puede medirse por una única administración en bolo, mientras que una infección vírica crónica puede necesitar una administración regular, p.ej., una vez a la semana o una vez al mes.

45

Se describen un número de rutas ejemplares de distribución que pueden usarse para administrar un agente de ARNi a un sujeto. Además, el agente de ARNi puede formularse según un método ejemplar descrito en la presente memoria.

Subunidades de monómero de sustitución de ribosa (SMSR)

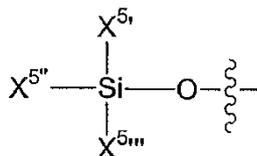
5 Estructura de SMSR

Un agente de ARN, p.ej., un agente de ARNi, que contiene una SMSR preferida, aunque no limitante, se presenta como fórmula (R-2) en la FIG.1. El vehículo incluye dos "puntos de unión a la estructura" (grupos hidroxilo), un "punto de unión al anclaje", y un ligando, que está conectado indirectamente al vehículo por medio de un anclaje intermedio. La SMSR puede ser la subunidad terminal 5' o 3' de la molécula de ARN, es decir, uno de los dos grupos "W" puede ser un grupo hidroxilo, y el otro grupo "W" puede ser una cadena de dos o más ribonucleótidos no modificados o modificados. De forma alternativa, la SMSR puede ocupar una posición interna, y ambos grupos "W" pueden ser uno o más ribonucleótidos no modificados o modificados. Más de una SMSR puede estar presente en una molécula de ARN, p.ej., un agente de ARNi. Las posiciones preferidas para la inclusión de una SMSR anclada a un resto, p.ej., un resto lipófilo, p.ej., colesterol, están en el extremo 3', el extremo 5', o internamente, en la cadena homocentido.

La molécula de ARN modificada de fórmula (R-2) puede obtenerse usando métodos sintéticos de oligonucleótido conocidos en la técnica. En una realización preferida, la molécula de ARN modificada de fórmula (R-2) puede prepararse incorporando uno o más de los compuestos monoméricos de SMSR correspondientes (monómeros de SMSR, véase, p.ej., A, B y C en la FIG. 1) en una cadena homocentido o antisentido en crecimiento, utilizando, p.ej. estrategias de acoplamiento de fosforamidita o H-fosfonato.

Los monómeros de SMSR generalmente incluyen dos grupos hidroxilo diferentemente funcionalizados (OFG¹ y OFG² en la FIG. 1), que están unidos a la molécula de transporte (véase A en la FIG. 1), y un punto de unión de anclaje. Como se usa en la presente memoria, el término "grupo hidroxilo funcionalizado" significa que el protón del hidroxilo se ha sustituido por otros sustituyente. Como se muestra en las estructuras representativas B y C en la FIG. 1, un grupo hidroxilo (OFG¹) en el vehículo está funcionalizado con un grupo protector (GP). El otro grupo hidroxilo (OFG²) puede estar funcionalizado con o bien (1) un reactivo de soporte de síntesis en fase líquida o sólida (círculo sólido) directamente o indirectamente a través de un conector, L, como en B, o (2) un resto que contiene fósforo, p.ej., una fosforamidita como en C. El punto de unión al anclaje puede estar conectado a un átomo de hidrógeno, un anclaje, o un ligando anclado en el momento que el monómero se incorpora en la cadena homocentido o antisentido en crecimiento (véase la variable "R" en la FIG. 1). Por consiguiente, el ligando anclado puede estar, aunque no necesitar estar unido al monómero en el momento en que el monómero se incorpora en la cadena en crecimiento. En ciertas realizaciones, el anclaje, el ligando o el ligando anclado pueden estar unidos a una SMSR "precursora" después que un monómero de SMSR "precursor" se haya incorporado a la cadena. La línea ondulada usada en la FIG. 1 (y en otro sitio en la presente memoria) se refiere a una conexión, y puede representar un enlace directo entre el resto y el punto de unión o una molécula de anclaje que está intercalada entre el resto y el punto de unión. Anclado directamente significa que el resto está unido directamente al punto de unión. Anclado indirectamente significa que hay una molécula de anclaje intercalada entre el punto de unión y el resto.

El grupo protector (OFG¹) puede seleccionarse como se desee, p.ej., de T.W. Greene y P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2ª Ed., John Wiley and Sons (1991). El grupo protector es preferiblemente estable bajo condiciones de síntesis de amidita, condiciones de almacenaje, y condiciones de síntesis de oligonucleótido. Los grupos hidroxilo, -OH, son grupos nucleófilos (es decir, bases de Lewis), que reaccionan a través de oxígeno con los electrófilos (es decir, ácidos de Lewis). Los grupos hidroxilo en que el hidrógeno se ha sustituido con un grupo protector, p.ej., un grupo triarilmetilo o un grupo trialquilsililo, son esencialmente no reactivos como nucleófilos en las reacciones de desplazamiento. Por consiguiente, el grupo hidroxilo protegido es útil en la prevención, p.ej., de homoacoplamiento de compuestos ejemplificada por la estructura C durante la síntesis de oligonucleótidos. En algunas realizaciones, un grupo protector preferido es el grupo dimetoxitritilo. En otras realizaciones, un grupo protector preferido es un grupo protector con base de silicio que tiene la fórmula posterior:

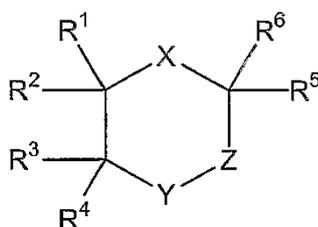


X^{5'}, X^{5''} y X^{5'''} pueden seleccionarse de alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, alcoxi, cicloalcoxi, aralcoxi, ariloxi, heteroariloxi, o siloxi, sustituidos o no sustituidos (es decir, R₃SiO-, los tres grupos "R" pueden ser cualquier combinación de los grupos enumerados anteriormente). X^{5'}, X^{5''} y X^{5'''} pueden ser todos iguales o diferentes; también se contempla una combinación en que dos de X^{5'}, X^{5''} y X^{5'''} son idénticos y el tercero es diferente. En ciertas realizaciones X^{5'}, X^{5''} y X^{5'''} incluyen al menos un grupo alcoxi o siloxi y puede ser cualquiera de los grupos enumerados en la FIG. 2, una combinación preferida incluye X^{5'}, X^{5''} = trimetilsiloxi y X^{5'''} = 1,3-(trifenilmetoxi)-2-propoxi o ciclododeciloxi.

5 Cuando el OFG² en B incluye un conector, p.ej., un conector orgánico largo, conectado a un reactivo de soporte soluble o insoluble, pueden emplearse técnicas de síntesis en disolución o fase sólida para construir una cadena de ribonucleótidos naturales y/o modificados una vez que OFG¹ se desprotege y está libre para reaccionar como un nucleófilo con otro nucleósido o monómero que contiene un grupo electrófilo (p.ej., un grupo amidita). De forma alternativa, una cadena de ribonucleótido u oligorribonucleótido natural o modificado puede acoplarse al monómero C por medio de un grupo amidita o grupo H-fosfonato en OFG². Posterior a esta operación, OFG¹ puede desbloquearse, y el grupo hidroxilo nucleófilo restaurado puede reaccionar con otro nucleósido o monómero que contiene un grupo electrófilo (véase FIG. 1). R' puede ser un alquilo o alqueno sustituido o no sustituido. En realizaciones preferidas, R' es metilo, alilo o 2-cianoetilo. R'' puede ser un grupo alquilo C₁-C₁₀, preferiblemente es un grupo ramificado que contiene tres o más carbonos, p.ej., isopropilo.

10 OFG² en B puede ser hidroxilo funcionalizado con un conector, que a su vez contiene un reactivo de soporte de síntesis en fase líquida o sólida al otro extremo del conector. El reactivo de soporte puede ser cualquier medio de soporte que puede soportar los monómeros descritos en la presente memoria. El monómero puede unirse a un soporte insoluble por medio de un conector, L, que permite al monómero (y la cadena en crecimiento) solubilizarse en el disolvente en que está situado el soporte. El monómero solubilizado, aún inmovilizado, puede reaccionar con reactivos en el disolvente circundante; los reactivos sin reaccionar y sub-productos solubles pueden limpiarse fácilmente del soporte sólido al que el monómero o productos derivados del monómero está unido. De forma alternativa, el monómero puede unirse a un resto de soporte soluble, p.ej., pueden usarse polietilenglicol (PEG) y técnicas de síntesis en fase líquida para construir la cadena. La selección del conector y el medio de soporte está dentro de las capacidades de la técnica. Generalmente el conector puede ser -C(O)(CH₂)_qC(O)-, o -C(O)(CH₂)_qS-, preferiblemente, es oxalilo, succinilo o tioglicolilo. Soportes de síntesis en fase sólida de vidrio de poro de control estándar no puede usarse en conjunto con grupos protectores sililo 5' lábil con fluoruro en porque el cristal se degrada por el fluoruro con una reducción significativa en la cantidad de producto de longitud completa. Se prefieren los soportes con base de poliestireno estable al fluoruro o PEG.

15 Los vehículos preferidos tienen la fórmula general (R-3) proporcionada a continuación. (En esa estructura los puntos de unión a la estructura preferidos pueden elegirse de R¹ o R²; R³ o R⁴; o R⁹ y R¹⁰ si Y es CR⁹R¹⁰ (dos posiciones se eligen para dar dos puntos de unión a la estructura, p.ej., R¹ y R⁴, o R⁴ y R⁹. Los puntos de unión al anclaje preferidos incluyen R⁷; R⁵ o R⁶ cuando X es CH₂. Los vehículos se describen a continuación como una entidad, que puede incorporarse en una cadena. Por consiguiente, se entiende que las estructuras también incluyen las situaciones en donde uno (en el caso de una posición terminal) o dos (en el caso de una posición interna) de los puntos de unión, p.ej., R¹ o R²; R³ o R⁴; o R⁹ o R¹⁰ (cuando Y es CR⁹R¹⁰), está conectado al fosfato, o fosfato modificado, p.ej., estructura que contiene azufre. P.ej., uno de los grupos R nombrados anteriormente puede ser -CH₂-, en el que un enlace está conectado al vehículo y uno al átomo de la estructura, p.ej., un oxígeno de unión o un átomo de fósforo central).



(R-3)

35 En que,
 X es N(CO)R⁷, NR⁷ o CH₂;
 Y es NR⁸, O, S, CR⁹R¹⁰;
 Z es CR¹¹R¹² o ausente;

40 Cada uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁹ y R¹⁰ es, independientemente, H, OR^a, o (CH₂)_nOR^b, con tal que al menos dos de R¹, R², R³, R⁴, R⁹ y R¹⁰ sean OR^a y/o (CH₂)_nOR^b;

Cada uno de R⁵, R⁶, R¹¹, y R¹² es, independientemente, un ligando H, alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con 1-3R¹³, o C(O)NHR⁷; o R⁵ y R¹¹ juntos son cicloalquilo C₃-C₈ opcionalmente sustituido con R¹⁴;

45 R⁷ puede ser un ligando, p.ej., R⁷ puede ser R^d, o R⁷ puede ser un ligando anclado indirectamente al vehículo, p.ej., a través de un resto de anclaje, p.ej. alquilo C₁-C₂₀ sustituido con NR^cR^d, o alquilo C₁-C₂₀ sustituido con NHC(O)R^d;

R⁸ es H o alquilo C₁-C₆;

R¹³ es hidroxilo, alcoxi C₁-C₄, o halo;

R¹⁴ es NR^eR⁷;

R¹⁵ es alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con ciano, o alqueno C₂-C₆;

R¹⁶ es alquilo C₁-C₁₀;

5 R¹⁷ es un reactivo de soporte en fase líquida o sólida;

L es -C(O)(CH₂)_qC(O)-, o C(O)(CH₂)_qS-;

R^a es CAr₃;

R^b es P(O)(O)H, P(OR¹⁵)N(R¹⁶)₂ o L-R¹⁷;

R^c es H o alquilo C₁-C₆;

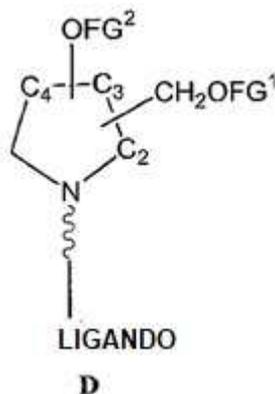
10 R^d es H o un ligando,

Cada Ar es, independientemente, arilo C₆-C₁₀ opcionalmente sustituido con alcoxi C₁-C₄;

n es 1-4; y q es 0-4.

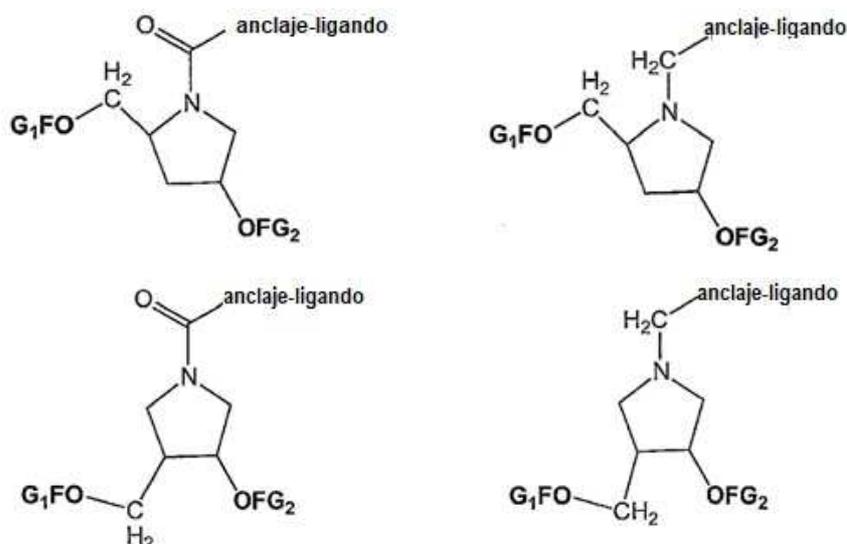
15 Los vehículos ejemplares incluyen aquellos en que, p.ej., X es N(CO)R⁷ o NR⁷, Y es CR⁹R¹⁰, y Z está ausente; o X es N(CO)R⁷, o NR⁷, Y es CR⁹R¹⁰, y Z es CR¹¹R¹²; o X es N(CO)R⁷ o NR⁷, Y es NR⁸, y Z es CR¹¹R¹²; o X es N(CO)R⁷ o NR⁷, Y es O, y Z es CR¹¹R¹²; o X es CH₂, Y es CR⁹C¹⁰; Z es CR¹¹R¹², y R⁵ y R¹¹ juntos forman cicloalquilo C₆ (H, z = 2), o el sistema anular indano, p.ej., X es CH₂, Y es CR⁹R¹⁰, Z es CR¹¹R¹², y R⁵ y R¹¹ juntos forman cicloalquilo C₅ (H, z = 1).

20 En ciertas realizaciones, el vehículo puede estar basado en el sistema anular de pirrolina o el sistema anular 4-hidroxiprolina, p.ej., X es N(CO)R⁷ o NR⁷, Y es CR⁹R¹⁰, y Z está ausente (D). OFG¹ está unido preferiblemente a un carbono primario, p.ej., un grupo alqueno exocíclico,

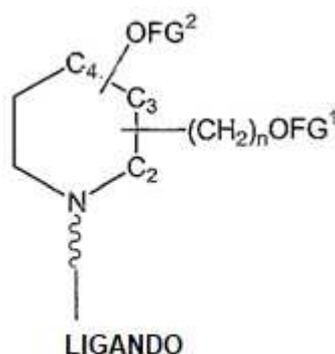


25 p.ej., un grupo metileno, conectado con uno de los carbonos en el anillo de cinco miembros (-CH₂OFG¹ en D). OFG² está preferiblemente unido directamente a uno de los carbonos en el anillo de cinco miembros (-OFG² en D). Para los vehículos con base de pirrolina, el -CH₂OFG¹ puede estar unido a C-2 y OFG² puede estar unido a C-3; o CH₂OFG¹ puede estar unido a C-3 y OFG² puede estar unido a C-4. En ciertas realizaciones, CH₂OFG¹ y OFG² pueden sustituirse geminalmente con uno de los carbonos referenciados anteriormente. Para los vehículos con base de 3-hidroxiprolina, -CH₂OFG¹ puede estar unido a C-2 y OFG² puede estar unido a C-4. Los monómeros con base de pirrolina y 4-hidroxiprolina pueden por lo tanto contener uniones (p.ej., enlaces carbono-carbono) en los que la rotación del enlace está restringida alrededor de esa unión particular, p.ej., la restricción que resulta por la presencia de un anillo. Por consiguiente, CH₂OFG¹ y OFG² pueden ser *cis* o *trans* el uno con respecto al otro en cualquiera de los emparejamientos delineados anteriormente. Por consiguiente, todos los isómeros *cis/trans* están expresamente incluidos. Los monómeros pueden contener además uno o más centros asimétricos y por consiguiente se dan como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros sencillos, diastereómeros individuales y mezclas diastereoméricas. Todas las formas isoméricas dichas de los monómeros están expresamente incluidas (p.ej., los centros que portan CH₂OFG¹ y OFG² pueden ambos tener la configuración R, o tener ambos la configuración S; o un centro puede tener la configuración R y el otro centro puede tener la configuración S y viceversa). El punto de unión al anclaje es preferiblemente nitrógeno. Ejemplos preferidos del vehículo D incluyen los siguientes:

35

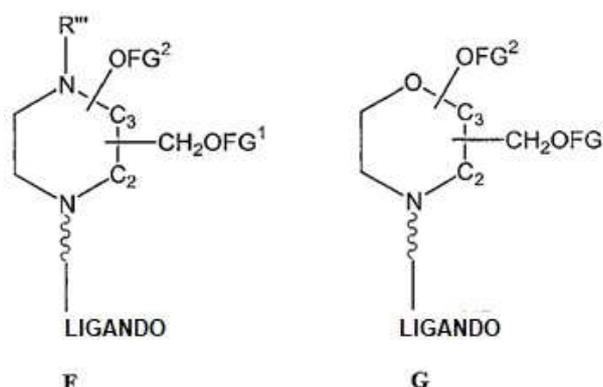


En ciertas realizaciones, el vehículo puede estar basado en el sistema anular de piperidina (E), p.ej., X es $N(CO)R^7$ o NR^7 , Y es CR^9R^{10} , y Z es $CR^{11}R^{12}$. OFG^1 es preferiblemente



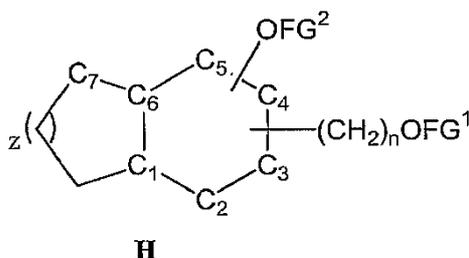
E

- 5 unido a un carbono primario, p.ej., un grupo alquileo exocíclico, p.ej., un grupo metileno ($n=1$) o grupo etileno ($n=2$), conectado a uno de los carbonos en el anillo de seis miembros $[-(CH_2)_nOFG^1$ en E]. OFG^2 está unido preferiblemente de forma directa a uno de los carbonos en el anillo de seis miembros ($-OFG^2$ en E). $-(CH_2)_nOFG^1$ y OFG^2 pueden estar dispuestos en una manera geminal en el anillo, es decir, ambos grupos pueden estar unidos al mismo carbono, p.ej., a C-2, C-3 o C-4. De forma alternativa, $-(CH_2)_nOFG^1$ y OFG^2 pueden estar dispuestos en una manera vecinal en el anillo, es decir, ambos grupos pueden estar unidos a átomos de carbono anulares adyacentes, p.ej., $-(CH_2)_nOFG^1$ puede estar unido a C-2 y OFG^2 puede estar unido a C-3; $-(CH_2)_nOFG^1$ puede estar unido a C-3 y OFG^2 puede estar unido a C-2; $-(CH_2)_nOFG^1$ puede estar unido a C-3 y OFG^2 puede estar unido a C-4; o $-(CH_2)_nOFG^1$ puede estar unido a C-4 y OFG^2 puede estar unido a C-3. Los monómeros basados en piperidina pueden por lo tanto contener uniones (p.ej. enlaces carbono-carbono) en los que la rotación del enlace está restringida alrededor de esa unión particular, p.ej. la restricción que resulta de la presencia de un anillo. Por consiguiente, $-(CH_2)_nOFG^1$ y OFG^2 pueden ser *cis* o *trans* el uno con respecto al otro en cualquiera de los emparejamientos delineados anteriormente. Por consiguiente, todos los isómeros *cis/trans* están expresamente incluidos. Los monómeros pueden contener también uno o más centros asimétricos y por consiguiente darse como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros sencillos, diastereómeros individuales y mezclas diastereoméricas. Todas las formas isoméricas dichas de los monómeros están incluidas expresamente (p.ej., los centros que portan CH_2OFG^1 y OFG^2 pueden tener ambos la configuración R; o tener ambos la configuración S; o un centro puede tener la configuración R y el otro centro puede tener la configuración S y viceversa). El punto de unión al anclaje es preferiblemente nitrógeno.
- 10
- 15
- 20
- 25 En ciertas realizaciones, el vehículo puede basarse en el sistema anular de piperazina (F), p.ej., X es $N(CO)R^7$ o NR^7 , Y es NR^8 , y Z es $CR^{11}R^{12}$, o el sistema anular de morfolina (G), p.ej., X es $N(CO)R^7$ o NR^7 , Y es O, y Z es $CR^{11}R^{12}$. OFG^1 es preferiblemente



unidos a un carbono primario, p.ej., un grupo alquileo exocíclico, p.ej., un grupo metileno, conectado a uno de los carbonos en el anillo de seis miembros ($-\text{CH}_2\text{OFG}^1$ en F o G). OFG^2 está unido preferiblemente de forma directa a uno de los carbonos en los anillos de seis miembros ($-\text{OFG}^2$ en F o G). Tanto para F como para G, $-\text{CH}_2\text{OFG}^1$ puede estar unido a C-2 y OFG^2 puede estar unido a C-3; o viceversa. En ciertas realizaciones, CH_2OFG^1 y OFG^2 pueden estar sustituidos de manera geminal a uno de los carbonos referenciados anteriormente. Los monómeros basados en piperazina y morfolina pueden por lo tanto contener uniones (p.ej. enlaces carbono-carbono) en los que la rotación del enlace está restringida alrededor de esa unión particular, p.ej. la restricción que resulta de la presencia de un anillo. Por consiguiente, CH_2OFG^1 y OFG^2 pueden ser *cis* o *trans* el uno con respecto al otro en cualquiera de los emparejamientos delineados anteriormente. Por consiguiente, todos los isómeros *cis/trans* están expresamente incluidos. Los monómeros pueden contener también uno o más centros asimétricos y por consiguiente darse como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros sencillos, diastereómeros individuales y mezclas diastereoméricas. Todas las formas isoméricas dichas de los monómeros están incluidas expresamente (p.ej., los centros que portan CH_2OFG^1 y OFG^2 pueden tener ambos la configuración R; o tener ambos la configuración S; o un centro puede tener la configuración R y el otro centro puede tener la configuración S y viceversa). R''' puede ser, p.ej., alquilo C₁-C₆, preferiblemente CH₃. El punto de unión al anclaje es preferiblemente nitrógeno tanto en F como en G.

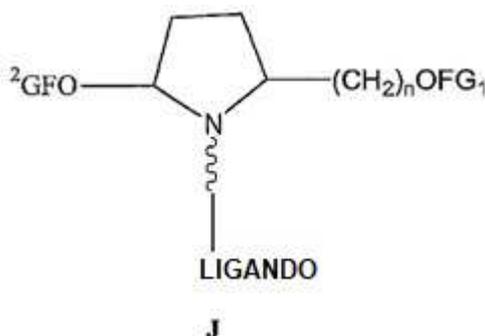
En ciertas realizaciones, el vehículo puede estar basado en el sistema anular decalina, p.ej., X es CH₂, Y es CR⁹R¹⁰; Z es CR¹¹R¹², y R⁵ y R¹¹ juntos forman cicloalquilo C₆ (H, z = 2), o el sistema anular indano, p.ej., X es CH₂, Y es CR⁹R¹⁰; Z es CR¹¹R¹², y R⁵ y R¹¹ juntos forman cicloalquilo C₅ (H, z = 1). OFG^1 está unido preferiblemente a un carbono primario,



p.ej., un grupo metileno exocíclico, (n=1) o grupo etileno (n=2), conectado a uno de C-2, C-3, C-4 o C-5 [$-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ en H]. OFG^2 está unido preferiblemente de forma directa a uno de C-2, C-3, C-4 o C-5 ($-\text{OFG}^2$ en H). $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ y OFG^2 pueden estar dispuestos de manera geminal en el anillo, es decir, ambos grupos pueden estar unidos al mismo carbono, p.ej., a C-2, C-3, C-4 o C-5. De forma alternativa, $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ y OFG^2 pueden estar dispuestos en una manera vecinal en el anillo, es decir, ambos grupos pueden estar unidos a átomos de carbono anulares adyacentes, p.ej., $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ puede estar unido a C-2 y OFG^2 puede estar unido a C-3; $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ puede estar unido a C-3 y OFG^2 puede estar unido a C-2; $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ puede estar unido a C-3 y OFG^2 puede estar unido a C-4; o $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ puede estar unido a C-4 y OFG^2 puede estar unido a C-3; $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ puede estar unido a C-4 y OFG^2 puede estar unido a C-5; o $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ puede estar unido a C-5 y OFG^2 puede estar unido a C-4. Los monómeros basados en decalina o indano pueden por lo tanto contener uniones (p.ej. enlaces carbono-carbono) en los que la rotación del enlace está restringida alrededor de esa unión particular, p.ej. la restricción que resulta de la presencia de un anillo. Por consiguiente, $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ y OFG^2 pueden ser *cis* o *trans* el uno con respecto al otro en cualquiera de los emparejamientos delineados anteriormente. Por consiguiente, todos los isómeros *cis/trans* están expresamente incluidos. Los monómeros pueden contener también uno o más centros asimétricos y por consiguiente darse como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros sencillos, diastereómeros individuales y mezclas diastereoméricas. Todas las formas isoméricas dichas de los monómeros están incluidas expresamente (p.ej., los centros que portan CH_2OFG^1 y OFG^2 pueden tener ambos la configuración R; o tener ambos la configuración S; o un centro puede tener la configuración R y el otro centro puede tener la configuración S

y viceversa). En una realización preferida, los sustituyentes a C-1 y C-6 son *trans* el uno con respecto al otro. El punto de unión al anclaje es preferiblemente C-6 o C-7.

Otros vehículos pueden incluir aquellos basados en 3-hidroxiprolina (J). Por consiguiente, $-(CH_2)_nOFG^1$ y OFG^2 pueden ser *cis* o *trans* el uno con respecto al otro. Por consiguiente, todos los isómeros *cis/trans* están expresamente incluidos. Los monómeros pueden contener también uno o más centros asimétricos



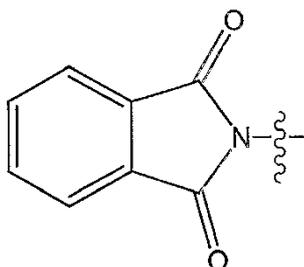
y por consiguiente se dan como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros sencillos, diastereómeros individuales y mezclas diastereoméricas. Todas las formas isoméricas dichas de los monómeros están incluidas expresamente (p.ej., los centros que portan CH_2OFG^1 y OFG^2 pueden tener ambos la configuración R; o tener ambos la configuración S; o un centro puede tener la configuración R y el otro centro puede tener la configuración S y viceversa). El punto de unión al anclaje es preferiblemente nitrógeno.

Los vehículos cíclicos representativos se muestran en la FIG. 3.

En ciertas realizaciones, un resto, p.ej., un ligando puede estar conectado indirectamente al vehículo por medio de la intermediación de un anclaje intermedio. Los anclajes están conectados al vehículo en el punto de unión de anclaje (PUA) y puede incluir cualquier resto que contenga carbono C₁-C₁₀₀ (p.ej., C₁-C₇₅, C₁-C₅₀, C₁-C₂₀, C₁-C₁₀, C₁-C₆), preferiblemente que tenga al menos un átomo de nitrógeno. En realizaciones preferidas, el átomo de nitrógeno forma parte de un grupo amino terminal en el anclaje, que puede servir como un punto de conexión para el ligando. Los anclajes preferidos (subrayados) incluyen PUA-(CH₂)_nNH-; PUA-C(O)(CH₂)_nNH-; PUA-NR^{'''}(CH₂)_nNH-; PUA-C(O)-(CH₂)_n-C(O)-; PUA-C(O)-(CH₂)_n-C(O)O-; PUA-C(O)-O-; PUA-C(O)-(CH₂)_n-NH-C(O)-; PUA-C(O)-(CH₂)_n-; PUA-C(O)-NH-; PUA-C(O)-; PUA-(CH₂)_n-C(O)-; PUA-(CH₂)_n-C(O)O-; PUA-(CH₂)_n-; o PUA-(CH₂)_n-NH-C(O)-; en que n es 1-6 y R^{'''} es alquilo C₁-C₆. En otras realizaciones, el nitrógeno puede formar parte de un grupo oxiamino terminal, p.ej., -ONH₂, o grupo hidrazino, -NHNH₂. El anclaje puede estar opcionalmente sustituido, p.ej., con hidroxilo, alcoxi, perhaloalquilo y/u opcionalmente insertado con uno o más heteroátomos adicionales, p.ej., N, O o S. Los ligandos anclados preferidos pueden incluir, p.ej., PUA-(CH₂)_nNH(LIGANDO); PUA-C(O)(CH₂)_nNH(LIGANDO); PUA-NR^{'''}(CH₂)_nNH(LIGANDO); PUA-(CH₂)_nONH(LIGANDO); PUA-C(O)(CH₂)_nONH(LIGANDO); PUA-NR^{'''}(CH₂)_nONH(LIGANDO); PUA-(CH₂)_nNHNH₂(LIGANDO); PUA-C(O)(CH₂)_nNHNH₂(LIGANDO); PUA-NR^{'''}(CH₂)_nNHNH₂(LIGANDO); PUA-C(O)-(CH₂)_n-C(O)(LIGANDO); PUA-C(O)-(CH₂)_n-C(O)O(LIGANDO); PUA-C(O)-O(LIGANDO); PUA-C(O)(CH₂)_n-NH-C(O)(LIGANDO); PUA-C(O)-(CH₂)_n(LIGANDO); PUA-C(O)-NH(LIGANDO); PUA-C(O)LIGANDO; PUA-(CH₂)_n-C(O)(LIGANDO); PUA-(CH₂)_n-C(O)O(LIGANDO); PUA-(CH₂)_n-(LIGANDO); o PUA-(CH₂)_n-NH-C(O)(LIGANDO);

En otras realizaciones el anclaje puede incluir un resto electrófilo, preferiblemente en la posición terminal del anclaje. Los restos electrófilos preferidos incluyen, p.ej., un aldehído, haluro de alquilo, mesilato, tosilato, nosilato o brosilato, o un éster de ácido carboxílico activado, p.ej., un éster NHS o un éster de pentafluorofenilo. Los anclajes preferidos (subrayados) incluyen PUA-(CH₂)_nCHO; PUA-C(O)(CH₂)_nCHO; o PUA-NR^{'''}(CH₂)_nCHO, en que n es 1-6 y R^{'''} es alquilo C₁-C₆; o PUA-(CH₂)_nC(O)ONHS; PUA-C(O)(CH₂)_nC(O)ONHS; o PUA-NR^{'''}(CH₂)_nC(O)ONHS, en que n es 1-6 y R^{'''} es alquilo C₁-C₆; PUA-(CH₂)_nC(O)OC₆F₅; PUA-C(O)(CH₂)_nC(O)OC₆F₅; o PUA-NR^{'''}(CH₂)_nC(O)OC₆F₅, en que n es 1-6 y R^{'''} es alquilo C₁-C₆; o -(CH₂)_nCH₂GS; PUA-C(O)(CH₂)_nCH₂GS; o PUA-NR^{'''}(CH₂)_nCH₂GS, en que n es 1-6 y R^{'''} es alquilo C₁-C₆ (GS puede ser un grupo saliente, p.ej., haluro, mesilato, tosilato, nosilato, brosilato). El anclaje puede realizarse acoplado un grupo nucleófilo de un ligando, p.ej., un grupo tiol o amino con un grupo electrófilo en el anclaje.

En otras realizaciones, puede ser deseable para el monómero de SMSR o una SMSR incluir un grupo ftalimido (K) en la posición terminal del anclaje.

**K**

Entidades ancladas

Una amplia variedad de entidades pueden anclarse a un agente de ARNi, p.ej., al vehículo de una SMSR. Se describen ejemplos a continuación en el contexto de una SMSR aunque esto solo se prefiere, las entidades pueden acoplarse a otros puntos de un agente de ARNi.

Los restos preferidos son ligandos, que se acoplan, preferiblemente de forma covalente, o bien directamente o indirectamente por medio de un anclaje intermedio, al vehículo de SMSR. En realizaciones preferidas, el ligando se une al vehículo por medio de un anclaje intermedio. Como se trata anteriormente, el ligando o ligando anclado puede estar presente en el monómero de SMSR cuando el monómero de SMSR se incorpora a la cadena en crecimiento. En algunas realizaciones, el ligando puede incorporarse a una SMSR "precursora" después de que un monómero de la SMSR "precursora" se ha incorporado a la cadena en crecimiento. Por ejemplo, un monómero de SMSR que tiene, p.ej., un anclaje terminado en amino (es decir, que no tiene asociado un ligando), p.ej., PUA-(CH₂)_nNH₂ puede incorporarse en una cadena homosen sentido o antisentido en crecimiento. En una operación posterior, es decir, después de la incorporación del monómero precursor en la cadena, un ligando que tiene un grupo electrófilo, p.ej., un grupo éster de pentafluorofenilo o aldehído, puede unirse posteriormente a la SMSR precursora por acoplamiento del grupo electrófilo del ligando con el grupo nucleófilo terminal del anclaje de SMSR precursora.

En realizaciones preferidas, un ligando altera la distribución, direccionamiento o tiempo de vida de un agente de ARNi al que se incorpora. En realizaciones preferidas un ligando proporciona una afinidad mejorada por una diana seleccionada, p.ej., molécula, célula o tipo de célula, compartimiento, p.ej., un compartimiento celular u orgánico, tejido, órgano o región del cuerpo, como, p.ej., en comparación con una especie ausente como un ligando. Los ligandos preferidos no tomarán parte en el emparejamiento doble en un ácido nucleico de fragmento doble.

Los ligandos preferidos pueden mejorar las propiedades de transporte, hibridación y especificidad y pueden mejorar también la resistencia a la nucleasa del oligorribonucleótido natural o modificado resultante, o una molécula polimérica que comprende cualquier combinación de monómeros descrita en la presente memoria y/o ribonucleótidos naturales o modificados.

Los ligandos en general pueden incluir modificadores terapéuticos, p.ej., para mejorar la absorción; compuestos diagnósticos o grupos indicadores p.ej., para monitorizar la distribución; agentes de reticulado; y restos que confieren resistencia a la nucleasa. Los ejemplos generales incluyen lípidos, esteroides, vitaminas, azúcares, proteínas, péptidos, poliaminas y miméticos peptídicos.

Los ligandos pueden incluir una sustancia que se da de forma natural, tal como una proteína (p.ej., albúmina sérica humana (HSA), lipoproteína de baja densidad (LDL) o globulina); carbohidrato (p.ej., un dextrano, pululano, quitina, quitosano, inulina, ciclodextrina o ácido hialurónico); o un lípido. El ligando puede ser también una molécula recombinante o sintética, tal como un polímero sintético, p.ej., un poliaminoácido sintético. Ejemplos de poliaminoácidos incluyen poliaminoácido que es una polilisina (PLL), poli(ácido L-aspártico), poli(ácido L-glutámico), copolímero de estireno-anhídrido de ácido maleico, copolímero de poli(L-lactida-co-glicolida), copolímero de diviniléter-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), alcohol de polivinilo (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida o polifosfazina. Ejemplos de poliaminas incluyen: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopéptido-poliamina, poliamina peptidomimética, dendrímero de poliamina, arginina, amidina, protamina, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina o un péptido alfa-helicoidal.

Los ligandos pueden incluir también grupos de direccionamiento, p.ej., un agente de direccionamiento a una célula o tejido, p.ej., una lectina, glucoproteína, lípido o proteína, p.ej., un anticuerpo, que se une a un tipo de célula específica tal como una célula renal. Un grupo de direccionamiento puede ser una tirotropina, melanotropina, lectina, glucoproteína, proteína surfactante A, carbohidrato de mucina, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, manosa multivalente con N-acetil-glucosamina, fucosa multivalente, poliaminoácidos glucosilados, galactosa multivalente, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, un lípido, colesterol, un esteroide, ácido biliar, folato, vitamina B12, biotina, o un péptido RGD o mimético de péptido RGD.

Otros ejemplos de ligandos incluyen tintes, agentes de intercalado (p.ej., acridinas), reticuladores (p.ej., psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, Safirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (p.ej., fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificiales (p.ej., EDTA), moléculas lipófilas, p.ej., colesterol, ácido cólico, ácido adamantano-acético, ácido 1-pirenobutírico, dihidrotestosterona, 1,3-bis-O(hexadecil)glicerol, grupo genariloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritilo, o fenoxazina) y conjugados peptídicos (p.ej., péptido antenapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (p.ej., PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (p.ej., biotina), facilitadores del transporte/absorción (p.ej., aspirina, vitamina E, ácido fólico), ribonucleasas sintéticas (p.ej., imidazol, bisimidazol, histamina, agrupaciones de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complejos Eu³⁺ de tetraazamacrociclos), dinitrofenilo, HRP o AP.

Los ligandos pueden ser proteínas, p.ej., glucoproteínas, o péptidos, p.ej., moléculas que tienen una afinidad específica por un co-ligando, o anticuerpos p.ej., un anticuerpo, que se une a un tipo de célula específica tal como una célula cancerígena, célula endotelial, o célula ósea. Los ligandos pueden incluir también hormonas y receptores de hormonas. Pueden incluir también especies no peptídicas, tales como lípidos, lectinas, carbohidratos, vitaminas, cofactores, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, manosa multivalente con N-acetilglucosamina, o fucosa multivalente. El ligando puede ser, por ejemplo, un lipopolisacárido, un activador de p38 MAP quinasa, o un activador de NF- κ B.

El ligando puede ser una sustancia, p.ej., un fármaco, que puede aumentar la absorción del agente de ARNi en la célula, por ejemplo, alterando el citoesqueleto de la célula, p.ej., alterando los microtúbulos, microfilamentos y/o filamentos intermedios de la célula. El fármaco puede ser, por ejemplo, taxona, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, japlakinolida, latrunculina A, faloidina, swinholida A, indanocina o mioservina.

El ligando puede aumentar la absorción del agente de ARNi en la célula activando una respuesta inflamatoria, por ejemplo. Los ligandos ejemplares que tendrían dicho efecto incluyen factor alfa de necrosis tumoral (TNF α), interleuquina-1 beta, o gamma-interferón.

En un aspecto, el ligando es un lípido o molécula basada en lípido. Dicho lípido o molécula basada en lípido se une preferiblemente a una proteína sérica, p.ej., albúmina sérica humana (HSA). Un ligando que se une a HSA permite la distribución del conjugado a un tejido diana, p.ej., un tejido diana que no es el riñón del cuerpo. Por ejemplo, el tejido diana puede ser el hígado, incluyendo las células parenquimales del hígado. Otras moléculas que pueden unirse a HSA pueden usarse también como ligandos. Por ejemplo, puede usarse neproxina o aspirina. Un ligando lipídico o con base de lípido puede (a) aumentar la resistencia a la degradación del conjugado, (b) aumentar el direccionamiento o transporte a una célula o membrana celular diana, y/o (c) puede usarse para ajustar la unión a una proteína sérica, p.ej., HSA.

Un ligando con base lipídica puede usarse para modular, p.ej., controlar la unión del conjugado a un tejido diana. Por ejemplo, un ligando lipídico o con base de lípido que se une a HSA más fuertemente será menos probable que se dirija al riñón y por lo tanto menos probable que se depure del cuerpo. Un ligando lipídico o con base de lípido que se une a HSA menos fuertemente puede usarse para dirigir el conjugado al riñón.

En una realización preferida, el ligando con base de lípido se une a HSA. Preferiblemente, se une a HSA con una afinidad suficiente de manera que el conjugado se distribuirá preferiblemente a un tejido que no es el riñón. Sin embargo, se prefiere que la afinidad no sea tan fuerte como para que la unión HSA-ligando no pueda revertirse.

En otra realización preferida, el ligando con base de lípido se une a HSA débilmente o no se une, de manera que el conjugado se distribuirá preferiblemente al riñón. Otros restos que tienen como objetivo las células renales pueden usarse también en lugar de o además del ligando con base de lípido.

En otro aspecto, el ligando es un resto, p.ej., una vitamina, que se absorbe por una célula diana, p.ej., una célula proliferativa. Estos son particularmente útiles para tratar trastornos caracterizados por la proliferación celular indeseada, p.ej., del tipo maligno y no maligno, p.ej., células cancerígenas. Vitaminas ejemplares incluyen vitamina A, E y K. Otras vitaminas ejemplares incluidas son vitamina B, p.ej., ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal u otras vitaminas o nutrientes absorbidos por las células cancerígenas. También se incluyen HSA y lipoproteína de baja densidad (LDL).

En otro aspecto, el ligando es un agente de permeación celular, preferiblemente un agente de permeación celular helicoidal. Preferiblemente, el agente es anfipático. Un agente ejemplar es un péptido tal como tat o antenopedia. Si el agente es un péptido, puede modificarse, incluyendo un peptidil-mimético, invertómeros, uniones no peptídicas o pseudo-peptídicas, y el uso de D-aminoácidos. El agente helicoidal es preferiblemente un agente alfa-helicoidal, que tiene preferiblemente una fase lipófila y una lipófila.

El ligando puede ser un péptido o peptidomimético. Un peptidomimético (también denominado en la presente memoria como un oligopeptidomimético) es una molécula capaz de plegarse en una estructura tridimensional definida similar a un péptido natural. La unión del péptido y los peptidomiméticos a los agentes de ARNi pueden afectar a la distribución farmacocinética del ARNi, tal como mejorando el reconocimiento y absorción celular. El resto

ES 2 702 942 T3

peptídico o peptidomimético puede ser de aproximadamente 5-50 aminoácidos de largo, p.ej., aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos de largo (véase la Tabla 1, por ejemplo).

Tabla 1. Péptidos de permeación celular ejemplares

Péptido de permeación celular	Secuencia de aminoácido	Referencia
Penetratina	RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:1)	Derossi <i>et al.</i> , J. Biol. Chem. 269:10444, 1994
Fragmento Tat (48-60)	GRKKRRQRRRPPQC (SEQ ID NO:2)	Vives <i>et al.</i> , J. Biol. Chem., 272:16010, 1997
Péptido con base de secuencia señal	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKRKY (SEQ ID NO:3)	Chaloin <i>et al.</i> , Biochem. Biophys. Res. Commun., 243:601, 1998
PVEC	LLILRRRIRKQAHASK (SEQ ID NO:4)	Elmqvist <i>et al.</i> , Exp. Cell Res., 269:237, 2001
Transportano	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO:5)	Pooga <i>et al.</i> , FASEB J., 12:67, 1998
Péptido de modelo anfifílico	KLALKLALKALKAALKLA (SEQ ID NO:6)	Oehlke <i>et al.</i> , Mol. Ther., 2:339, 2000
Arg ₉	RRRRRRRRR (SEQ ID NO:7)	Mitchell <i>et al.</i> , J. Pept. Res., 56:318, 2000
Que permea la pared celular bacteriana	KFFKFFKFFK (SEQ ID NO:8)	
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRN LVPRTES (SEQ ID NO:9)	
Cecropina P1	SWLSKTAKKLENSAKKRISGIAIAIQGGP R (SEQ ID NO:10)	
α -defensina	ACYCRIPACIAGERRYGTCTYQGRWAFCC (SEQ ID NO:11)	
b-defensina	DHYNCSVSSGGQCLYSACPIFTKIQTGTCYR GKAKCCK (SEQ ID NO:12)	
Bactenecina	RKCRIVVIRVCR (SEQ ID NO:13)	
PR-39	RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIIPPGFPP RFPPRFPGKR-NH ₂ (SEQ ID NO:14)	

Indolicidina	ILPWKWPWWPWRR-NH2 (SEQ ID NO:15)	

Un péptido o peptidomimético puede ser, por ejemplo, un péptido de permeación celular, péptido catiónico, péptido anfipático o péptido hidrófobo (p.ej., que consiste principalmente en Tyr, Trp o Phe). El resto peptídico puede ser un péptido dendrímero, péptido restringido o péptido reticulado. En otra alternativa, el resto peptídico puede incluir una secuencia de traslocación de la membrana hidrófoba (MTS). Un péptido que contienen MTS hidrófobo ejemplar es RFGF que tiene la secuencia de aminoácidos AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO:16). Un análogo de RFGF (p.ej., secuencia de aminoácidos AALLPVLLAAP (SEQ ID NO:17)) que contiene un MTS hidrófobo puede también ser un resto de direccionamiento. El resto peptídico puede ser un péptido de "distribución", que puede llevar grandes moléculas polares que incluyen péptidos, oligonucleótidos, y proteína, a través de las membranas celulares. Por ejemplo, secuencias de la proteína Tat de VIH (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO:18)) y la proteína Antennapedia de *Drosophila* (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:19)) se ha encontrado que son capaces de funcionar como péptidos de distribución. Un péptido o peptidomimético puede codificarse por una secuencia aleatoria de ADN, tal como un péptido identificado a partir de una biblioteca de representación de fagos, o una biblioteca combinatoria una perla un compuesto (UPUC) (Lam *et al.*, Nature, 354:82-84, 1991). Preferiblemente el péptido o peptidomimético anclado a un agente de ARNi por medio de una unidad monomérica incorporada es un péptido de direccionamiento a una célula tal como un péptido de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) o mimético RGD. Un resto peptídico puede oscilar en longitud de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 40 aminoácidos. Los restos peptídicos pueden tener una modificación estructural, para así aumentar la estabilidad o dirigir las propiedades conformacionales. Cualquiera de las modificaciones estructurales descritas a continuación puede utilizarse.

Un resto peptídico RGD puede usarse para dirigirse a una célula tumoral, tal como una célula tumoral endotelial o una célula tumoral de cáncer de mama (Zitzmann *et al.*, Cancer Res., 62:5139-43, 2002). Un péptido RGD puede facilitar el direccionamiento de un agente de ARNi hacia los tumores de una variedad de otros tejidos, que incluyen el pulmón, riñón, bazo o hígado (Aoki *et al.*, Cancer Gene Therapy 8:783-787, 2001). Preferiblemente, el péptido RGD facilitará el direccionamiento de un agente de ARNi al riñón. El péptido RGD puede ser lineal o cíclico, y puede modificarse, p.ej., glucosilarse y metilarse para facilitar el direccionamiento a tejidos específicos. Por ejemplo, un péptido RGD glucosilado puede distribuir un agente de ARNi a una célula tumoral que expresa $\alpha_v\beta_3$ (Haubner *et al.*, Jour. Nucl. Med., 42:326-336, 2001).

Pueden usarse péptidos que se dirigen a marcadores enriquecidos en células proliferativas. P.ej., los péptidos y peptidomiméticos que contienen RGD pueden dirigirse a células cancerígenas, en particular células que muestran una integrina $\alpha_v\beta_3$. Por consiguiente, se podrían usar péptidos RGD, péptidos cíclicos que contienen RGD, péptidos RGD que incluyen D-aminoácidos, además de miméticos de RGD sintéticos. Además de RGD, se pueden usar otros restos que se dirigen al ligando de integrina $\alpha_v\beta_3$. Generalmente, dichos ligandos pueden usarse para controlar las células proliferativas y la angiogénesis. Los conjugados preferidos de este tipo incluyen un agente de ARNi que tiene como objetivo PECAM-1, VEGF u otro gen cancerígeno, p.ej., un gen cancerígeno descrito en la presente memoria.

Un "péptido de permeación celular" es capaz de permear una célula, p.ej., una célula microbiana, tal como una célula bacteriana o fúngica, o una célula de mamífero, tal como una célula humana. Un péptido que permea una célula microbiana puede ser, por ejemplo, un péptido lineal α -helicoidal (p.ej., LL-37 o Ceropina P1), un péptido que contiene un enlace disulfuro (p.ej., α -defensina, β -defensina o bactenecina), o un péptido que contiene solo uno o dos aminoácidos dominantes (p.ej., PR-39 o indolicidina). Un péptido de permeación celular puede incluir también una señal de localización nuclear (NLS). Por ejemplo, un péptido de permeación celular puede ser un péptido anfipático bipartito, tal como MPG, que se deriva del dominio peptídico de fusión de VIH-1 gp41 y la NLS del antígeno T grande de SV40 (Simeoni *et al.*, Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

En una realización, un péptido de direccionamiento anclado a una SMSR puede ser un péptido α -helicoidal anfipático. Los péptidos α -helicoidales anfipáticos ejemplares incluyen, aunque no están limitados a, cecropinas, licotoxinas, paradaxinas, buforina, CPF, péptido parecido a bombinina (BLP), catelicidinas, ceratotoxinas, péptidos *S. clava*, péptidos antimicrobianos intestinales de los mixines (HFIAPs), magaininas, brevininas-2, dermaseptinas, melitinas, pleurocidina, péptidos H₂A, péptidos *Xenopus*, esculentinis-1 y caerinas. Se considerará preferiblemente un número de factores para mantener la integridad de la hélice de la hélice. Por ejemplo, se utilizará un número máximo de residuos de estabilización de la hélice (p.ej., leu, ala o lys) y se utilizará un número mínimo de residuos de desestabilización de la hélice (p.ej., prolina o unidades monoméricas cíclicas). El residuo terminal se considerará (por ejemplo Gly es un residuo N-terminal ejemplar y/o puede usarse la amidación C-terminal para proporcionar un enlace de H extra para estabilizar la hélice. La formación de puentes salinos entre residuos con cargas opuestas, separados por $i \pm 3$ o $i \pm 4$ posiciones pueden proporcionar estabilidad. Por ejemplo, los residuos catiónicos tales como lisina, arginina, homo-arginina, ornitina o histidina pueden formar puentes salinos con los residuos aniónicos glutamato o aspartato.

Los ligandos peptídicos y peptidomiméticos incluyen los que tienen péptidos que se dan de forma natural o modificados, p.ej., péptidos D o L; péptidos α , β o γ ; N-metilpéptidos; azapéptidos; péptidos que tienen una o más

amidas, es decir, péptido, uniones sustituidas con una o más uniones de urea, tiourea, carbamato, o uniones sulfonilurea; o péptidos cíclicos.

Métodos para hacer agentes de ARNi

5 Los agentes de ARNi pueden incluir bases modificadas o que no se dan de forma natural, p.ej., bases descritas en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos en copropiedad y en tramitación con la presente, núm. de serie 60/463.772, presentada el 17 de abril de 2003, y/o en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos en copropiedad y en tramitación con la presente núm. de serie 60/465.802, presentada el 25 de abril de 2003. Los monómeros y los agentes de ARNi descritos en la presente memoria, que opcionalmente puede incluir dichas bases, pueden hacerse también por los métodos encontrados en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos núm. de serie 60/463.772 presentada el 17 de abril de 2003, y/o en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos núm. de serie 60/465.802, presentada el 25 de abril de 2003.

15 Además, se describen en la presente memoria agentes de ARNi que tienen una base modificada o que no se da de forma natural y otro elemento descrito en la presente memoria. P.ej., se describe en la presente memoria un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi palindrómico, un agente de ARNi que tiene un emparejamiento no canónico, un agente de ARNi que tiene como objetivo un gen descrito en la presente memoria, p.ej., un gen activo en el riñón, un agente de ARNi que tiene una arquitectura o estructura descrita en la presente memoria, un ARNi asociado con un agente de distribución anfipático descrito en la presente memoria, un ARNi asociado con un módulo de distribución de fármaco descrito en la presente memoria, un agente de ARNi administrado como se describe en la presente memoria, o un agente de ARNi formulado como se describe en la presente memoria, que incorpora además una base modificada o que no se da de forma natural.

20 La síntesis y purificación de conjugados peptídicos de oligonucleótidos puede realizarse por métodos establecidos. Véase, por ejemplo, Trufert *et al.*, *Tetrahedron*, 52:3005, 1996; y Manoharan "Oligonucleotide Conjugates in Antisense Technology", en *Antisense Drug Technology*, ed. S.T. Crooke, Marcel Dekker, Inc., 2001. Los métodos ejemplares se muestran en las FIGs. 4 y 5.

25 En una realización descrita en la presente memoria, un peptidomimético puede modificarse para crear un péptido restringido que adopta una conformación preferida distinta y específica, que puede aumentar la potencia y selectividad del péptido. Por ejemplo, el péptido restringido puede ser un azapéptido (Gante, *Synthesis*, 405-413, 1989). Un azapéptido se sintetiza sustituyendo el carbono α de un aminoácido con un átomo de nitrógeno sin cambiar la estructura de la cadena lateral del aminoácido. Por ejemplo, el azapéptido puede sintetizarse usando hidrazina en métodos de acoplamiento de síntesis de péptidos tradicionales, tales como haciendo reaccionar hidrazina con un "donante carbonilo", p.ej., fenilcloroformiato. Una síntesis de azapéptido general se muestra en la FIG. 6.

35 En una realización descrita en la presente memoria, un péptido o peptidomimético (p.ej., un péptido o peptidomimético anclado a una SMSR) puede ser un N-metilpéptido. Los N-metilpéptidos están compuestos de N-metilaminoácidos, que proporcionan un grupo metilo adicional en la estructura peptídica, proporcionando así potencialmente medios adicionales de resistencia a la escisión proteolítica. Los N-metilpéptidos pueden sintetizarse por métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Lindgren *et al.*, *Trends Pharmacol. Sci.* 21:99, 2000; Cell Penetrating Peptides: Processes and Applications, Langel, ed., CRC Press, Boca Ratón, FL, 2002; Fische *et al.*, *Bioconjugate. Chem.* 12:825, 2001; Wander *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 124:13382, 2002). Por ejemplo, un péptido Ant o Tat puede ser un N-metilpéptido. Una síntesis ejemplar se muestra en la FIG. 7.

45 En una realización descrita en la presente memoria, un péptido o peptidomimético (p.ej., un péptido o peptidomimético anclado a una SMSR) puede ser un β -péptido. Los β -péptidos forman estructuras secundarias estables tales como hélices, láminas plegadas, giros y horquillas en disoluciones. Sus derivados cíclicos pueden plegarse en nanotubos en el estado sólido. Los β -péptidos son resistentes a la degradación por enzimas proteolíticas. Los β -péptidos pueden sintetizarse por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un péptido Ant o Tat puede ser un β -péptido. Una síntesis ejemplar se muestra en la FIG. 8.

50 En una realización descrita en la presente memoria, un péptido o peptidomimético (p.ej., un péptido o peptidomimético anclado a una SMSR) puede ser un oligocarbamato. Los péptidos de oligocarbamato se internalizan en una célula mediante una ruta de transporte facilitada por vehículos de carbamato. Por ejemplo, un péptido Ant o Tat puede ser un oligocarbamato. Una síntesis ejemplar se muestra en la FIG. 9.

55 En una realización descrita en la presente memoria, un péptido o peptidomimético (p.ej., un péptido o peptidomimético anclado a una SMSR) puede ser un conjugado de oligourea (o un conjugado de oligotiourea), en que el enlace amida de un peptidomimético se sustituye con un resto urea. La sustitución del enlace amida proporciona resistencia aumentada a la degradación por enzimas proteolíticas, p.ej., enzimas proteolíticas en el tracto gastrointestinal. En una realización, un conjugado de oligourea se ancla a un agente de ARNi para usar en la distribución oral. La estructura en cada unidad de repetición de un peptidomimético de oligourea puede extenderse por un átomo de carbono en comparación con el aminoácido natural. La extensión del átomo de carbono sencillo puede aumentar la estabilidad peptídica y lipofilicidad por ejemplo. Un péptido de oligourea puede por lo tanto, ser

ventajoso cuando un agente de ARNi tiene como objetivo pasar a través de una pared celular bacteriana, o cuando un agente de ARNi debe atravesar la barrera hematoencefálica, tal como para el tratamiento de un trastorno neurológico. En una realización, una unidad de enlace de hidrógeno se conjuga al péptido de oligourea, de manera que se crea una afinidad aumentada con un receptor. Por ejemplo, un péptido Ant o Tat puede ser un conjugado de oligourea (o un conjugado de oligotiourea). Una síntesis ejemplar se muestra en la FIG. 10.

Los conjugados peptídicos de ARNi descritos en la presente memoria pueden afiliarse con, p.ej., anclarse a, SMSR que se da en varias posiciones en un agente de ARNi. Por ejemplo, un péptido puede conjugarse de forma terminal, en la cadena o bien homosen sentido o en la antisentido, o un péptido puede bisconjugarse (un péptido anclado a cada extremo, uno conjugado a la cadena homosen sentido, y uno conjugado a la cadena antisentido). En otra opción, el péptido puede conjugarse internamente, tal como en el bucle de un agente de ARNi en horquilla corto. En aún otra opción, el péptido puede afiliarse con un complejo, tal como un complejo péptido-vehículo.

Un complejo péptido-vehículo consiste en al menos una molécula portadora, que puede encapsular uno o más agentes de ARNi (tal como para la distribución a un sistema biológico y/o una célula), y un resto peptídico anclado al exterior de la molécula portadora, tal como para dirigir el complejo portador a un tejido particular o tipo de célula. Un complejo portador puede portar moléculas de direccionamiento adicionales en el exterior del complejo, o agentes fusogénicos para ayudar en la distribución celular. El uno o más agentes de ARNi encapsulados en el vehículo pueden conjugarse con moléculas lipófilas, que pueden ayudar en la distribución de los agentes al interior del vehículo.

Una molécula o estructura portadora puede ser, por ejemplo, una micela, un liposoma (p.ej., un liposoma catiónico), una nanopartícula, una microesfera, o un polímero biodegradable. Un resto peptídico puede anclarse a la molécula portadora mediante una variedad de uniones, tal como una unión disulfuro, una unión lábil ácida, una unión con base peptídica, una unión oxiamino o un unión hidrazina. Por ejemplo, una unión con base peptídica puede ser un péptido GFLG. Ciertas uniones tendrán ventajas particulares, y las ventajas (o desventajas) pueden considerarse dependientes de la diana tisular o uso deseado. Por ejemplo, las uniones basadas en péptidos son estables en la corriente sanguínea aunque son susceptibles de escisión enzimática en los lisosomas. Un esquema de vehículos preferidos se muestra en la FIG. 11.

Los compuestos monoméricos protegidos pueden separarse de una mezcla de reacción y purificarse adicionalmente por un método tal como cromatografía de columna, cromatografía líquida a alta presión, o recristalización. Como puede apreciarse por el experto, métodos adicionales de sintetizado de los compuestos de las fórmulas en la presente memoria serán evidentes para los expertos en la técnica. Adicionalmente, las diversas etapas sintéticas pueden realizarse en una secuencia u orden alterno para dar los compuestos deseados. Otras transformaciones químicas sintéticas, grupos protectores (p.ej., para hidroxilo, amino, etc. presentes en las bases) y metodologías de grupos protectores (protección y desprotección) útiles en el sintetizado de los compuestos descritos en la presente memoria se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellos como se describen en R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T.W. Greene y P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2ª Ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser y M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); y L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995), y ediciones posteriores de los mismos.

Los compuestos monoméricos protegidos descritos en la presente memoria pueden contener uno o más centros asimétricos y por consiguiente se dan como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros sencillos, diastereómeros individuales y mezclas diastereoméricas. Todas las formas isoméricas dichas de estos compuestos se incluyen expresamente en la presente memoria. Los compuestos descritos en la presente memoria pueden también contener uniones (p.ej., enlaces carbono-carbono, enlaces carbono-nitrógeno, p.ej., amidas) o sustituyentes que pueden restringir la rotación del enlace, p.ej., restricción que resulta de la presencia de un anillo o doble enlace. Por consiguiente, todos los isómeros cis/trans, E/Z e isómeros rotacionales (rotámeros) están incluidos expresamente en la presente memoria. Los compuestos descritos en la presente memoria pueden además representarse en múltiples formas tautoméricas, en dichos ejemplos, la presente descripción incluye expresamente todas las formas tautoméricas de los compuestos descritos en la presente memoria (p.ej., la alquilación de un sistema anular puede dar por resultado la alquilación en múltiples sitios, la presente descripción incluye expresamente todos esos productos de reacción). Todas las formas isoméricas de dichos compuestos se incluyen expresamente en la presente memoria. Todas las formas cristalinas de los compuestos descritos en la presente memoria están incluidas expresamente en la presente memoria.

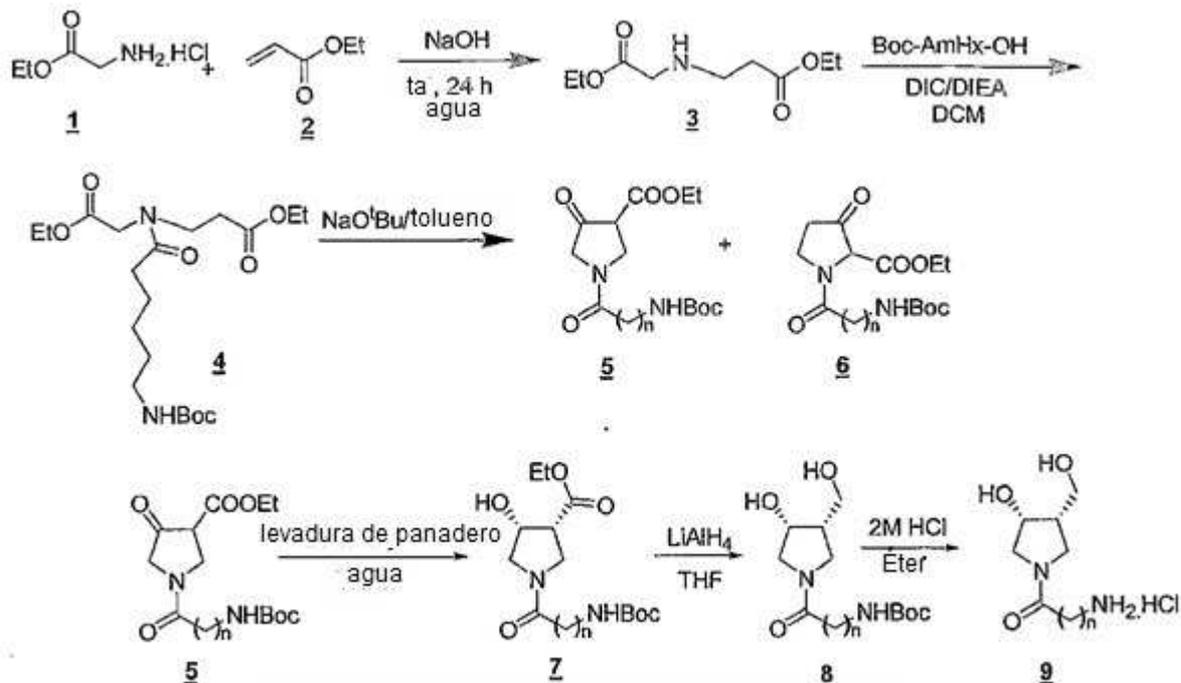
Los monómeros y métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para preparar oligorribonucleótidos naturales o modificados, o moléculas poliméricas que comprenden cualquier combinación de compuestos monoméricos descritos en la presente memoria y/o ribonucleótidos naturales o modificados en que una o más subunidades contienen una base inusual o universal.

Como se trata anteriormente, los monómeros y métodos descritos en la presente memoria pueden usarse en la preparación de moléculas de ARN modificadas. Las moléculas de ARN modificadas incluyen p.ej., las moléculas que contienen un nucleósido químicamente o estereoquímicamente modificado o un sustituto de nucleósido.

5 El acoplamiento de grupos 5'-hidroxilo con fosforamidas forma intermedios de éster de fosfito, que a su vez se oxidan, p.ej., con yodo, al diéster fosfato. De forma alternativa, los fosfitos pueden tratarse con p.ej., reactivos de azufre, selenio, amino y boro para formar estructuras fosfato modificadas. Las uniones entre los monómeros descritos en la presente memoria y una cadena de nucleósido u oligonucleótido pueden tratarse también con reactivos de yodo, azufre, selenio, amino y boro para formar estructuras fosfato no modificadas o modificadas respectivamente. De forma similar, los monómeros descritos en la presente memoria pueden acoplarse con nucleósidos u oligonucleótidos que contienen cualquiera de las modificaciones o sustitutos de nucleósido descritos en la presente memoria.

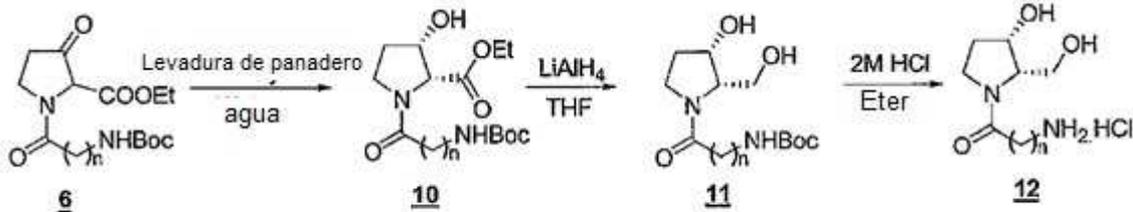
10 Monómeros de SMSR representativos y síntesis típicas para preparar monómeros de SMSR y compuestos relacionados descritos en la presente memoria se proporcionan a continuación. Como se trata en otra parte, los grupos protectores para grupos hidroxilo de monómero de SMSR, p.ej., OFG¹, incluyen aunque no están limitados al grupo dimetoxitritilo (DMT). Por ejemplo, puede ser deseable en algunas realizaciones usar grupos protectores con base de silicio como un grupo protector para OFG¹, p.ej., usando los métodos descritos en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos núm. de serie 60/463.772), presentada el 17 de abril de 2003, y/o en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos núm. de serie 60/465.802, presentada el 25 de abril de 2003. Los grupos protectores con base de silicio pueden por lo tanto usarse en conjunto con o en lugar del grupo DMT como sea necesario o se desee. Por consiguiente, los monómeros de SMSR y las síntesis esbozadas a continuación, que caracterizan al grupo protector DMT como un grupo protector para OFG¹, no se va a construir como limitante de ninguna forma.

Síntesis del conector de pirrolidina

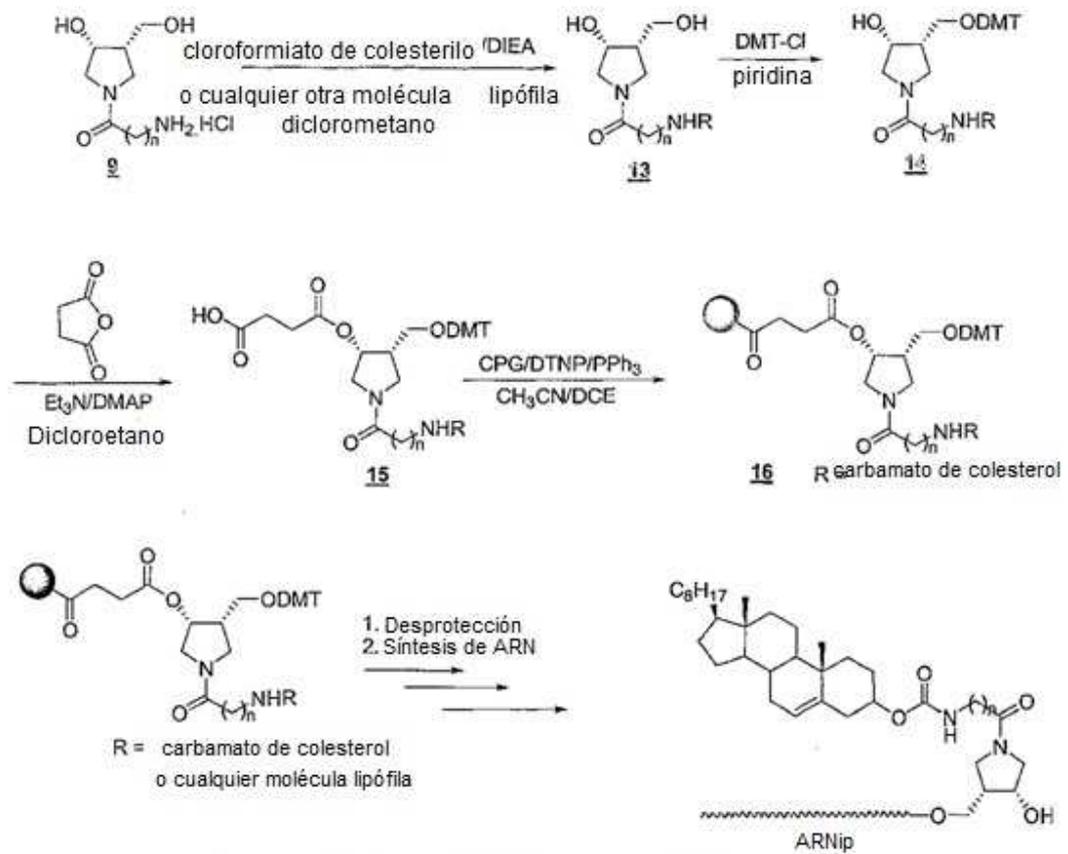


Esquema 1. Síntesis de cis-(3S,4R)-pirrolidina diol

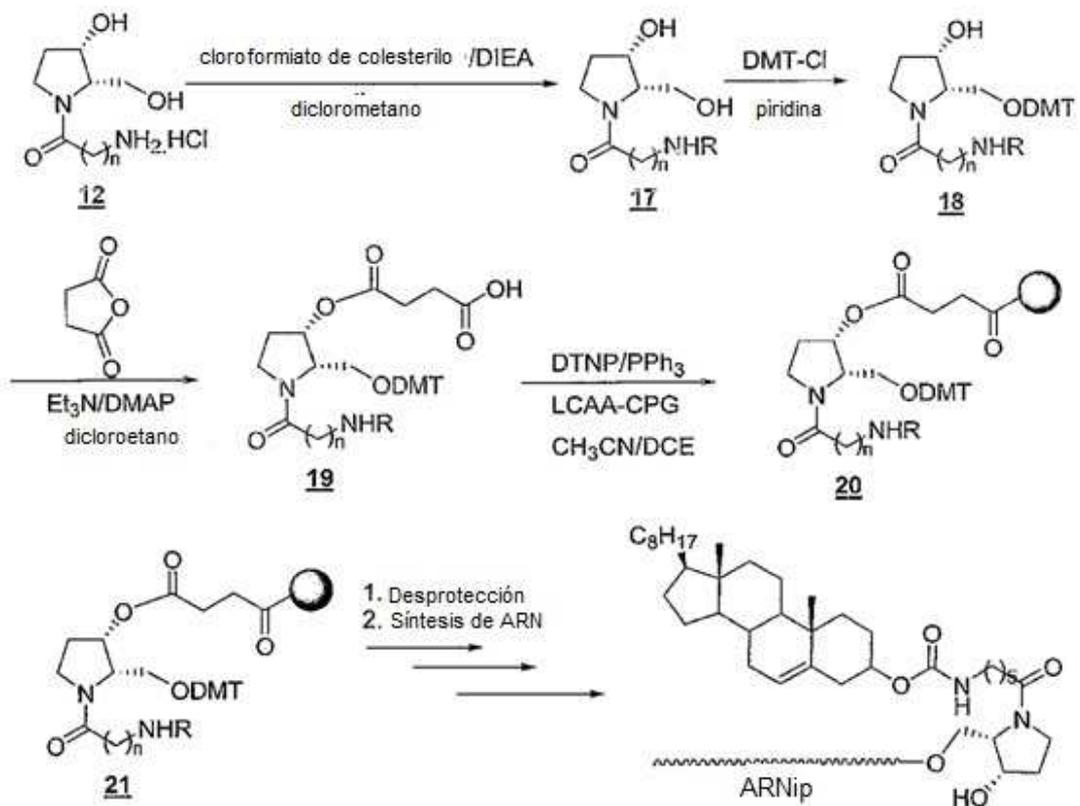
20



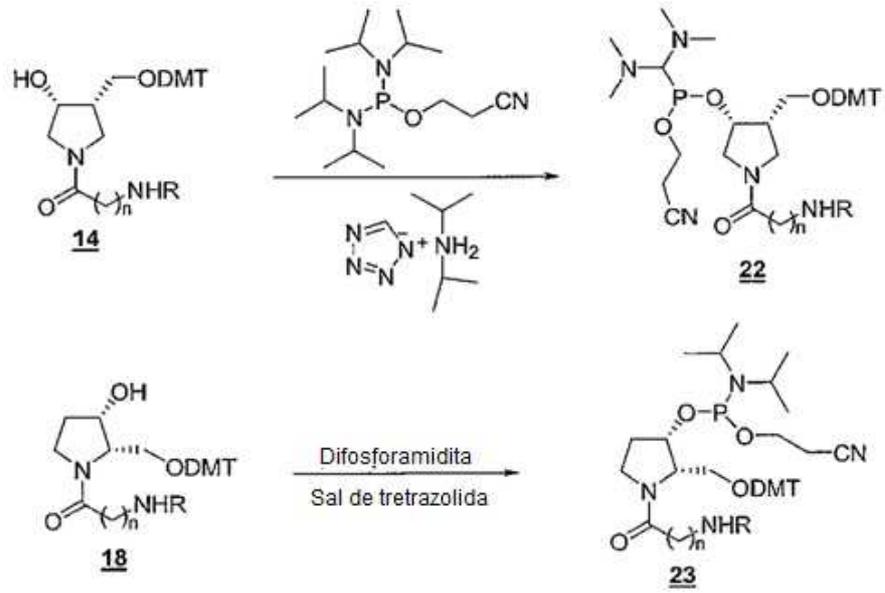
Esquema 2. Síntesis de cis-(2R,3S)-pirrolidina diol



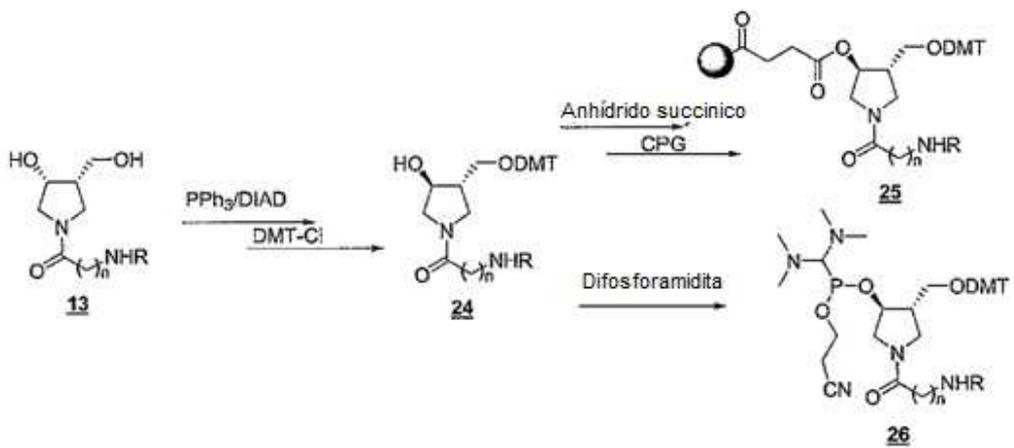
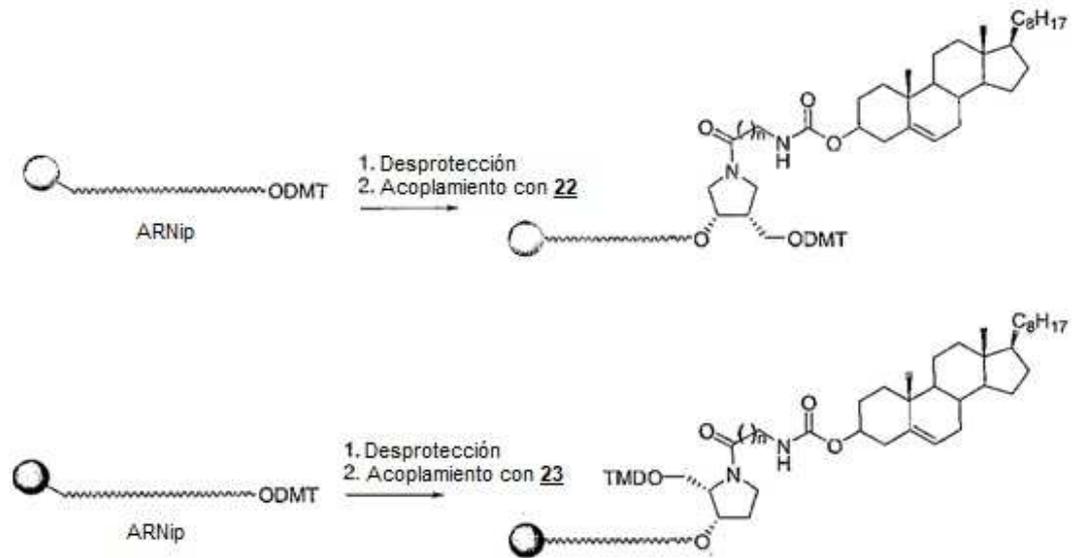
Esquema 3. Síntesis de ARNip conjugado 3'



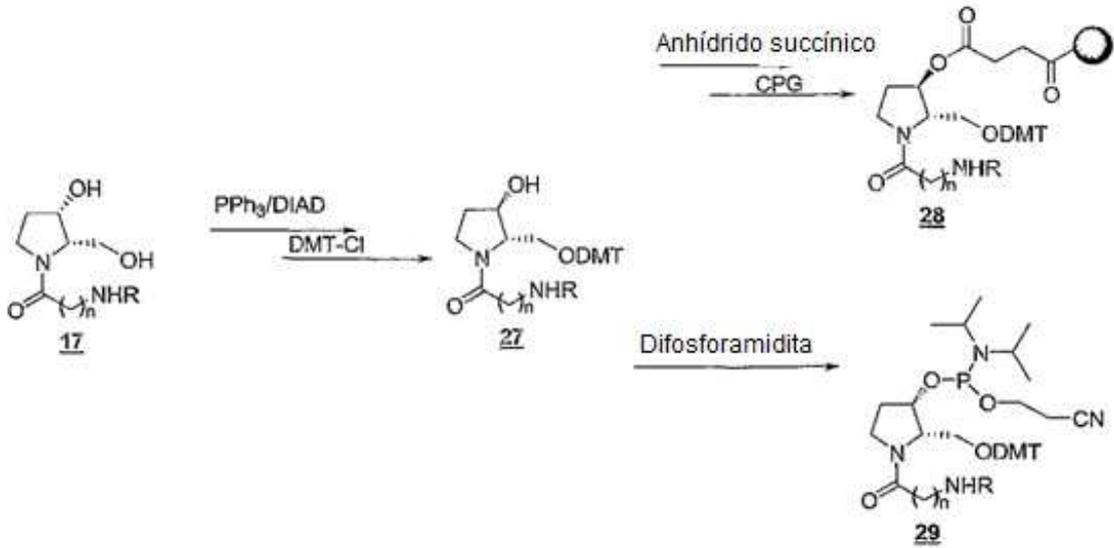
Esquema 4. Conjugación de colesterol en el extremo 3' con derivado de 2R,3S pirrolidinilo



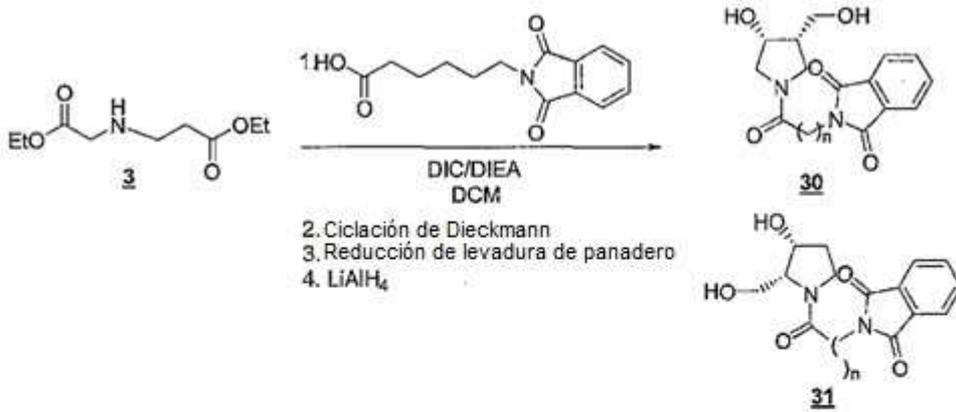
Síntesis de ARNip marcado en 5'



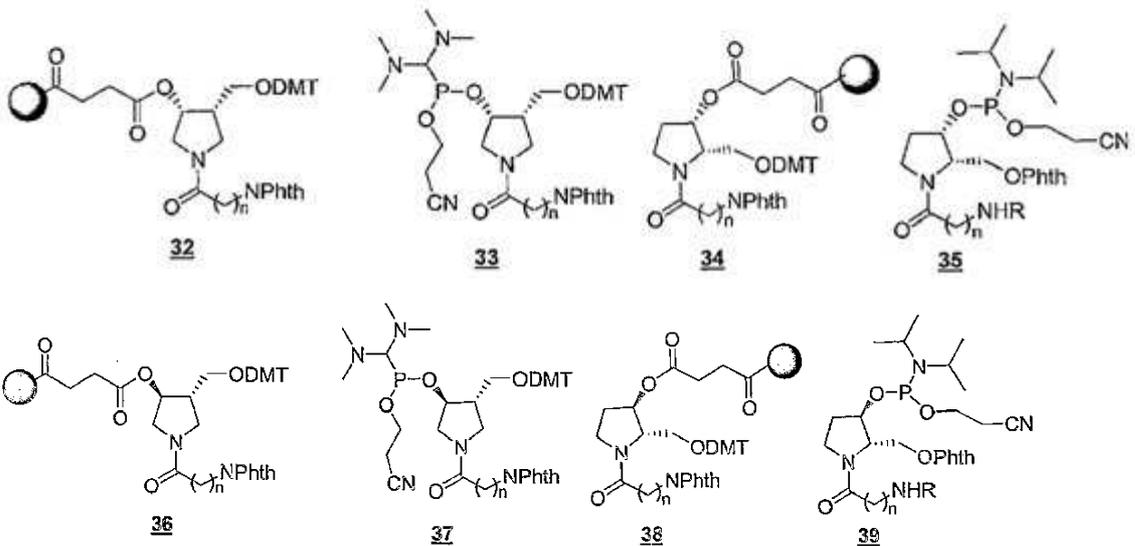
25 y **26** pueden usarse para la conjugación 3'-5' respectivamente



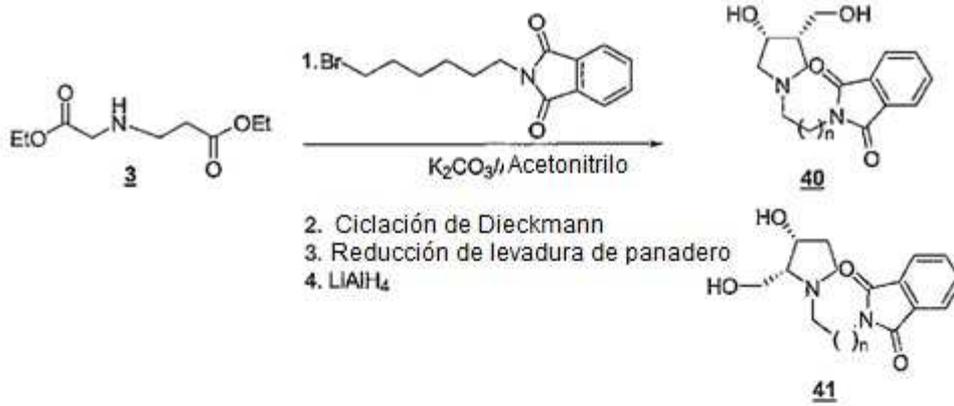
Síntesis de derivado ftalimido



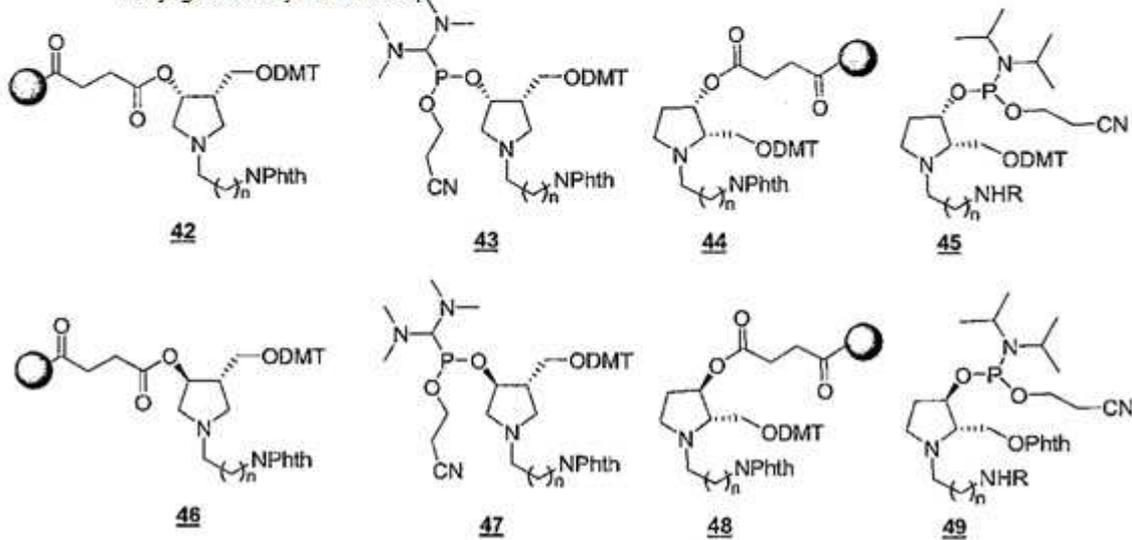
30 y **31** pueden convertirse a derivados similares a los mostrados en los esquemas 2-4 para la conjugación 3' y 5' de ARNip



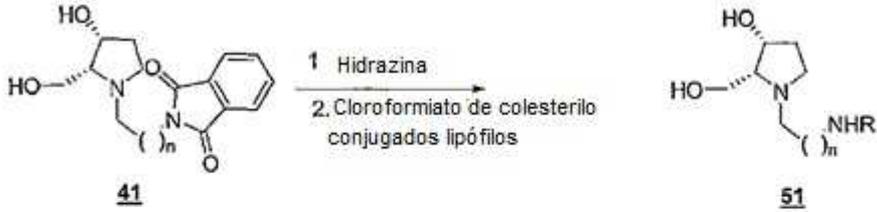
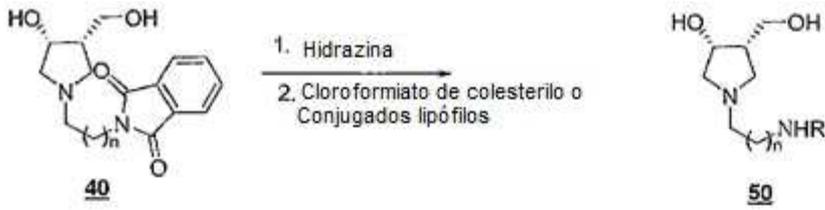
5 Síntesis de derivado de talimido



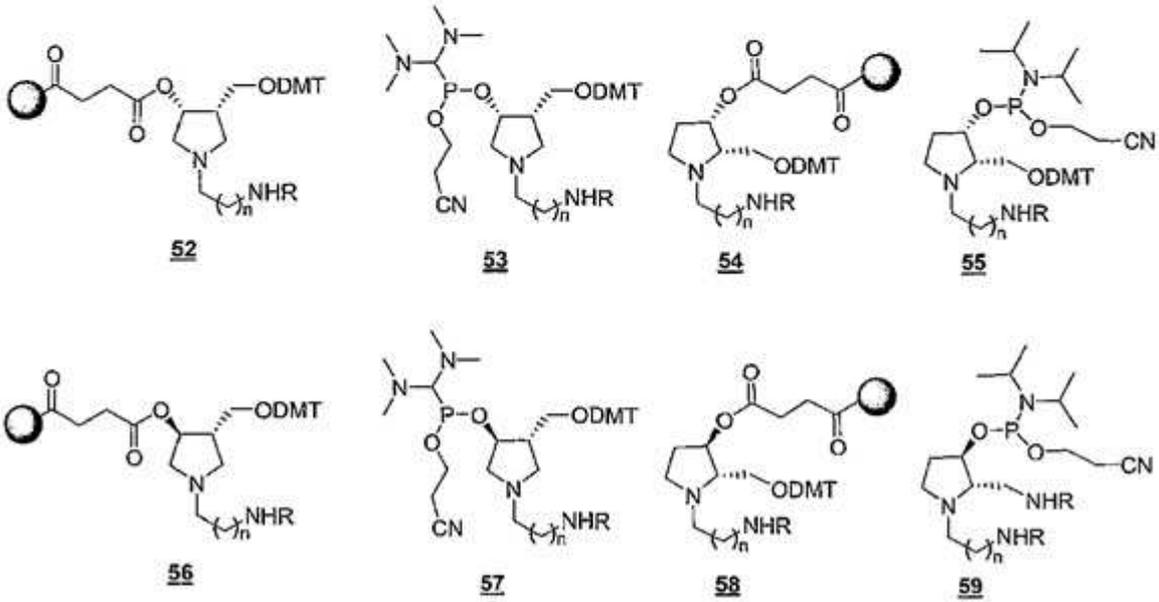
40 y **41** pueden convertirse a derivados similares como se muestra en los esquemas 2-4 para conjugación 3' y 5' de ARNip



Síntesis de derivados de N-alkilpirrolina

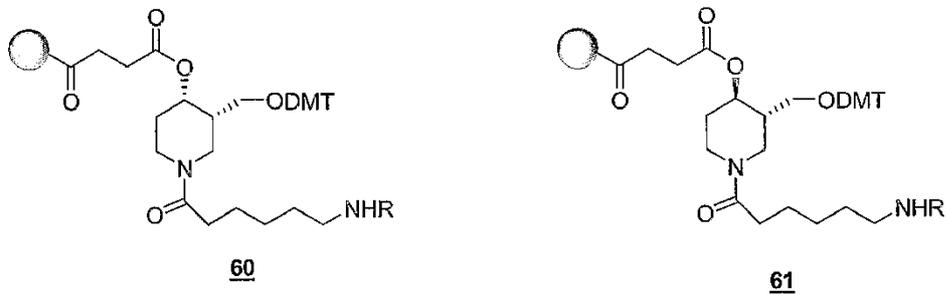


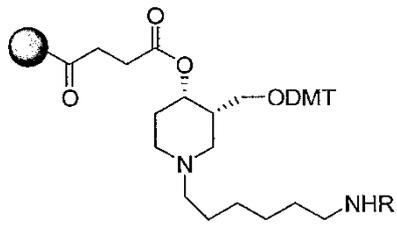
Los intermedios **50** y **51** pueden convertirse a análogos que podrían conjugarse con ARNip usando reacciones similares



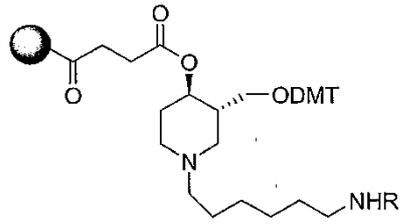
Ligandos de serie de piperidina:

Similar a las series de pirrolina pueden sintetizarse las series de piperina

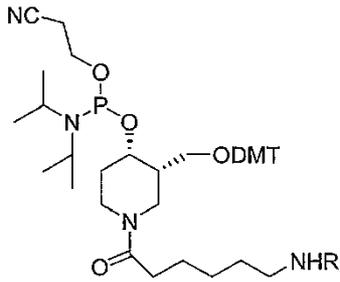




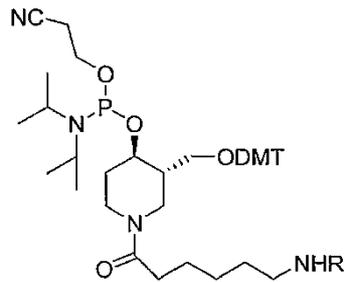
62



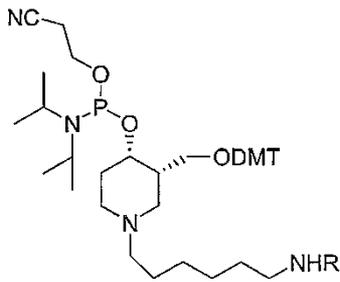
63



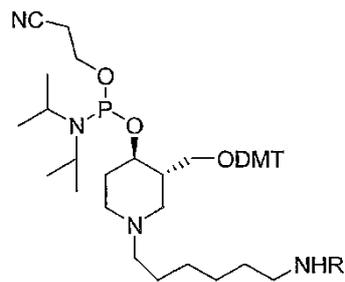
64



65



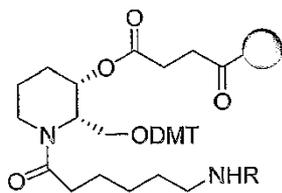
66



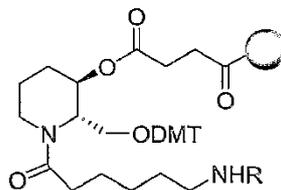
67

Ligandos de la serie de piperidina:

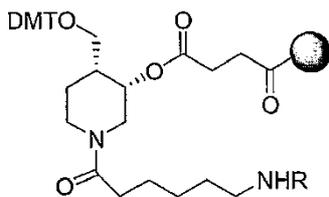
- 5 Similar a la serie de pirrolina puede sintetizarse la serie de piperidina



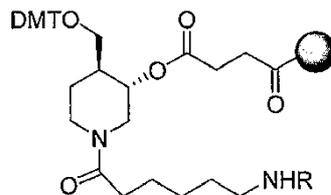
68



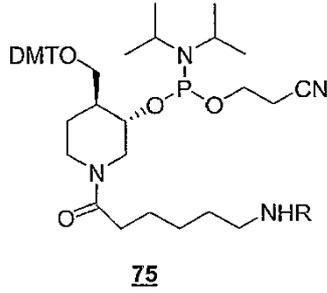
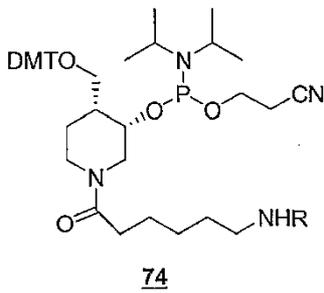
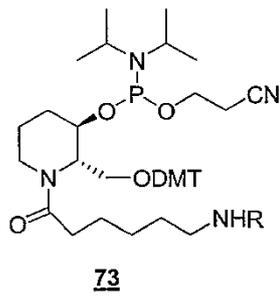
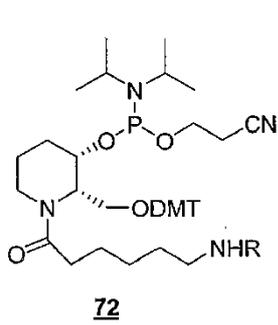
69



70

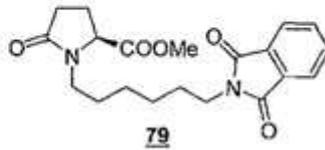
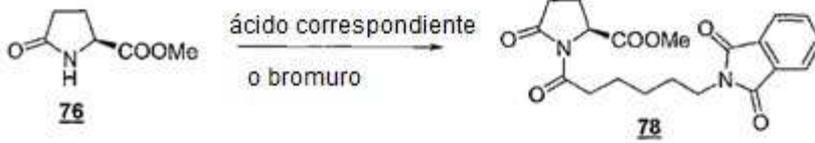
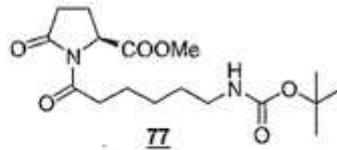


71

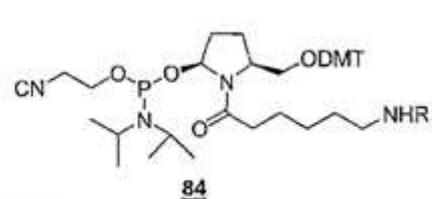
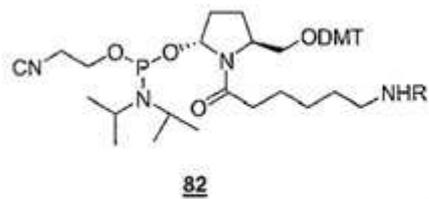
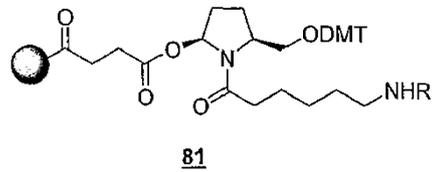
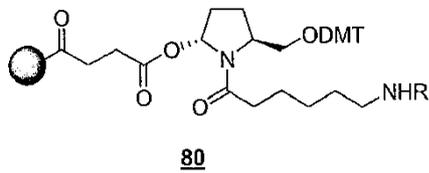


Conectores de la serie hidroxiprolina:

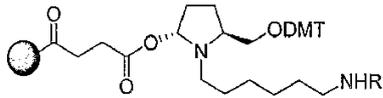
A partir de cis-3-hidroxiprolina y carboxilato de (s)-pirrolidona disponibles comercialmente



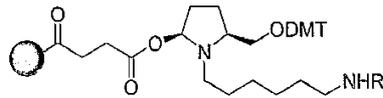
5



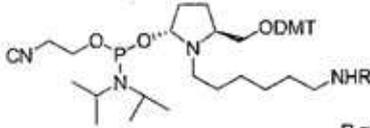
R = conjugados lipófilos



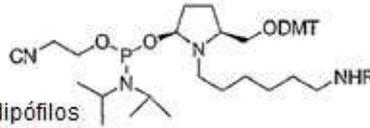
85



86



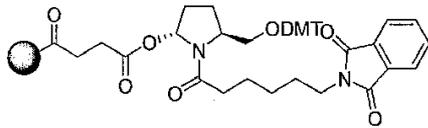
87



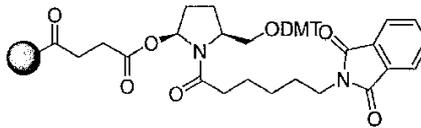
88

R = conjugados lipófilos

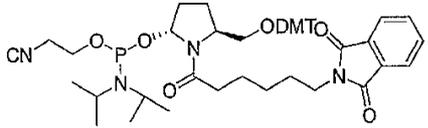
Derivado de ftalimida para estabilizar ARNip



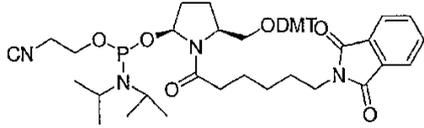
89



90

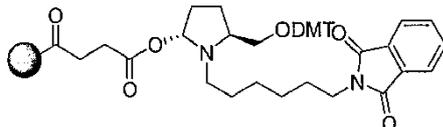


91

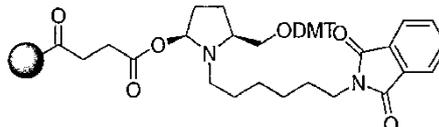


92

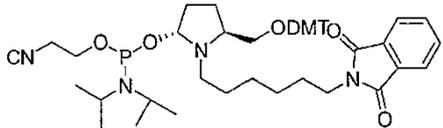
5



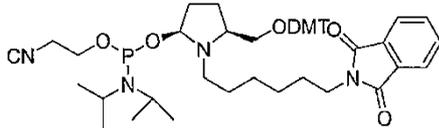
93



94

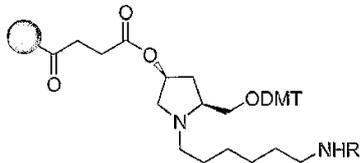


95

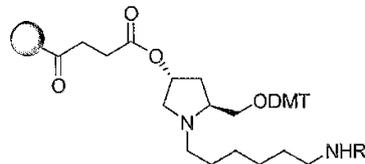


96

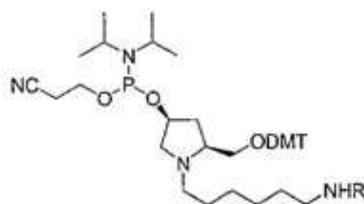
Derivados de 4-hidroxiprolina



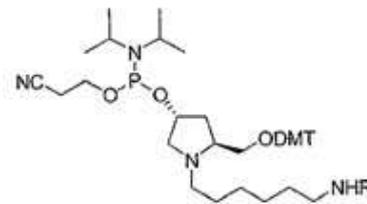
97



98



99

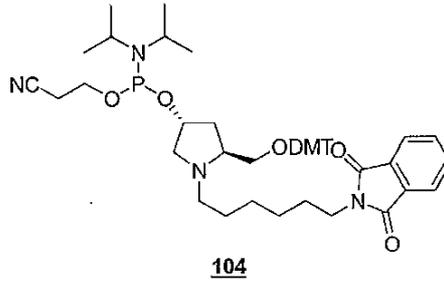
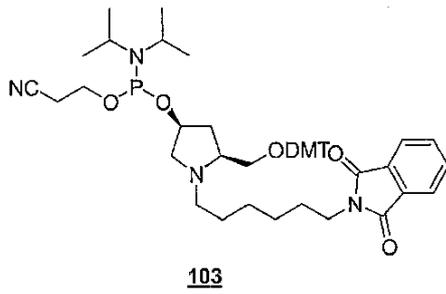
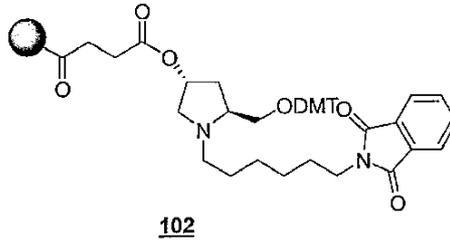
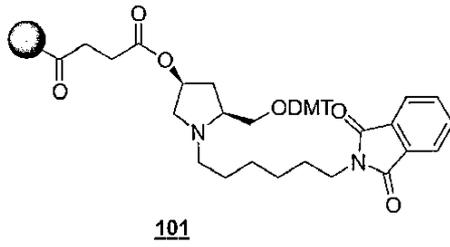


100

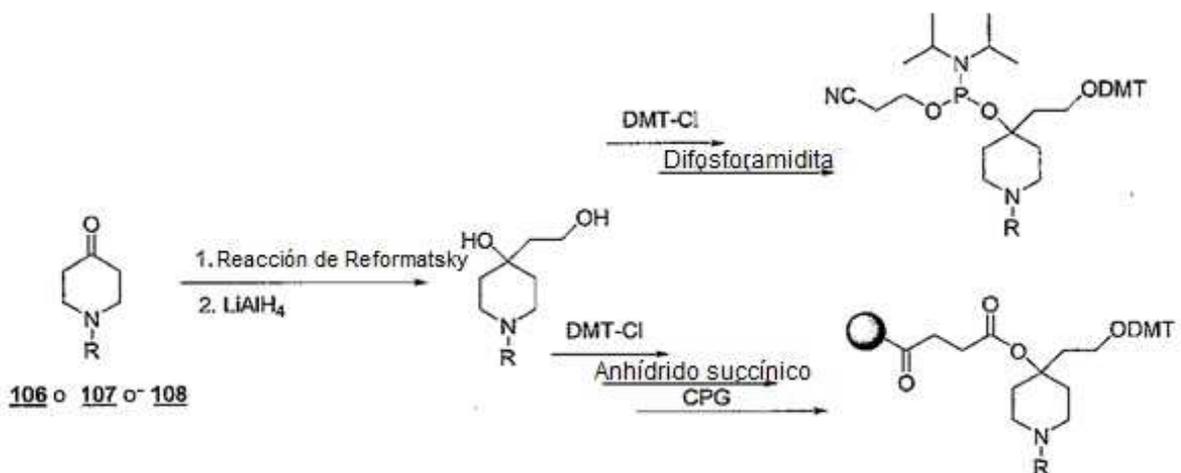
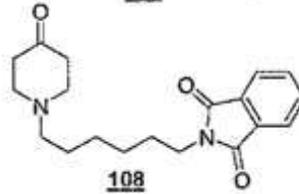
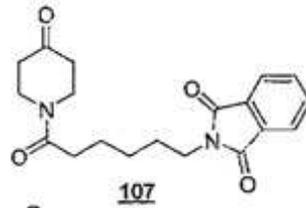
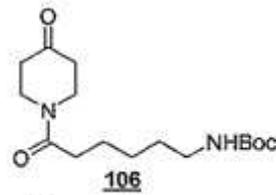
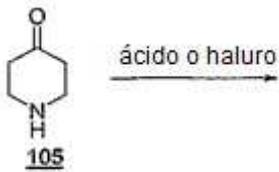
R = conjugados lipófilos

10

Derivados de ftalimido



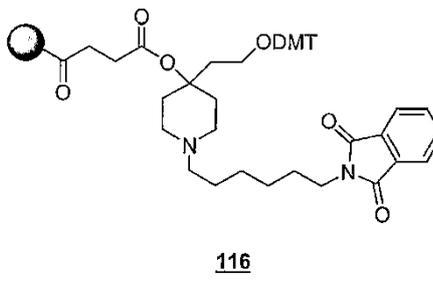
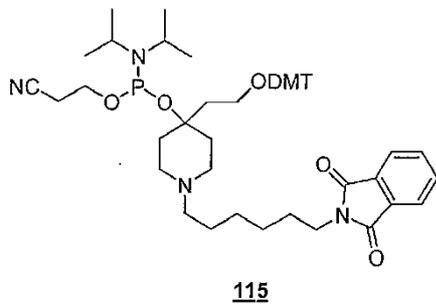
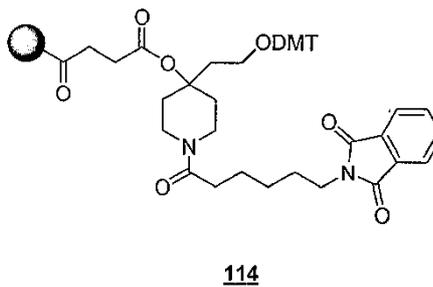
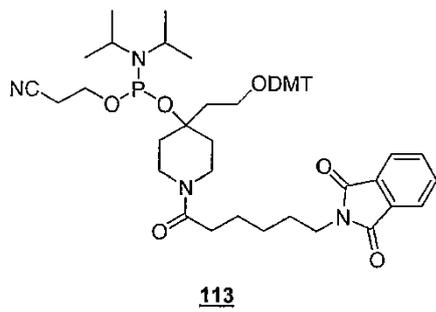
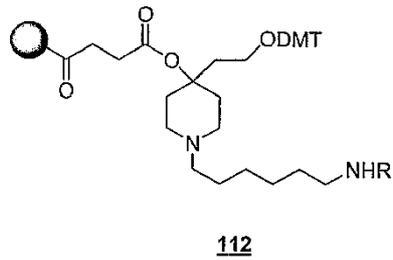
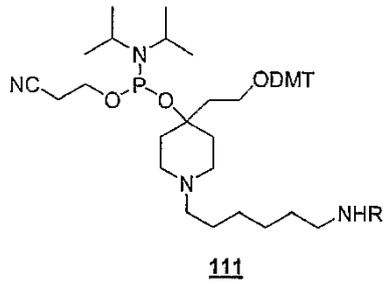
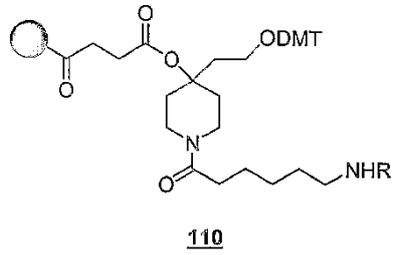
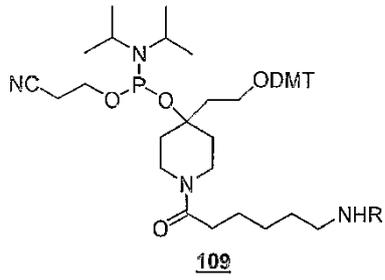
Síntesis del conector de 6 miembros



5

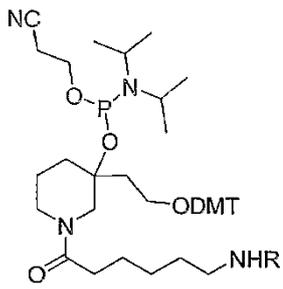
Se puede realizar una reacción similar con 2-piperidona y 3-piperidona

Conectores a partir de 4-piperidona

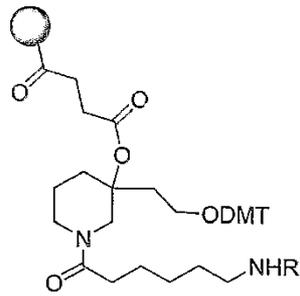


5

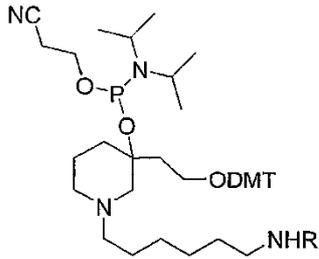
Conectores a partir de 3-piperidona



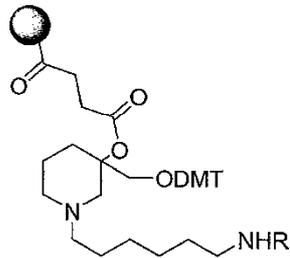
117



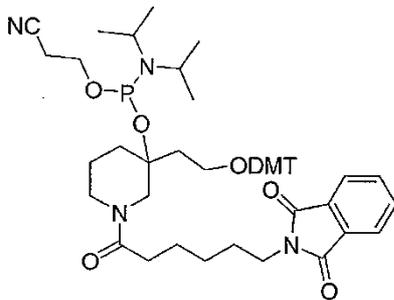
118



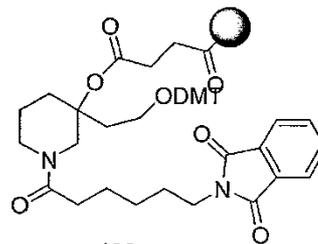
119



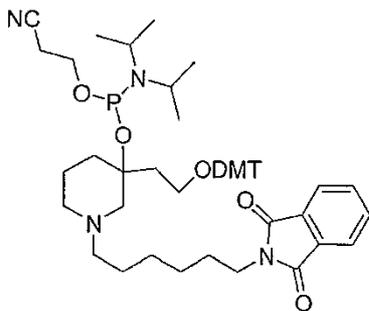
120



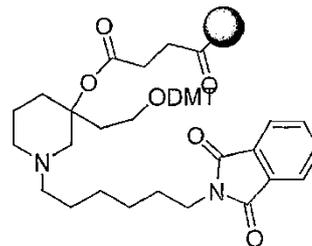
121



122

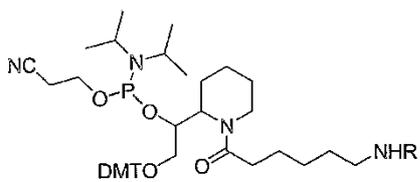


123

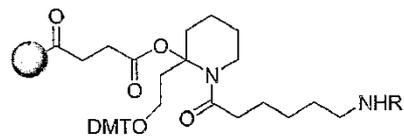


124

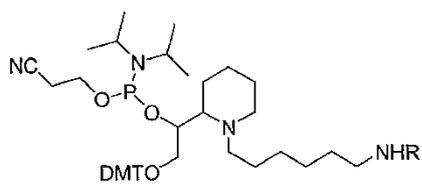
Conectores a partir de 2-piperidona



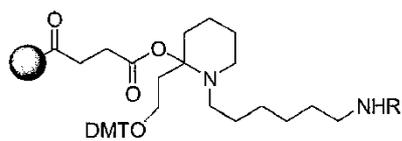
125



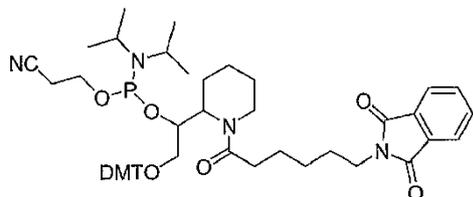
126



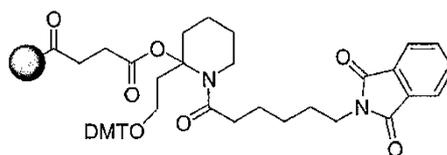
127



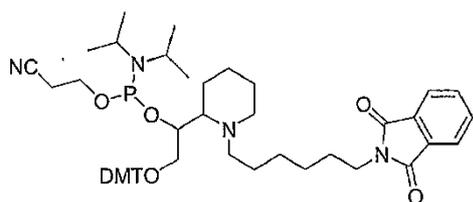
128



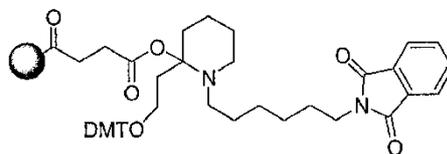
129



130

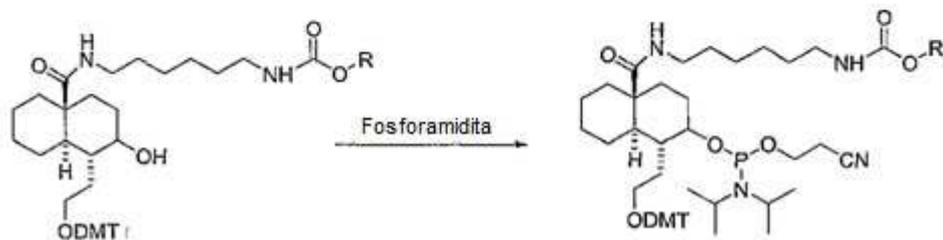
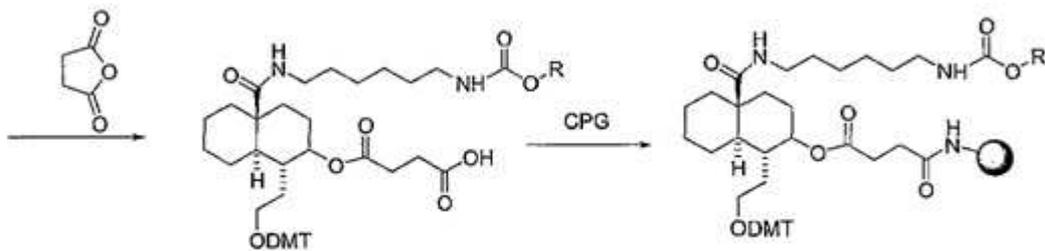
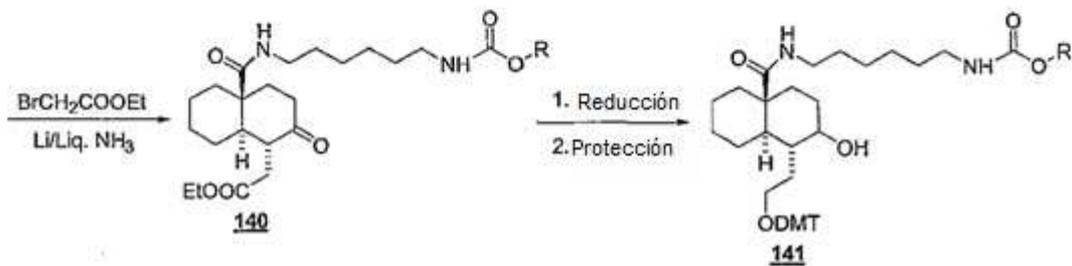
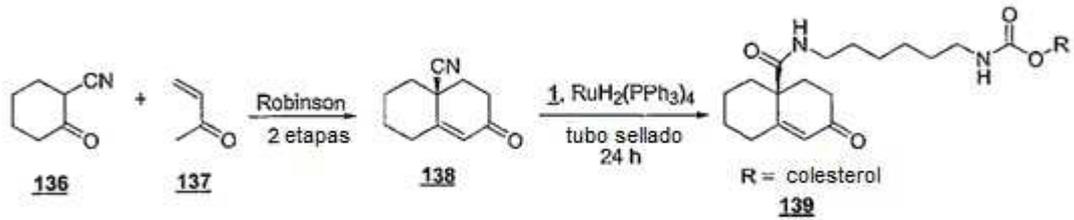
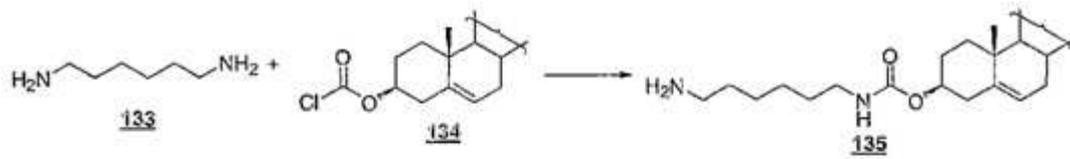


131



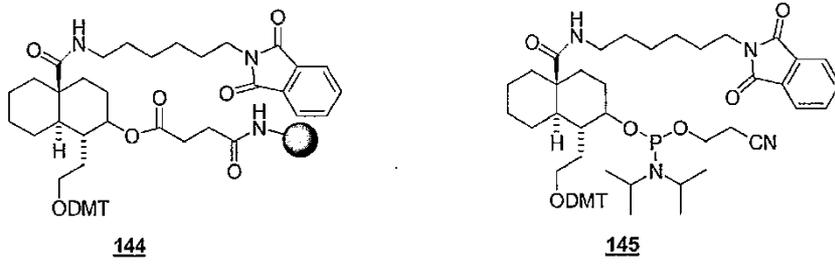
132

Conjugación a través del sistema de decalina

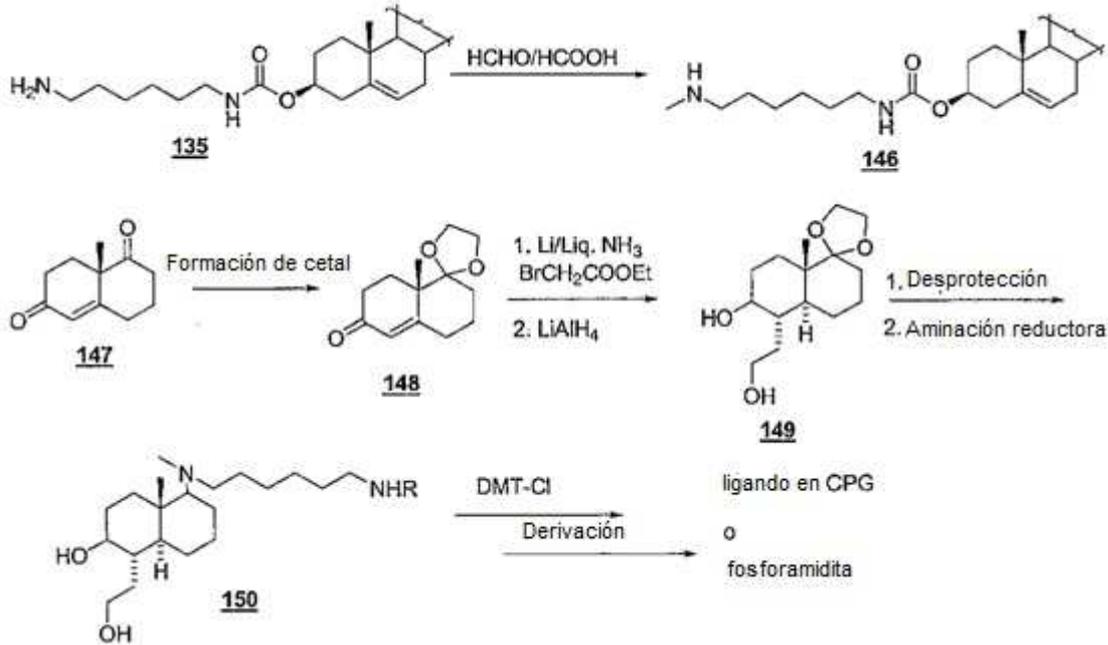


Conjugados a partir del sistema de decalina:

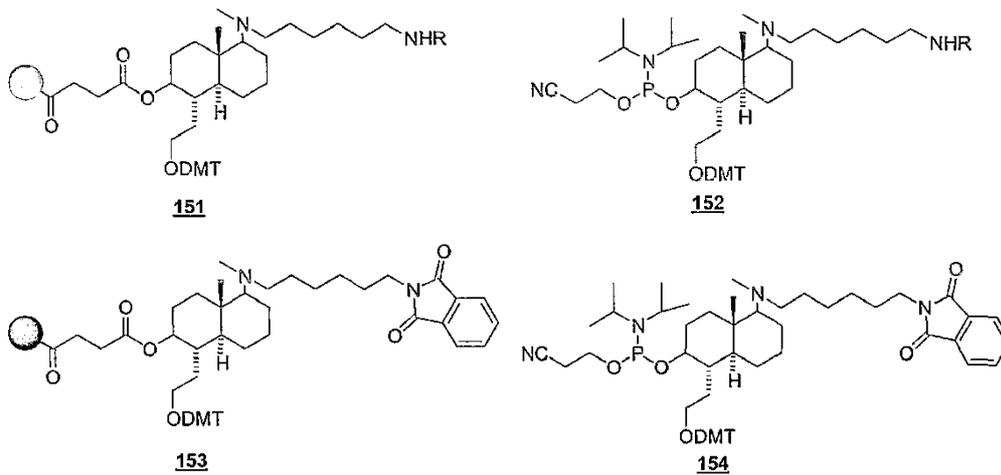




Conector de decalina a partir de cetona de Wieland-Miescher

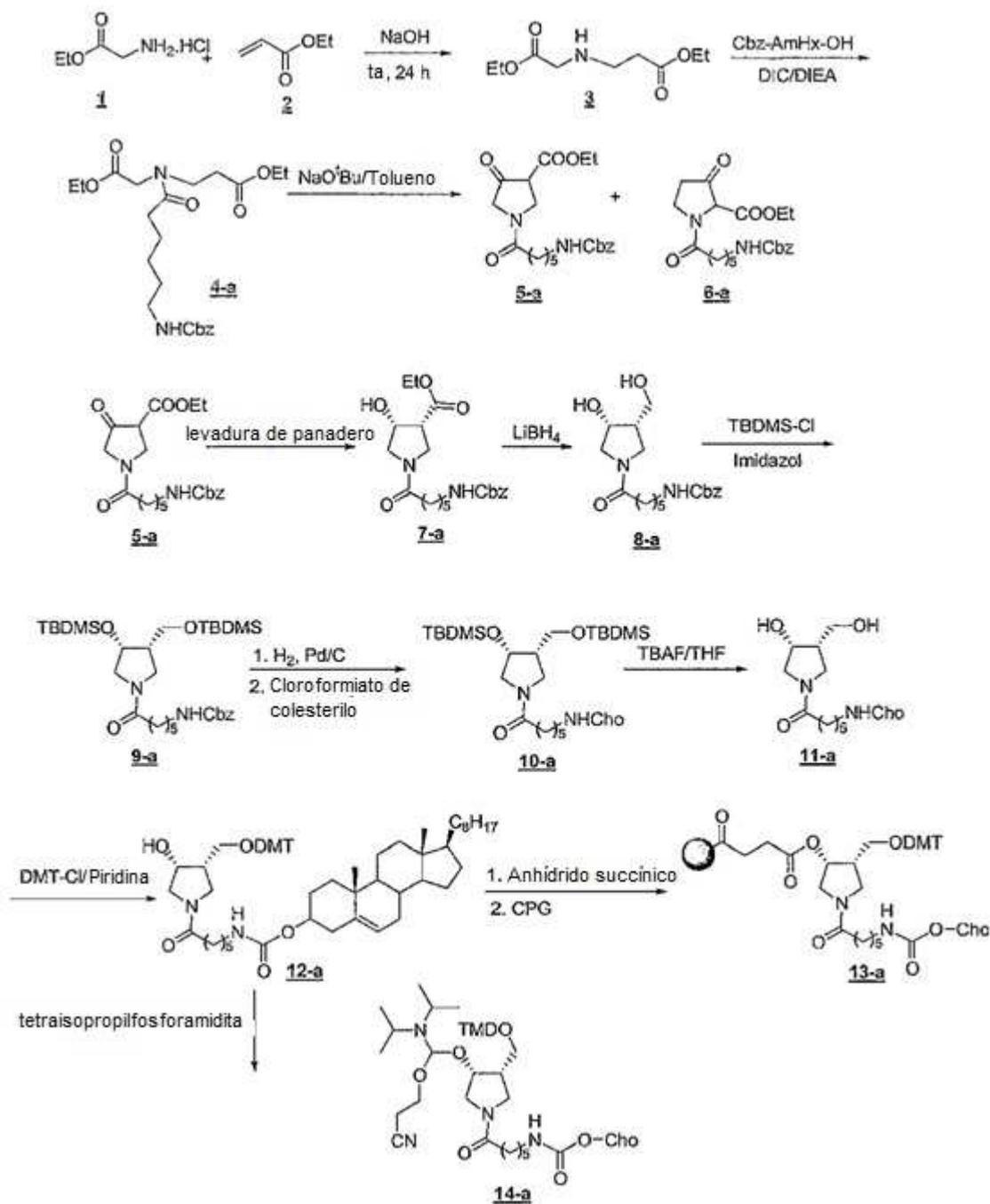


Conjugados a partir de cetona de Wieland-Miescher



5

Síntesis del conector de pirrolina:



Direccionamiento

Los agentes de ARNi descritos en la presente memoria son particularmente útiles cuando tienen como objetivo el hígado. Las modificaciones químicas descritas en la presente memoria pueden combinarse con los compuestos y métodos descritos en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos 60/462.097, presentada el 9 de abril de 2003; y la Solicitud Provisional de los Estados Unidos 60/461.9159 presentada el 10 de abril de 2003. Por ejemplo, un agente de ARNi puede tener como objetivo el hígado por incorporación de una SMSR que contiene un ligando que tiene como objetivo el hígado, p.ej., un resto lipófilo. Los restos lipófilos preferidos incluyen residuos de lípido, colesteroles, oleilo, retinilo o colestero. Otros restos lipófilos que pueden funcionar como agentes de direccionamiento al hígado incluyen ácido cólico, ácido adamantanoacético, ácido 1-pirenobutírico, dihidrotestosterona, 1,3-bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritilo o fenoxazina.

Un agente de ARNi puede tener como objetivo también el hígado por asociación con una lipoproteína de baja densidad (LDL), tal como LDL lactosilada. Los vehículos poliméricos complejados con residuos de azúcar pueden funcionar también para dirigir a los agentes de ARNi al hígado.

5 La conjugación de un agente de ARNi con una albúmina sérica (SA), tal como albúmina sérica humana, también puede usarse para dirigir al agente de ARNi a un tejido que no es el riñón, tal como el hígado.

10 Un agente de ARNi dirigido al hígado por un resto de direccionamiento de SMSR descrito en la presente memoria puede tener como objetivo un gen expresado en el hígado. Por ejemplo, el agente de ARNi puede tener como objetivo p21 (WAF1/DIP1), P27 (KIP1), el gen de α -fetoproteína, beta-catenina, o c-MET, como para tratar un cáncer hepático. En otra realización, el agente de ARNi puede tener como objetivo apoB-100, como para el tratamiento de un desequilibrio de colesterol HDL/LDL; dislipidemias, p.ej., hiperlipidemia combinada familiar (FCHL), o hiperlipidemia adquirida; hipercolesterolemia; hipercolesterolemia resistente a la estatina; enfermedad de la arteria coronaria (CAD); enfermedad cardíaca coronaria (CHD); o aterosclerosis. En otra realización, el agente de ARNi puede tener como objetivo el homólogo de forkhead en rhabdomyosarcoma (FKHR); glucagón; receptor del glucagón; glucógeno fosforilasa; coactivador PPAR-gamma (PGC-1); fructosa-1,6-bisfosfatasa; glucosa-6-fosfatasa; 15 traslocador de glucosa-6-fosfato; proteína reguladora inhibidora de glucoquinasa; o fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), como para inhibir la producción de glucosa hepática en un mamífero, tal como un humano, tal como para el tratamiento de diabetes. En otra realización, un agente de ARNi dirigido al hígado puede tener como objetivo el Factor V, p.ej., el alelo del Factor V Leiden, como para reducir la tendencia a formar un coágulo de sangre. Un agente de ARNi dirigido al hígado puede incluir una secuencia que tiene como objetivo el virus de la hepatitis (p.ej., Hepatitis A, B, C, D, E, F, G o H). Por ejemplo, un agente de ARNi descrito en la presente memoria puede tener como objetivo cualquiera de las proteínas no estructurales de VHC: NS3, 4A, 4B, 5A o 5B. Para el tratamiento de la hepatitis B, un agente de ARNi puede tener como objetivo el gen de la proteína X (HBx) por ejemplo.

25 Un agente de direccionamiento que incorpora un azúcar, p.ej., galactosa y/o análogos de los mismos, puede ser útil. Estos agentes tienen como objetivo, por ejemplo, las células parenquimales del hígado. Por ejemplo, un resto de direccionamiento puede incluir más de uno o preferiblemente dos o tres restos galactosa, espaciados aproximadamente 15 angstroms el uno del otro. El resto de direccionamiento puede ser alternativamente lactosa (p.ej., tres restos de lactosa), que es glucosa acoplada a una galactosa. El resto de direccionamiento puede ser también N-acetil-galactosamina, N-Ac-glucosamina. Un resto de direccionamiento de manosa o manosa-6-fosfato puede usarse para el direccionamiento a macrófagos.

30 Los agentes de ARNi descritos en la presente memoria son particularmente útiles cuando se dirigen al riñón. Las modificaciones químicas descritas en la presente memoria pueden combinarse con los compuestos y métodos descritos en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos 60/460.783, presentada el 3 de abril de 2003; y 60/503.414, presentada el 15 de septiembre de 2003. Un agente de ARNi puede dirigirse al riñón mediante la incorporación de una SMSR que contiene un ligando que se dirige al riñón.

35 Un agente de ARNi dirigido al riñón por un resto de direccionamiento de SMSR descrito en la presente memoria puede tener como objetivo un gen expresado en el riñón.

Los ligandos en las SMSR pueden incluir ácido fólico, glucosa, colesterol, ácido cólico, vitamina E, vitamina K o vitamina A.

Conjugación con un resto lipófilo que promueve la entrada en las células

40 Los agentes de ARNi pueden modificarse para mejorar la entrada a las células, p.ej., por conjugación con un resto lipófilo. Un resto lipófilo puede unirse a un agente de ARNi en un número de formas pero un modo preferido de unión es por unión a una SMSR, p.ej., SMSR basada en pirrolina. El resto lipófilo puede unirse al átomo de N de una SMSR basada en pirrolina. Ejemplos de restos lipófilos incluyen colesteroles, residuos de lípido, oleilo, retinilo o colesterilo. Otros restos lipófilos incluyen ácido cólico, ácido adamantanoacético, ácido 1-pirenobutírico, dihidrotestosterona, 1,3-bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litolcólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritilo o fenoxazina. El colesterol es un ejemplo particularmente preferido.

50 El resto lipófilo puede unirse al extremo 3', el extremo 5', o de forma interna, preferiblemente en la cadena homosentido. El resto lipófilo puede unirse a una SMSR, p.ej., una SMSR con base de pirrolina que está en el extremo 3', el extremo 5' o interna, en la cadena homosentido. La unión puede ser directa o a través de una molécula de anclaje. Los anclajes, espaciadores o conectores tratados en la presente memoria pueden usarse para unir el resto a la SMSR.

55 Un agente de ARNi al que se conjuga una o más moléculas lipófilas (p.ej., colesterol) (denominado en la presente memoria como un "conjugado de ARNi-lipófilo") puede distribuirse *in vivo*, p.ej., a una célula, tal como una célula de un tejido en un sujeto, tal como un sujeto mamífero (p.ej., un humano o ratón). De forma alternativa, o además, el agente de ARNi puede distribuirse *in vitro*, p.ej., a una célula en una línea celular. Las líneas celulares puede ser, por ejemplo, de un organismo vertebrado, tal como un mamífero (p.ej., un humano o un ratón). La distribución de un conjugado de ARNi-colesterol a una línea celular puede ser en ausencia de otros reactivos de transfección. Por

ejemplo, la distribución de un conjugado de ARNi-lipófilo a una célula puede ser en ausencia de, u opcionalmente, en presencia de, Lipofectamine™ (Invitrogen, Carlsbad, CA), Lipofectamine 2000™, TransIT-TKO™ (Mirus, Madison, WI), FuGENE 6 (Roche, Indianápolis, IN), polietilenimina, X-tremeGENE Q2 (Roche, Indianápolis, IN), DOTAP, DOSPER, o Metafectene™ (Biontix, Munich, Alemania), u otro reactivo de transfección. Las líneas celulares ejemplares pueden proporcionarse por la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (Manassus, Virginia). Un conjugado de ARNi-lipófilo puede distribuirse a una línea celular, tal como cualquier línea celular descrita en la presente memoria, para dirigirse a un gen específico para la regulación por disminución.

En un ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo puede distribuirse a una línea celular principal, p.ej., un sinoviocito (como tipo B), miocito cardíaco, queratinocito, hepatocito, células del músculo liso, célula endotelial o línea celular del fibroblasto dérmico.

En otro ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo puede distribuirse a un monocito o línea celular mielóide, p.ej., una línea celular THP1, Raw264.7, IC21, P388D1, U937 o HL60.

En otro ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo puede distribuirse a linfoma, o línea celular de leucemia, p.ej., una línea celular SEM-K2, WEHI-231, HB56, TIB55, Jurkat, K562, EL4, LRMB, Bcl-1 o TF1. Por ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo puede distribuirse a una línea celular de linfoma para dirigirse a un gen específico para la regulación por disminución. Un agente de ARNi-lipófilo puede tener como objetivo (regular por disminución) un gen en una línea celular Jurkat, por ejemplo, que codifica un factor inmune, como un gen de interleuquina, p.ej., IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, IL-16, IL-17 o IL-18. En otro aspecto, un conjugado de ARNi-lipófilo puede tener como objetivo un gen que codifica un receptor de una interleuquina.

Un conjugado de ARNi-lipófilo puede tener como objetivo un gen que resulta de una traslocación cromosómica, tal como BCR-ABL, TEL-AML-1, EWS-FLI1, EWS-ERG, TLS-FUS, PAX3-FKHR o AML1-ETO. Por ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo que tiene como objetivo un gen que resulta de una traslocación cromosómica puede distribuirse a una línea celular de leucemia, p.ej., cualquiera de las líneas celulares de leucemia tratadas anteriormente.

Un conjugado de ARNi-lipófilo puede distribuirse a una línea celular inmortalizada, que incluye líneas celulares inmortalizadas de una variedad de diferentes tipos de tejido, que incluyen aunque no están limitados a células T, células de fibroblasto, células epiteliales (p.ej., células epiteliales renales) y células musculares (p.ej., células del músculo liso). Líneas celulares inmortalizadas ejemplares son líneas celulares CTLL-2 (células T), Rat 6 (fibroblasto), VERO (fibroblasto), MRC5 (fibroblasto), CV1 (fibroblasto), Cos7 (fibroblasto), RPTE (epitelial renal) y A10 (músculo liso).

Un conjugado de ARNi-lipófilo puede distribuirse a una línea celular de mastocitos, por ejemplo. Un conjugado de ARNi-lipófilo distribuido a una línea celular de mastocitos puede tener como objetivo, por ejemplo, un gen que codifica una proteína de unión asociada con GRB2 (p.ej., GAB2).

Un conjugado de ARNi-lipófilo puede distribuirse a una línea celular tumoral adherente, que incluye las líneas celulares tumorales desde una variedad de diferentes tipos de tejidos que incluyen aunque no están limitados a cánceres de la vejiga, pulmón, mama, cuello de útero, colon, páncreas, próstata e hígado, melanomas y glioblastomas. Las líneas celulares tumorales ejemplares incluyen las líneas celulares T24 (vejiga), J82 (vejiga), A549 (pulmón), Ca1u1 (pulmón), SW480 (colon), SW620 (colon), CaCo2 (colon), A375 (melanoma), C8161 (melanoma), MCF-7 (mama), MDA-MB-231 (mama), HeLa (cuello de útero), HeLa S3 (cuello de útero), MiaPaCall (páncreas), Panc1 (páncreas), PC-3 (próstata), LNCaP (próstata), HepG2 (hepatocelular), y U87 (glioblastoma). Un conjugado de ARNi-lipófilo que tiene como objetivo un gen específico puede distribuirse a una línea celular tumoral adherente. Por ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo que tiene como objetivo un factor de crecimiento o receptor del factor de crecimiento, tal como un TGF-beta (p.ej., TGF-beta1) o gen del receptor de TGF-beta, puede distribuirse a una línea celular A549 o HepG2, una línea de carcinoma de colon DLD2, o una línea celular de adenocarcinoma SKOV3. Otros genes del factor de crecimiento diana ejemplares incluyen genes del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y receptor de PDGF (PDGFR), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y receptor de VEGF (p.ej., VEGFr1, VEGFr2 o VEGFr3), y receptores del factor de crecimiento de insulina, tal como receptores del factor de crecimiento de insulina tipo I (IFG) que incluyen IGF-1R, DAF-2 e Inr.

En otro ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo que tiene como objetivo uno o más genes en una familia de genes de proteína tirosina fosfatasa tipo IVA (PRL3, también denominada PTP4A3) (p.ej., PRL1, PRL2 o PRL3) o un gen en una ruta de PRL3, puede distribuirse a una línea celular A549, o a una línea celular epitelial colorrectal cultivada.

En otro ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo puede tener como objetivo uno o más genes de proteína quinasa C en una línea celular tumoral adherente, tal como en un carcinoma pulmonar de Lewis de ratón, melanoma B16, adenocarcinoma o fibrosarcoma mamario de ratón; o un carcinoma pulmonar humano, carcinoma de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de mama, carcinoma de tiroides, o melanoma. Un conjugado de ARNi-lipófilo puede tener como objetivo un gen que codifica unas isoformas PKC, tal como PKC-alfa, PKC beta I, PKC beta II, PKC gamma, PKC delta, PKC épsilon, y/o PKC zeta, o un gen que codifica uno o más receptores de un polipéptido de proteína quinasa C.

- 5 En otro ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo puede tener como objetivo un gen que codifica una P-glucoproteína, tal como un gen en la familia génica de resistencia a múltiples fármacos (MDR), p.ej., MDR1. Un conjugado de ARNi-lipófilo que tiene como objetivo un gen MDR puede distribuirse, por ejemplo, a una línea celular de carcinoma KB humano, una línea celular de leucemia o carcinoma de ovario humano, o una línea celular de carcinoma pulmonar tal como A549.
- 10 En otro ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo puede tener como objetivo un gen que codifica un gen en la ruta de la telomerasa, tal como un TERT o el ARN molde de telomerasa (TR/TERC). Un conjugado de ARNi-lipófilo que tiene como objetivo un gen en la ruta de la telomerasa puede distribuirse, por ejemplo, a una línea celular cancerígena humana, p.ej., una línea celular de cáncer de mama, cuello de útero, endometrio, meninge, pulmón, testículo o de ovario.
- En otro ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo distribuido a una línea celular adherente (p.ej., un HeLa, adenoma paratiroides, o línea celular A549) puede tener como objetivo un gen de ciclina, tal como ciclina D1.
- 15 En otro ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo distribuido a una línea celular adherente (p.ej., una línea celular HeLa) puede tener como objetivo un gen NF-kappaB o REL-A, o a un gen que codifica un ligando o receptor de un polipéptido NF-kappaB o REL-A, o a un gen que codifica una subunidad de NF-kappaB, tal como REL-B, REL, NF-kappaB1 o NF-kappaB2.
- 20 En otro ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo distribuido a una línea celular adherente (p.ej., una línea celular HeLa o A549) puede tener como objetivo un gen que codifica el antígeno nuclear de células de proliferación (PCNA), un gen de la quinasa del punto de control (CHK-1) o un gen c-fos. Además, un conjugado de ARNi-lipófilo puede tener como objetivo cualquier gen en una ruta de PCNA, CHK-1 o c-fos. Por ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo puede regular por disminución un gen que codifica jun, que está en la ruta de c-fos.
- En otro ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo distribuido a una línea celular adherente (p.ej., una línea celular A549, T24 o A375) puede tener como objetivo un gen que codifica BCL2.
- 25 Las líneas celulares descritas en la presente memoria pueden usarse para probar los conjugados de ARNi-lipófilo que tienen como objetivo ácidos nucleicos exógenos, tal como patógenos o víricos. Por ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo que tiene como objetivo un gen vírico de la hepatitis puede distribuirse a una línea celular de hepatoma humano, tal como una línea celular HepG2 o Huh, p.ej., Huh1, Huh4, Huh7, y similares, que se han infectado con el virus (p.ej., un VHA, VHB o VHC). Por ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo que tiene como objetivo un gen de VHC, tal como en una línea celular Huh infectada, puede tener como objetivo una región conservada del genoma de VHC, tal como la región que no codifica (NCR) 5', el extremo 5' de la región que codifica la proteína central, o la 3'-NCR.
- 30 Las líneas celulares descritas en la presente memoria pueden usarse también para probar los conjugados de ARNi-lipófilo que tienen como objetivo ácidos nucleicos recombinantes exógenos, tal como genes indicadores (p.ej., GFP, lacZ, beta-galactosidasa, y similares), que se transfectan (de forma transitoria o estable) a las líneas celulares.
- 35 En un aspecto, un conjugado de ARNi-lipófilo puede distribuirse a una línea de células B, p.ej., células BC-3, C1R o ARH-77. En otro aspecto, un conjugado de ARNi-lipófilo puede distribuirse a células T, p.ej., células J45.01, MOLT y CCRF-CEM. Un conjugado de ARNi-lipófilo puede tener como objetivo un ácido nucleico endógeno o exógeno. Por ejemplo, el desarrollo de un conjugado de ARNi-lipófilo que tiene como objetivo un gen VIH puede probarse frente a un ácido nucleico de VIH exógeno en una línea de células B o células T, o en un sistema de cultivo celular macrófago o endotelial.
- 40 Un conjugado de ARNi-lipófilo puede distribuirse a células derivadas de endoderma, epitelio o mesoderma. Por ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo puede distribuirse a células de las líneas celulares epiteliales HeLa o MCF7, a células de la línea celular endotelial HUVEC, o a células de una línea celular mesodérmica SK-UT o HASMC. En un ejemplo, un agente de ARNi-lipófilo que tiene como objetivo el ácido nucleico TGF-beta o ácido nucleico del receptor de TGF-beta puede distribuirse a una línea celular del músculo liso vascular, p.ej., la línea celular 293 del fibroblasto renal. Otras dianas ejemplares de los conjugados de ARNi-lipófilo distribuidos a células de fibroblasto, tal como células 293, incluían un gen de proteína tirosina fosfatasa-1B (PTP-1B) o gen de MAP quinasa (p.ej., ERK1, ERK2, JNK1, JNK2 y p38). En otro ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo que tiene como objetivo un gen de MDR para la regulación por disminución puede distribuirse a la línea celular epitelial intestinal humana, Caco-2.
- 45 En un ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo distribuido a una línea celular, tal como una línea celular epitelial o mesodérmica (p.ej., una línea celular HeLa o HASMC, respectivamente), puede tener como objetivo un gen que codifica un polipéptido Myc o Myb, p.ej., c-Myc, N-Myc, L-Myc, c-Myb, a-Myb, b-Myb, y v-Myb, o un gen en la ruta génica de Myc o Myb, tal como ciclina D1, ciclina D2, ciclina E, CDK4, cdc25A, CDK2 o CDK4.
- 50 En un ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo que tiene como objetivo un gen expresado en el sistema nervioso, tal como en el cerebro, p.ej., un gen de G72 o D-aminoácido oxidasa (DAAO), puede distribuirse a una línea celular neuronal cultivada, tal como una línea celular hNT.
- 55

En otro ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo puede tener como objetivo un gen que codifica un gen en la ruta de la telomerasa, tal como TERT o TR/TERC. Un conjugado de ARNi-lipófilo que tiene como objetivo un gen en la ruta de telomerasa puede distribuirse, por ejemplo, a una línea celular de queratinocito humano, tal como una línea celular HEK, p.ej., HEKn o HEKa.

- 5 En otro ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo distribuido a una línea celular específica de tejido, tal como una línea celular HEK (queratinocito), HuVEC (endotelial), 3T3 (fibroblasto), o NHDF (fibroblasto), puede tener como objetivo un gen que codifica BCL-2, o VEGF o un receptor de VEGF (p.ej., VEGFr1, VEGFr2 o VEGFr3).

- 10 Un conjugado de ARNi-lipófilo puede distribuirse a un subgrupo de células derivadas de un tejido particular. Por ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo puede distribuirse a una línea celular renal tubular proximal, tal como la línea celular de ratón mIMCD-3. Un conjugado de ARNi-lipófilo que tiene como objetivo el ácido nucleico de TGF-beta o ácido nucleico del receptor de TGF-beta, por ejemplo, puede distribuirse a una línea celular derivada de tejido de próstata, p.ej., una línea celular de próstata PC3 o RWPE. Un conjugado de ARNi-lipófilo distribuido a una línea celular de tejido de próstata puede tener como objetivo alternativamente un gen de grupo polipeloso, tal como EZH2.

- 15 En otro ejemplo, un conjugado de ARNi-lipófilo puede distribuirse a células b de los islotes pancreáticos, donde por ejemplo, tiene como objetivo un gen del polipéptido inhibidor gástrico (GIP), o un gen del receptor de GIP.

Los conjugados de ARNi-lipófilos descritos en la presente memoria no están limitados en las líneas celulares a la que pueden aplicarse o a los ácidos nucleicos a los que pueden tener como objetivo.

Definiciones

El término "halo" se refiere a cualquier radical de flúor, cloro, bromo o yodo.

- 20 El término "alquilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada que puede ser una cadena lineal o cadena ramificada, que contiene el número indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, alquilo C₁-C₁₂ indica que el grupo puede tener de 1 a 12 (inclusive) átomos de carbono en él. El término "haloalquilo" se refiere a un alquilo en que uno o más átomos de hidrógeno están sustituidos por halo, e incluye restos alquilo en que todos los hidrógenos han sido sustituidos por halo (p.ej., perfluoroalquilo). Los grupos alquilo y haloalquilo pueden insertarse opcionalmente con O,
25 N o S. Los términos "aralquilo" se refieren a un resto alquilo en que un átomo de hidrógeno del alquilo se sustituye por un grupo arilo. Aralquilo incluye grupos en que más de un átomo de hidrógeno se ha sustituido por un grupo arilo. Ejemplos de "aralquilo" incluyen grupos bencilo, 9-fluorenilo, benzhidrilo y tritilo.

- 30 El término "alqueno" se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que contiene 2-8 átomos de carbono y se caracteriza por tener uno o más dobles enlaces. Ejemplos de un alqueno típico incluyen, aunque no están limitados a, grupos alilo, propenilo, 2-butenilo, 3-hexenilo y 3-octenilo. El término "alquino" se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que contiene 2-8 átomos de carbono y se caracteriza por tener uno o más triples enlaces. Algunos ejemplos de un alquino típico son etinilo, 2-propinilo y 3-metilbutinilo y propargilo. Los carbonos sp² y sp³ pueden servir opcionalmente como el punto de unión de los grupos alqueno y alquino, respectivamente.

- 35 El término "alcoxi" se refiere a un radical -O-alquilo. El término "aminoalquilo" se refiere a un alquilo sustituido con un amino. El término "mercapto" se refiere a un radical -SH. El término "tioalcoxi" se refiere a un radical -S-alquilo.

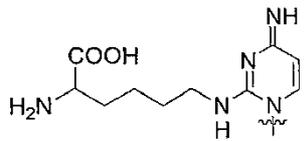
El término "alquilenilo" se refiere a un alquilo divalente (es decir, -R-), p.ej., -CH₂-, -CH₂CH₂- y -CH₂CH₂CH₂-. El término "alquilenodioxo" se refiere a una especie divalente de la estructura -O-R-O-, en que R representa un alquilenilo.

- 40 El término "arilo" se refiere a un sistema anular hidrocarbonado monocíclico, bicíclico o tricíclico aromático, en el que cualquier átomo anular puede estar sustituido. Ejemplos de restos arilo incluyen, aunque no están limitados a, fenilo, naftilo, antraceno y pirenilo.

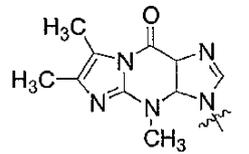
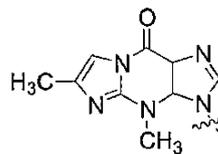
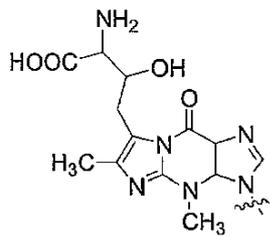
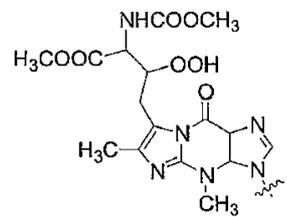
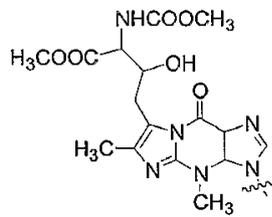
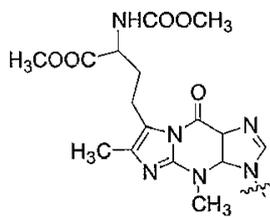
- 45 El término "cicloalquilo" como se emplea en la presente memoria incluye grupos hidrocarbonados saturados cíclicos, bicíclicos, tricíclicos o policíclicos, que tienen 3 a 12 carbonos, en los que cualquier átomo anular puede estar sustituido. Los grupos cicloalquilo descritos en la presente memoria pueden contener además anillos condensados. Los anillos condensados son anillos que comparten un enlace común. Ejemplos de restos cicloalquilo incluyen, aunque no están limitados a, ciclohexilo, adamantilo, norbornilo y decalino.

- 50 El término "heterociclilo" se refiere a un sistema anular no aromático monocíclico de 3-10 miembros, bicíclico de 8-12 miembros o tricíclico de 11-14 miembros que tiene 1-3 heteroátomos si es monocíclico, 1-6 heteroátomos si es bicíclico o 1-9 heteroátomos si es tricíclico, seleccionados dichos heteroátomos de O, N o S (p.ej., átomos de carbono y 1-3, 1-6, o 1-9 heteroátomos de N, O o S si es monocíclico, bicíclico o tricíclico, respectivamente), en los que cualquier átomo anular capaz de sustitución puede sustituirse por un sustituyente. Los grupos heterociclilo descritos en la presente memoria pueden contener también anillos condensados. Los anillos condensados son anillos que comparten un enlace común. Ejemplos de heterociclilo incluyen, aunque no están limitados a
55 tetrahidrofurano, tetrahidropirano, piperidino, morfolino, pirrolidino y pirrolidino.

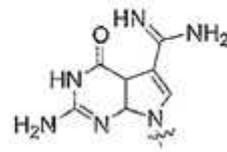
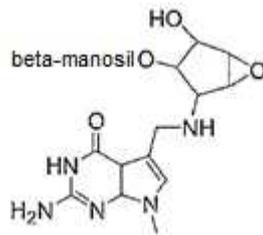
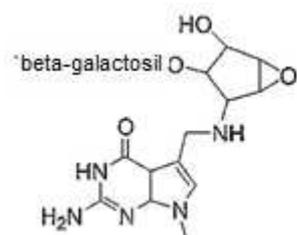
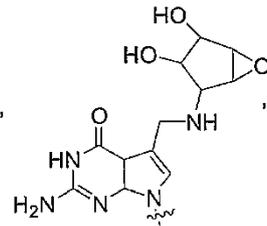
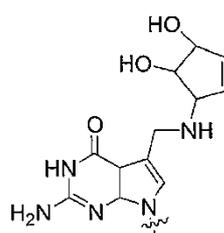
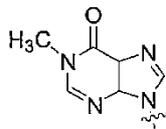
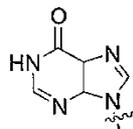
- 5 El término "heteroarilo" se refiere a un sistema anular aromático monocíclico de 5-8 miembros, bicíclico de 8-12 miembros, o tricíclico de 11-14 miembros que tiene 1-3 heteroátomos si es monocíclico, 1-6 heteroátomos si es bicíclico o 1-9 heteroátomos si es tricíclico, seleccionados dichos heteroátomos de O, N, o S (p.ej., átomos de carbono y 1-3, 1-6, o 1-9 heteroátomos de N, O o S si es monocíclico, bicíclico o tricíclico, respectivamente), en los que cualquier átomo anular puede estar sustituido.
- El término "oxo" se refiere a un átomo de oxígeno, que forma un carbonilo cuando se une a carbono, un N-óxido cuando se une a nitrógeno, y un sulfóxido o sulfona cuando se une a azufre.
- El término "acilo" se refiere a un sustituyente alquilcarbonilo, cicloalquilcarbonilo, arilcarbonilo, heterociclicarbonilo, o heteroarilcarbonilo, cualquiera de los cuales puede estar además sustituido por sustituyentes.
- 10 El término "sustituyentes" se refiere a un grupo "sustituido" en un grupo alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, heterociclico, heterocicloalqueno, cicloalqueno, arilo o heteroarilo en cualquier átomo de ese grupo. Sustituyentes adecuados incluyen, sin limitación, alquilo, alqueno, alquino, alcoxi, halo, hidroxilo, ciano, nitro, amino, SO₃H, sulfato, fosfato, perfluoralquilo, perfluoroalcoxi, metilendioxido, etilendioxido, carboxilo, oxo, tioxo, imino (alquilo, arilo, aralquilo) S(O)_nalquilo (donde n es 0-2), S(O)_narilo (donde n es 0-2), S(O)_nheteroarilo (donde n es 0-2), S(O)_nheterociclico (donde n es 0-2), amina (mono-, di-, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, heteroaralquilo y combinaciones de los mismos), éster (alquilo, aralquilo, heteroaralquilo), amida (mono-, di-, alquilo, aralquilo, heteroaralquilo y combinaciones de los mismos), sulfonamida (mono-, di-, alquilo, aralquilo, heteroaralquilo y combinaciones de los mismos), arilo no sustituido, heteroarilo no sustituido, heterociclico no sustituido y cicloalquilo no sustituido. En un aspecto, los sustituyentes en un grupo son independientemente cualquiera sencillo, o cualquier subconjunto de los sustituyentes mencionados anteriormente.
- 20 Los términos "adeninilo, citosinilo, guaninilo, timinilo y uracililo" y similares se refieren a radicales de adenina, citosina, guanina, timina y uracilo.
- Como se usa en la presente memoria, una nucleobase "inusual" puede incluir cualquiera de las siguientes:
- 2-metiladeninilo,
- 25 N6-metiladeninilo,
- 2-metil-N6-metiladeninilo,
- N6-isopenteniladeninilo,
- 2-metil-N6-isopenteniladeninilo,
- N6-(cis-hidroxiisopentenil)adeninilo,
- 30 2-metil-N6-(cis-hidroxiisopentenil)adeninilo,
- N6-glicinilcarbamoiladeninilo,
- N6-treonilcarbamoiladeninilo,
- 2-metil-N6-treonil-carbamoiladeninilo,
- N6-metil-N6-treonilcarbamoiladeninilo,
- 35 N6-hidroxinorvalilcarbamoiladeninilo,
- 2-metil-N6-hidroxinorvalil-carbamoiladeninilo,
- N6,N6-dimetiladeninilo,
- 3-metilcitosinilo,
- 5-metilcitosinilo,
- 40 2-tiocitosinilo,
- 5-formilcitosinilo,



- N4-metilcitosinilo,
 5-hidroximetilcitosinilo,
 1-metilguaninilo,
 5 N2-metilguaninilo,
 7-metilguaninilo,
 N2,N2-dimetilguaninilo,

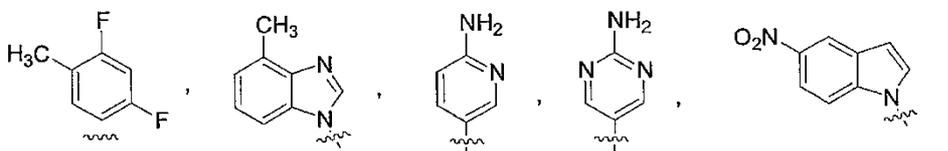


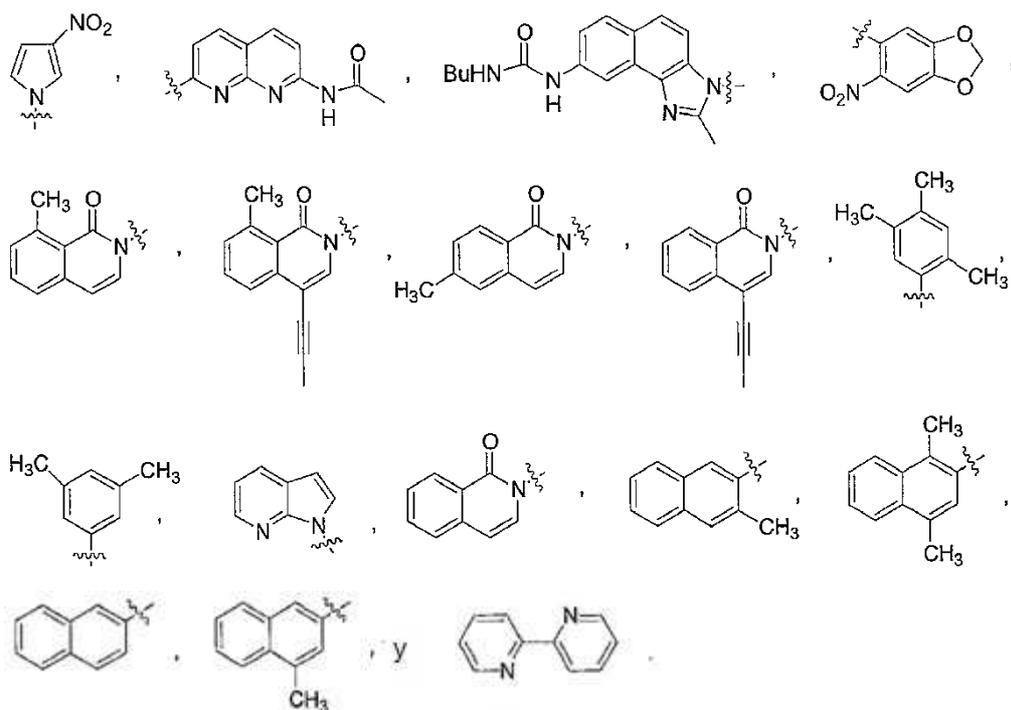
- 10 N2,7-dimetilguaninilo,



- N2,N2,7-trimetilguaninilo,
 1-metilguaninilo,
 15 7-ciano-7-desazaguaninilo,
 7-aminometil-7-desazaguaninilo,

- Pseudouracilo,
 Dihidrouracililo,
 5-metiluracililo,
 1-metilpseudouracililo,
 5 2-tiouracililo,
 4-tiouracililo,
 2-tiotiminilo,
 5-metil-2-tiouracililo,
 3-(3-amino-3-carboxipropil)uracililo,
 10 5-hidroxiuracililo,
 5-metoxiuracililo,
 Ácido uracilil-5-oxiacético,
 Metiléster de ácido uracilil-5-oxiacético,
 5-(carboxihidroximetil)uracililo,
 15 Metiléster de 5-(carboxihidroximetil)uracililo,
 5-metoxicarbonilmetiluracililo,
 5-metoxicarbonilmetil-2-tiouracililo,
 5-aminometil-2-tiouracililo,
 5-metilaminometiluracililo,
 20 5-metilaminometil-2-tiouracililo,
 5-metilaminometil-2-selenouracililo,
 5-carbamoilmetiluracililo,
 5-carboximetilaminometiluracililo,
 5-carboximetilaminometil-2-tiouracililo,
 25 3-metiluracililo,
 1-metil-3-(3-amino-3-carboxipropil)pseudouracililo,
 5-carboximetiluracililo,
 5-metildihidrouracililo, o
 3-metilpseudouracililo.
- 30 Una base universal puede formar pares de bases con cada una de las bases de ADN/ARN naturales, mostrando relativamente poca discriminación entre ellas. En general, las bases universales son restos aromáticos, hidrófobos, que no son enlace de hidrógeno, que pueden estabilizar, p.ej., moléculas tipo ARN o ARN doble, por medio de interacciones por apilamiento. Una base universal puede incluir también sustituyentes de enlace de hidrógeno. Como se usa en la presente memoria, una "base universal" puede incluir cualquiera de los siguientes:
- 35 Antracenos, pirenos,





- 5 Una base universal puede incluir también un resto arilo (p.ej., fenilo) que tiene un ligando o bien directamente unido o indirectamente unido, p.ej., por medio de un anclaje, al resto arilo. El resto arilo puede incluir además sustituyentes adicionales, p.ej., uno o más grupos fluoro.

Estructura del agente de ARNi

10 Los monómeros descritos en la presente memoria pueden usarse para hacer oligonucleótidos que son útiles como agentes de ARNi, p.ej., moléculas de ARN, (bicatenarias; monocatenarias) que median el ARNi, p.ej., con respecto a un gen endógeno de un sujeto o a un gen de un patógeno. En la mayoría de los casos el agente de ARNi incorporará monómeros descritos en la presente memoria junto con nucleósidos o nucleótidos que se dan de forma natural o con otros nucleósidos o nucleótidos modificados. Los monómeros modificados pueden estar presentes en cualquier posición en el agente de ARNi, p.ej., en los extremos o en la región central de un agente de ARNi o en una región doble o en una región desapareada. En una realización preferida el agente de ARNi puede tener cualquier arquitectura, p.ej., la arquitectura descrita en la presente memoria. P.ej., puede incorporarse en un agente de ARNi que tiene una estructura saliente, una horquilla u otra estructura monocatenaria o una estructura bicatenaria, como se describe en la presente memoria.

20 Un "agente de ARN" como se usa en la presente memoria, es un ARN no modificado, ARN modificado, o sustituto de nucleósido, todos los cuales se definen en la presente memoria (véase, p.ej., la sección posterior titulada Agentes de ARN). Aunque se describen numerosos ARN modificados y sustitutos de nucleósido, los ejemplos preferidos incluyen los que tienen mayor resistencia a la degradación de la nucleasa que la de los ARN no modificados. Los ejemplos preferidos incluyen los que tienen una modificación de azúcar 2', una modificación en un saliente de la cadena sencilla, preferiblemente un saliente en la cadena sencilla 3', o particularmente si es una cadena sencilla, una modificación 5' que incluye uno o más grupos fosfato o uno o más análogos de un grupo fosfato.

30 Un "agente de ARNi" como se usa en la presente memoria, es un agente de ARN que puede, o que puede escindirse en un agente de ARN que puede, regular por disminución la expresión de un gen diana, preferiblemente un ARN diana endógeno o patógeno. Aunque sin desear estar atado por la teoría, un agente de ARNi puede actuar mediante uno o más de un número de mecanismos, que incluyen escisión post-transcripcional de un ARNm diana denominado a veces en la técnica como ARNi, o mecanismos pre-transcripcionales o pre-traduccionales. Un agente de ARNi puede incluir una cadena sencilla o puede incluir más de una cadena, p.ej., puede ser un agente de ARNi bicatenario. Si el agente de ARNi es una cadena sencilla se prefiere particularmente que incluya una modificación 5' que incluye uno o más grupos fosfato o uno o más análogos de un grupo fosfato.

35 El agente de ARNi que contiene SMSR incluiría una región de suficiente homología al gen diana, y sería de suficiente longitud en términos de nucleótidos, de manera que el agente de ARNi, o un fragmento del mismo, pueda mediar la regulación por disminución del gen diana. (Para facilitar la exposición el término nucleótido o ribonucleótido se usan a veces en la presente memoria en referencia a una o más subunidades monoméricas de un agente de ARN. Se entenderá en la presente memoria que el uso del término "ribonucleótido" o "nucleótido", en la presente

memoria puede, en el caso de un ARN modificado o sustituto de nucleótido, también referirse a un nucleótido modificado, o resto de sustitución de sustituto en una o más posiciones). Por consiguiente, el agente de ARNi es o incluye una región que es al menos parcialmente, y en algunas realizaciones completamente, complementaria al ARN diana. No es necesario que haya una complementariedad perfecta entre el agente de ARNi y la diana, pero la correspondencia debe ser suficiente para permitir al agente de ARNi, o un producto de escisión del mismo, dirigir el silenciamiento específico de la secuencia, p.ej., por escisión de ARNi del ARN diana, p.ej., ARNm.

La complementariedad, o grado de homología con la cadena diana, es lo más crítico en la cadena antisentido. Aunque la complementariedad perfecta, particularmente en la cadena antisentido, se desea a menudo, algunas realizaciones pueden incluir, particularmente en la cadena antisentido, uno o más aunque preferiblemente 6, 5, 4, 3, 2 o menos malapareamientos (con respecto al ARN diana). Los malapareamientos, particularmente en la cadena antisentido, se toleran más en las regiones terminales y si están presentes están preferiblemente en una región o regiones terminales, p.ej., dentro de los 6, 5, 4, o 3 nucleótidos del extremo 5' y/o 3'. La cadena homocatenaria solo necesita ser suficientemente complementaria con la cadena antisentido para mantener el carácter bicatenario total de la molécula.

Como se trata en otro sitio en la presente memoria, un agente de ARNi se modificará a menudo o incluirá sustitutos de nucleósido además de la subunidad de modificación por sustitución de ribosa (SMSR). Las regiones monocatenarias de un agente de ARNi se modificarán a menudo o incluirán sustitutos de nucleósido, p.ej., la región o regiones desapareadas de una estructura en horquilla, p.ej., una región que une dos regiones complementarias, pueden tener modificaciones o sustitutos de nucleósido. La modificación para estabilizar uno o más de extremos 3' o 5' de un agente de ARNi, p.ej., frente a exonucleasas, o para favorecer que el agente ARNp antisentido se introduzca en RISC también se favorecen. Las modificaciones pueden incluir conectores amino C3 (o C6, C7, C12), conectores tiol, conectores carboxilo, espaciadores no nucleotídicos (C3, C6, C9, C12, abásico, trietilenglicol, hexaetilenglicol), reactivos especiales de biotina o fluoresceína que vienen como fosforamidas y que tienen otro grupo hidroxilo protegido por DMT, permitiendo múltiples acoplamientos durante la síntesis de ARN.

Los agentes de ARNi incluyen: moléculas que son suficientemente largas para desencadenar la respuesta de interferón (que puede escindirse por Dicer (Bernstein *et al.* 2001. Nature, 409:363-366) e introducir un RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARNi)); y moléculas que son suficientemente cortas como para que no desencadenen la respuesta del interferón (cuyas moléculas pueden también escindirse por Dicer y/o introducir un RISC), p.ej., moléculas que son de un tamaño que permiten la entrada en un RISC, p.ej., moléculas que parecen productos de escisión de Dicer. Las moléculas que son suficientemente cortas para no desencadenar una respuesta de interferón se denominan agentes de ARNp o agentes de ARNi pequeños en la presente memoria. "Agente de ARNp o agente de ARNi pequeños" como se usa en la presente memoria, se refiere a un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARN bicatenario o agente monocatenario, que es suficientemente corto para que no induzca una respuesta nociva de interferón en una célula humana, p.ej., tiene una región doble de menos de 60 pero preferiblemente menor que 50, 40 o 30 pares de nucleótidos. El agente de ARNp, o un producto de escisión del mismo, puede regular por disminución un gen diana, p.ej., induciendo el ARNi con respecto a un ARN diana, preferiblemente un ARN diana endógeno o patógeno.

Cada cadena de un agente de ARNp puede ser igual a o menor que 30, 25, 24, 23, 22, 21 o 20 nucleótidos de longitud. La cadena tiene preferiblemente al menos 19 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada cadena puede tener de entre 21 y 25 nucleótidos de longitud. Los agentes de ARNp preferidos tienen una región doble de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 pares de nucleótidos, y uno o más salientes, preferiblemente uno o dos salientes en 3', de 2-3 nucleótidos.

Además de la homología al ARN diana y la capacidad de regular por disminución un gen diana, un agente de ARNi preferiblemente tendrá una o más de las siguientes propiedades:

(1) será de la Fórmula 1, 2, 3, o 4 presentadas en la sección de Agente de ARN posterior;

(2) si es monocatenario tendrá una modificación 5' que incluye uno o más grupos fosfato o uno o más análogos de un grupo fosfato;

(3) a pesar de las modificaciones, incluso a un número muy grande, o de todos los nucleósidos, tendrá una cadena antisentido que puede presentar bases (o bases modificadas) en el marco tridimensional apropiado de manera que es capaz de formar el correcto emparejamiento de bases y formar una estructura doble con un ARN diana homólogo que es suficiente para permitir la regulación por disminución de la diana, p.ej., por escisión del ARN diana;

(4) a pesar de las modificaciones, incluso a un número muy grande, o de todos los nucleósidos, aún tendrá propiedades "tipo ARN", es decir, poseerá todas las propiedades estructurales, químicas y físicas de una molécula de ARN, aunque no exclusivamente, o incluso parcialmente, del contenido con base de ribonucleótidos. Por ejemplo, un agente de ARNi puede contener, p.ej., una cadena homocatenaria y/o una antisentido en que todos los azúcares de nucleótidos contienen p.ej., 2' fluoro en lugar de 2' hidroxilo. Este agente que contiene desoxirribonucleótidos puede esperarse aún que muestre propiedades tipo ARN. Aunque sin desear estar atados por la teoría, el flúor electronegativo prefiere una orientación axial cuando se une a la posición C2' de la ribosa. Esta preferencia espacial

del flúor puede forzar, a su vez, a los azúcares a adoptar un pliegue C_3' -endo. Este es el mismo modo de pliegue que se observa en las moléculas de ARN y da lugar a la hélice tipo familia A característica del ARN. Además, como el flúor es un buen aceptor de enlace de hidrógeno, puede participar en las mismas interacciones del enlace de hidrógeno con moléculas de agua que se conocen para estabilizar las estructuras de ARN. (Generalmente, se prefiere que un resto modificado en la posición de azúcar 2' será capaz de introducirse en el enlace de H que es más característico del resto OH de un ribonucleótido que el resto H de un desoxirribonucleótido. Un agente de ARNi preferido: mostrará un pliegue C_3' -endo en todos o al menos 50, 75, 80, 85, 90 o 95% de sus azúcares; mostrará un pliegue C_3' -endo en una cantidad suficiente de sus azúcares para que dé lugar a la hélice tipo familia A característica del ARN; tendrá no más de 20, 10, 5, 4, 3, 2 o 1 azúcares que no estén en una estructura en pliegue C_3' -endo. Estas limitaciones son particularmente preferibles en la cadena antisentido;

(5) a pesar de la naturaleza de la modificación, e incluso aunque el agente de ARN pueda contener desoxinucleótidos o desoxinucleótidos modificados, particularmente en saliente u otras regiones monocatenarias, se prefiere que las moléculas de ADN, o cualquier molécula en que más del 50, 60 o 70% de los nucleótidos en la molécula, o más de 50, 60 o 70% de los nucleótidos en una región doble son desoxirribonucleótidos, o desoxirribonucleótidos modificados que son desoxi en la posición 2', se excluyan de la definición de agente de ARN.

Un "agente de ARNi monocatenario" como se usa en la presente memoria, es un agente de ARNi que está constituido por una única molécula. Puede incluir una región doble, formada por emparejamiento dentro de la cadena, p.ej., puede ser, o incluir, una estructura en horquilla o mango. Los agentes de ARNi monocatenarios son preferiblemente antisentido con respecto a la molécula diana. En realizaciones preferidas los agentes de ARNi monocatenarios están fosforilados en 5' o incluyen un análogo de fosforilo en el extremo primero 5'. Las modificaciones de 5'-fosfato incluyen aquellas que son compatibles con el silenciamiento génico mediado por RISC. Modificaciones adecuadas incluyen: 5'-monofosfato ((HO)2(O)P-O-5'); 5'-difosfato ((HO)2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-trifosfato ((HO)2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); casquete 5'-guanósina (7-metilado o no metilado) (7m-G-O-5'-HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); casquete 5'-adenósina (Appp), y cualquier estructura de casquete de nucleótido modificado o no modificado (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-monotiofosfato (fosforotioato; (HO)2(S)P-O-5'); 5'-monoditiofosfato (fosforoditioato; (HO)(HS)(S)P-O-5'), 5'-fosforotiolato ((HO)2(O)P-S-5'); cualquier combinación adicional de monofosfato, difosfato y trifosfatos sustituidos por oxígeno/azufre (p.ej., 5'-alfa-tiotrifosfato, 5'-gamma-tiotrifosfato, etc.), 5'-fosforamidatos ((HO)2(O)P-NH-5', (HO)(NH2)(O)P-O-5'), 5'-alquilfosfonatos (R=alquilo=metilo, etilo, isopropilo, propilo, etc., p.ej., RP(OH)(O)-O-5', (OH)2(O)P-5'-CH2-), 5'-alquileterfosfonatos (R=alquileter=metoximetilo (MeOCH2-), etoximetilo, etc., p.ej., RP(OH)(O)-O-5'-). (Estas modificaciones pueden usarse también con la cadena antisentido de un ARNi bicatenario).

Un agente de ARNi monocatenario sería suficientemente largo como para poder introducirse en RISC y participar en la escisión mediada por RISC de un ARNm diana. Un agente de ARNi monocatenario es de al menos 14, y más preferiblemente al menos 15, 20, 25, 29, 35, 40 o 50 nucleótidos de longitud. Es preferiblemente menor que 200, 100 o 60 nucleótidos de longitud.

Los agentes de ARNi en horquilla tendrán una región doble igual a o al menos de 17, 18, 19, 29, 21, 22, 23, 24 o 25 pares de nucleótidos. La región doble será preferiblemente igual a o menos que 200, 100 o 50 de longitud. Los intervalos preferidos para la región doble son 15-30, 17 a 23, 19 a 23, y 19 a 21 pares de nucleótidos de longitud. La horquilla tendrá preferiblemente un saliente monocatenario o región desapareada terminal, preferiblemente la 3', y preferiblemente del lado antisentido de la horquilla. Los salientes preferidos son de 2-3 nucleótidos de longitud.

Un "agente de ARNi (bc) bicatenario" como se usa en la presente memoria, es un agente de ARNi que incluye más de una, y preferiblemente dos, cadenas en que la hibridación entre cadenas puede formar una región de estructura doble.

La cadena antisentido de un agente de ARNi bicatenario sería igual a o al menos de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 25, 29, 40 o 60 nucleótidos de longitud. Sería igual a o menor que 200, 100 o 50 nucleótidos de longitud. Los intervalos preferidos son 17 a 25, 19 a 23, y 19 a 21 nucleótidos de longitud.

La cadena homosentido de un agente de ARNi bicatenario sería igual a o al menos de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 25, 29, 40 o 60 nucleótidos de longitud. Sería igual a o menor que 200, 100 o 50 nucleótidos de longitud. Los intervalos preferidos son 17 a 25, 19 a 23, y 19 a 21 nucleótidos de longitud.

La parte bicatenaria de un agente de ARNi bicatenario sería igual a o al menos de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 40 o 60 pares de nucleótidos de longitud. Sería igual a o menor que 200, 100 o 50, pares de nucleótidos de longitud. Los intervalos preferidos son de 15-30, 17 a 23, 19 a 23 y 19 a 21 pares de nucleótidos de longitud.

En muchas realizaciones, el agente de ARNi bc es suficientemente grande para que pueda escindirse por una molécula endógena, p.ej., por Dicer, para producir agentes de ARNi bc más pequeños, p.ej., agentes de ARNp.

Puede ser deseable modificar una o ambas de las cadenas de antisentido y homosentido de un agente de ARNi bicatenario. En algunos casos tendrán la misma modificación o la misma clase de modificación pero en otros casos la cadena homosentido y antisentido tendrán diferentes modificaciones, p.ej., en algunos casos es deseable

modificar solo la cadena homocodificada. Puede ser deseable modificar solo la cadena homocodificada, p.ej., inactivarla, p.ej., la cadena homocodificada puede modificarse para inactivar la cadena homocodificada y evitar la formación de un ARNp/proteína o RISC activos. Esto puede conseguirse mediante una modificación que evita la 5'-fosforilación de la cadena homocodificada, p.ej., mediante la modificación con un 5'-O-metil-ribonucleótido (véase Nykänen *et al.*, (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107, 309-321). Otras modificaciones que evitan la fosforilación pueden usarse también, p.ej., simplemente sustituir el 5'-OH por H más que O-Me. De forma alternativa, un grupo grande voluminoso puede añadirse al 5'-fosfato volviéndolo una unión fosfodiéster, aunque esto puede ser menos deseable ya que las fosfodiesterasas pueden escindir dicha unión y liberar un extremo 5' de ARNp funcional. Las modificaciones de la cadena anticodificada incluyen fosforilación de 5' además de cualquiera de las demás modificaciones 5' tratadas en la presente memoria, particularmente las modificaciones 5' tratadas anteriormente en la sección en moléculas de ARNi monocatenarias.

Se prefiere que las cadenas homocodificada y anticodificada se ligan de manera que el agente de ARNi bc incluya una cadena sencilla o región desapareada en uno o ambos extremos de la molécula. Por consiguiente, un agente de ARNi bc contiene cadenas homocodificada y anticodificada, preferiblemente emparejadas para contener un saliente, p.ej., uno o dos salientes 5' o 3' aunque preferiblemente un saliente 3' de 2-3 nucleótidos. La mayoría de realizaciones tendrán un saliente 3'. Los agentes de ARNp preferidos tendrán salientes monocatenarios, preferiblemente salientes 3', de 1 o preferiblemente 2 o 3 nucleótidos de longitud en cada extremo. Los salientes pueden ser el resultado de una cadena que es más larga que la otra, o el resultado de dos cadenas de la misma longitud que están escalonadas. Los extremos 5' están preferiblemente fosforilados.

La longitud preferida para la región doble está entre 15 y 30, lo más preferiblemente 18, 19, 20, 21, 22 y 23 nucleótidos de longitud, p.ej., en el intervalo del agente de ARNp tratado anteriormente. Los agentes de ARNp pueden parecerse en longitud y estructura a los productos procesados por Dicer naturales procedentes de ARNbc largos. Las realizaciones en que las dos cadenas del agente de ARNp están unidas, p.ej., unidas de forma covalente también se incluyen. La horquilla u otras estructuras monocatenarias que proporcionan la región bicatenaria necesaria, y preferiblemente un saliente 3' también se describen en la presente memoria.

Los agentes de ARNi aislados descritos en la presente memoria, que incluyen agentes de ARNi bc y agentes de ARNp pueden mediar el silenciamiento de un ARN diana, p.ej., ARNm, p.ej., un transcrito de un gen que codifica una proteína. Por conveniencia, dicho ARNm se denomina también en la presente memoria como ARNm a silenciar. Dicho gen también se denomina como un gen diana. En general, el ARN a silenciar es un gen endógeno o un gen patógeno. Además, también pueden ser objetivos ARN distintos de ARNm, p.ej., ARNt, y ARN víricos.

Como se usa en la presente memoria, la frase "media la iARN" se refiere a la capacidad de silenciar, en una manera específica de secuencia, un ARN diana. Aunque sin desear estar atados por la teoría, se cree que el silenciamiento usa la maquinaria o proceso de la iARN y un ARN guía, p.ej., un agente de ARNp de 21 a 23 nucleótidos.

Como se usa en la presente memoria, "específicamente hibridable" y "complementario" son términos que se usan para indicar un grado suficiente de complementariedad de manera que se da la unión estable y específica entre un compuesto descrito en la presente memoria y una molécula de ARN diana. La unión específica necesita un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto oligomérico a secuencias no diana bajo condiciones en que se desea la unión específica, es decir, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, o en el caso de ensayos *in vitro*, bajo condiciones en que los ensayos se realizan. Las secuencias no diana difieren típicamente en al menos 5 nucleótidos.

En una realización, un agente de ARNi es "suficientemente complementario" a un ARN diana, p.ej., un ARNm diana, de manera que el agente de ARNi silencia la producción de proteína codificada por el ARNm diana. En otra realización, el agente de ARNi es "exactamente complementario" (excluyendo la(s) subunidad(es) que contiene(n) SMSR) a un ARN diana, p.ej., el ARN diana y el agente de ARNi hibridan, preferiblemente para formar un híbrido hecho exclusivamente de pares de bases Watson-Crick en la región de complementariedad exacta. Un ARN diana "suficientemente complementario" puede incluir una región interna (p.ej., de al menos 10 nucleótidos) que es exactamente complementario a un ARN diana. Además, en algunas realizaciones, el agente de ARNi discrimina específicamente una diferencia de un único nucleótido. En este caso, el agente de ARNi solo media la iARN si se encuentra el complementario exacto en la región (p.ej., en 7 nucleótidos de) la diferencia del nucleótido único.

Como se usa en la presente memoria, el término "oligonucleótido" se refiere a una molécula de ácido nucleico (ARN o ADN) preferiblemente de longitud menor que 100, 200, 300 o 400 nucleótidos.

Los agentes de ARN tratados en la presente memoria incluyen ARN no modificado de otra manera además de ARN que se ha modificado, p.ej., para mejorar la eficacia, y polímeros de sustitutos de nucleósido. ARN no modificado se refiere a una molécula en que los componentes del ácido nucleico, específicamente azúcares, bases y restos fosfato, son iguales o esencialmente iguales que los que se dan en la naturaleza, preferiblemente como se dan de forma natural en el cuerpo humano. La técnica ha denominado raro o inusual, pero que se da de forma natural, los ARN como ARN modificados, véase, p.ej., Limbach *et al.*, (1994) Summary: the modified nucleosides of RNA, *Nucleic Acids Res.* 22:2183-2196. Dichos ARN raros o inusuales, a menudo denominados ARN modificados (aparentemente porque son típicamente el resultado de una modificación de forma post-transcripcional) están dentro

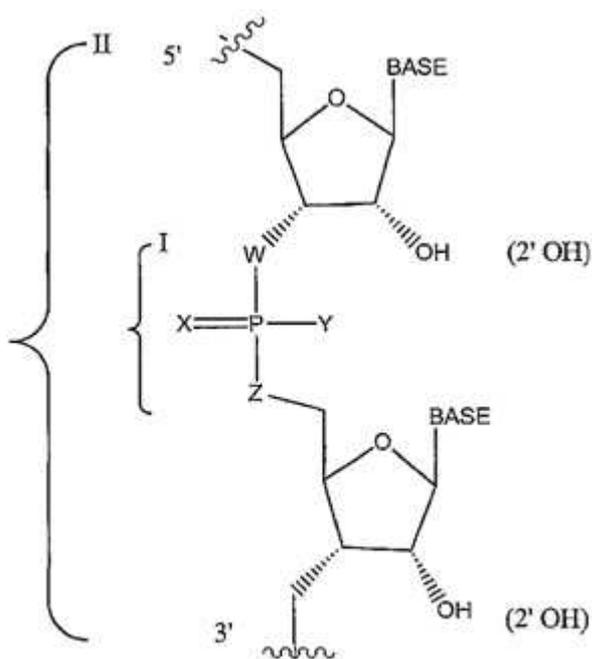
del término ARN no modificado, como se usa en la presente memoria. ARN modificado como se usa en la presente memoria se refiere a una molécula en que uno o más de los componentes del ácido nucleico, específicamente azúcares, bases, y restos fosfato, son diferentes de las que se dan en la naturaleza, preferiblemente diferentes de la que se dan en el cuerpo humano. Aunque se les denomina como "ARN" modificados, incluirán por supuesto, debido a la modificación, moléculas que no son ARN. Los sustitutos de nucleósido son moléculas en que la estructura de ribofosfato se sustituye con un constructo que no es ribofosfato que permite a las bases presentarse en la relación espacial correcta de manera que la hibridación es esencialmente similar a la que se ve con una estructura de ribofosfato, p.ej., miméticos no cargados de la estructura de ribofosfato. Ejemplos de todo lo anterior se tratan en la presente memoria.

5
10
15
Mucha de la discusión posterior se refiere a moléculas monocatenarias. En muchas realizaciones descritas en la presente memoria un agente de ARNi bicatenario, p.ej., un agente de ARNi parcialmente bicatenario, se necesita o prefiere. Por consiguiente, se entiende que esas estructuras bicatenarias (p.ej., donde dos moléculas separadas se ponen en contacto para formar la región bicatenaria o donde la región bicatenaria se forma por emparejamiento intramolecular (p.ej., una estructura en horquilla)) hechas de las estructuras monocatenarias descritas a continuación están en la presente descripción. Se describen longitudes preferidas en otra parte en la presente memoria.

20
25
Como los ácidos nucleicos son polímeros de subunidades o monómeros, muchas de las modificaciones descritas a continuación se dan en una posición que se repite en un ácido nucleico, p.ej., una modificación de una base, o un resto fosfato, o el O que no se une de un resto fosfato. En algunos casos la modificación se dará en todas las posiciones objeto en el ácido nucleico pero en muchos, de hecho en la mayoría de los casos no se dará. Por medio de ejemplo, una modificación puede darse solo en una posición terminal 3' o 5', puede darse solo en unas regiones terminales, p.ej., en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5 o 10 nucleótidos de una cadena. Puede darse una modificación en una región bicatenaria, una región monocatenaria o en ambas. Puede darse una modificación solo en la región bicatenaria de un ARN o puede darse solo en una región monocatenaria de un ARN. P.ej., una modificación de fosforotioato en una posición O que no se une solo puede darse en uno o ambos extremos, puede solo darse en unas regiones terminales, p.ej., en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5 o 10 nucleótidos de una cadena, o puede darse en regiones bicatenarias y monocatenarias, particularmente en los extremos. El extremo o extremos 5' pueden fosforilarse.

30
35
En algunas realizaciones se prefiere particularmente, p.ej., mejorar la estabilidad, incluir bases particulares en salientes, o incluir nucleótidos modificados o sustitutos de nucleótidos, en salientes monocatenarios, p.ej., en un saliente 5' o 3', o en ambos. P.ej., puede ser deseable incluir nucleótidos de purina en los salientes. En algunas realizaciones todas o algunas de las bases en un saliente 3' o 5' se modificarán, p.ej., con una modificación descrita en la presente memoria. Las modificaciones pueden incluir, p.ej., el uso de modificaciones en el grupo OH 2' del azúcar ribosa, p.ej., el uso de desoxirribonucleótidos, p.ej., desoxitimidina, en vez de ribonucleótidos, y modificaciones en el grupo fosfato, p.ej., modificaciones de fosforotioato. Los salientes no necesitan ser homólogos con la secuencia diana.

Las modificaciones y sustitutos de nucleótido se tratan a continuación.



FÓRMULA 1

La estructura presentada anteriormente en la Fórmula 1 representa una parte de un ácido ribonucleico. Los componentes básicos son el azúcar ribosa, la base, los fosfatos terminales y conectores fosfato internucleótidos. Donde las bases son bases que se dan de forma natural, p.ej., adenina, uracilo, guanina o citosina, los azúcares son azúcar ribosa con hidroxilo 2' no modificado (como se representa) y W, X, Y y Z son todos O, la Fórmula 1

5

representa un oligorribonucleótido no modificado que se da de forma natural. Los oligorribonucleótidos no modificados pueden ser menos que óptimos en algunas aplicaciones, p.ej., los oligorribonucleótidos no modificados pueden ser propensos a la degradación mediante p.ej., nucleasas celulares. Las nucleasas pueden hidrolizar los enlaces fosfodiéster del ácido nucleico. Sin embargo, las modificaciones químicas a uno o más de los componentes de ARN anteriores pueden dar propiedades mejoradas, y, p.ej., pueden dar oligorribonucleótidos más estables a las nucleasas. Los oligorribonucleótidos no modificados pueden ser también menos que óptimos en términos de ofrecer puntos de anclaje para unir ligandos u otros restos a un agente de ARNi.

10

Los ácidos nucleicos modificados y sustitutos de nucleótido pueden incluir uno o más de:

15

(i) alteración, p.ej., sustitución, de uno o ambos de los oxígenos fosfato que no se unen (X e Y) y/o de uno o más de los oxígenos de fosfato que se unen (W y Z) (cuando el fosfato está en la posición terminal, una de las posiciones W o Z no unirá el fosfato a un elemento adicional en un ácido ribonucleico que se da de forma natural. Sin embargo, por simplicidad de terminología, excepto donde se anote otra cosa, la posición W en el extremo 5' de un ácido nucleico y la posición Z terminal en el extremo 3' de un ácido nucleico, están dentro del término "oxígenos fosfato que se unen" como se usa en la presente memoria);

20

(ii) alteración, p.ej., sustitución, de un constituyente del azúcar ribosa, p.ej., del hidroxilo 2' en el azúcar ribosa, o sustitución completa del azúcar ribosa con una estructura distinta de la ribosa, p.ej., como se describe en la presente memoria;

(iii) sustitución completa del resto fosfato (paréntesis I) con conectores "desfosfo";

(iv) modificación o sustitución de una base que se da de forma natural;

25

(v) sustitución o modificación de la estructura ribosa-fosfato (paréntesis II);

(vi) modificación del extremo 3' o el extremo 5' del ARN, p.ej., eliminación, modificación o sustitución de un grupo fosfato terminal o conjugación de un resto, p.ej., un resto marcado de forma fluorescente, o bien el extremo 3' o 5' de ARN.

30

Los términos sustitución, modificación, alteración y similares, como se usan en este contexto, no implican ninguna limitación del proceso, p.ej., modificación no significa que se deba empezar con un ácido ribonucleico de referencia o que se dé de forma natural y modificarlo para producir un ácido ribonucleico modificado sino que modificado sencillamente indica una diferencia de una molécula que se da de forma natural.

35

Se entiende que la estructura electrónica real de algunas entidades químicas no pueden representarse de forma adecuada solo por una forma canónica (es decir, estructura de Lewis). Aunque sin desear estar atados por la teoría, la estructura real puede ser en vez de eso algún híbrido o promedio ponderado de dos o más formas canónicas, conocidas de forma colectiva como formas o estructuras de resonancia. Las estructuras de resonancia no son entidades químicas discreta y existen solo en el papel. Difieren las unas de las otras solo en la posición o "localización" de los electrones de enlace y no enlace para una entidad química particular. Puede ser posible para una estructura de resonancia contribuir en un mayor grado al híbrido que las otras. Por consiguiente, las descripciones escritas y gráficas de las realizaciones descritas en la presente memoria están hechas en términos de lo que la técnica reconoce como la forma de resonancia predominante para una especie particular. Por ejemplo, cualquier fosforoamidato (sustitución de un oxígeno que no se une con nitrógeno) se representaría por X = O e Y = N en la figura anterior.

40

Las modificaciones específicas se tratan en más detalle a continuación.

45

El grupo fosfato

El grupo fosfato es una especie cargada de forma negativa. La carga se distribuye igualmente sobre los dos átomos de oxígeno no unidos (es decir, X e Y en la Fórmula 1 anterior). Sin embargo, el grupo fosfato puede modificarse sustituyendo uno de los oxígenos con un sustituyente diferente. Un resultado de esta modificación a las estructuras fosfato de ARN puede ser resistencia aumentada del oligorribonucleótido a la ruptura nucleolítica. Por consiguiente, aunque sin desear estar atados por la teoría, puede ser deseable en algunas realizaciones introducir alteraciones que den por resultado o bien un conector no cargado o un conector cargado con distribución de carga asimétrica.

50

Ejemplos de grupos fosfato modificado incluyen fosforotioato, fosforoselenatos, boranofosfatos, ésteres de boranofosfatos, fosfonatos de hidrógeno, fosforoamidatos, alquil o arilfosfonatos y fosfotriésteres. Los fosforoditioatos tienen ambos oxígenos no unidos sustituidos por azufre. A diferencia de la situación donde solo uno

- de X o Y se altera, el centro de fósforo en los fosforoditioatos es aquiral lo que descarta la formación de diastereómeros de oligorribonucleótidos. La formación de diastereómeros puede dar por resultado una preparación en que los diastereómeros individuales muestran resistencia variable a las nucleasas. Además, la afinidad de hibridación del ARN que contiene grupos fosfato quirales puede ser menor respecto a las especies de ARN no modificadas correspondientes. Por consiguiente, aunque sin desear estar atados por la teoría, las modificaciones tanto de X e Y que eliminan el centro quiral, p.ej., la formación de fosforoditioato, puede ser deseable en que no pueden producir mezclas de diastereómeros. Por consiguiente, X puede ser cualquiera de S, Se, B, C, H, N u OR (R es alquilo o arilo). Por consiguiente Y puede ser cualquiera de S, Se, B, C, H, N u OR (R es alquilo o arilo). La sustitución de X y/o Y con azufre se prefiere.
- 5 El conector fosfato puede modificarse también por sustitución de un oxígeno de unión (es decir, W o Z en la Fórmula 1) con nitrógeno (fosforoamidatos con puente), azufre (fosforoamidatos con puente) y carbono (metilenofosfonatos con puente). La sustitución puede darse en un oxígeno terminal (posición W (3') o posición Z (5')). La sustitución de W con carbono o Z con nitrógeno se prefiere.

Los agentes candidatos pueden evaluarse para la adecuación como se describe a continuación.

- 15 El grupo azúcar

Un ARN modificado puede incluir la modificación de todos o algunos de los grupos de azúcar del ácido ribonucleico. P.ej., el grupo hidroxilo 2' (OH) puede modificarse o sustituirse con un número de diferentes sustituyentes "oxi" o "desoxi". Aunque sin estar atados por la teoría, se espera estabilidad mejorada ya que el hidroxilo ya no puede desprotonarse para formar un ión alcóxido 2'. El alcóxido 2' puede catalizar la degradación por ataque nucleófilo intramolecular en el átomo de fósforo del conector. De nuevo, aunque sin desear estar atados por la teoría, puede ser deseable para algunas realizaciones introducir alteraciones en que la formación de alcóxido en la posición 2' no es posible.

Ejemplos de modificaciones del grupo hidroxilo 2' con "oxi" incluyen alcoxi o ariloxi (OR, p.ej., R = H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar); polietilenglicoles (PEG), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$; ácidos nucleicos "bloqueados" (LNA) en que el hidroxilo 2' está conectado, p.ej., por un puente metileno, al carbono 4' del mismo azúcar ribosa; O-AMINA (AMINA = NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino, etilendiamina, poliamino) y aminoalcoxi, $O(CH_2)_nAMINA$, (p.ej., AMINA = NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino, etilendiamina, poliamino). Es digno de mención que los oligonucleótidos que contienen solo el grupo metoxietilo (MOE), $(OCH_2CH_2OCH_3)$, un derivado de PEG), muestran estabilidades a la nucleasa comparables con los modificados con la fuerte modificación de fosforotioato.

Las modificaciones "desoxi" incluyen hidrógeno (es decir, azúcares desoxirribosa, que son de particular importancia para las partes salientes de ARN parcialmente bc); halo (p.ej., fluoro); amino (p.ej., NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino o aminoácido); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2AMINA$ (AMINA = NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino), $-NHC(O)R$ (R = alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar), ciano; mercapto; alquil-tioalquilo; tioalcoxi; y alquilo, cicloalquilo, arilo, alqueno y alquino, que puede estar opcionalmente sustituido con p.ej., una funcionalidad amino. Sustituyentes preferidos son 2'-metoxietilo, 2'- OCH_3 , 2'-O-alilo, 2'-C-alilo, y 2'-fluoro.

El grupo azúcar puede contener además uno o más carbonos que posean la configuración estereoquímica contraria que la del carbono correspondiente en la ribosa. Por consiguiente, un ARN modificado puede incluir nucleótidos que contienen p.ej., arabinos, como el azúcar.

Los ARN modificados pueden incluir también azúcares "abásicas", que carecen de una nucleobase en C-1'. Estos azúcares abásicos pueden también contener adicionalmente modificaciones en uno o más de los átomos de azúcar constituyentes.

45 Para maximizar la resistencia a la nucleasa, las modificaciones 2' pueden usarse en combinación con una o más modificaciones del conector fosfato (p.ej., fosforotioato). Los denominados oligonucleótidos "quiméricos" son los que contienen dos o más modificaciones diferentes.

La modificación puede además implicar la sustitución completa de una estructura ribosa con otra entidad en uno o más sitios en el agente de ARNi. Estas modificaciones se describen en la sección titulada Sustituciones de ribosa por SMSRs.

Las modificaciones candidatas pueden evaluarse como se describe a continuación.

Sustitución del grupo fosfato

El grupo fosfato puede sustituirse por conectores que no contienen fósforo (cf. paréntesis I en la Fórmula 1 anterior). Aunque sin desear estar atados por la teoría, se cree que como el grupo fosfodíéster cargado es el centro de reacción en la degradación nucleolítica, su sustitución con miméticos estructurales neutros daría una estabilidad a la

55

nucleasa mejorada. De nuevo, aunque sin desear estar atados por la teoría, puede ser deseable, en alguna realización, introducir alteraciones en que el grupo fosfato cargado se sustituye por un resto neutro.

5 Ejemplos de restos que pueden sustituir al grupo fosfato incluyen siloxano, carbonato, carboximetilo, carbamato, amida, tioéter, conector de óxido de etileno, sulfonato, sulfonamida, tioformacetal, formacetal, oxima, metilenoimino, metilenoimilimino, metilenoimidazolo, metilenoimidilhidrazo y metilenooximetilimino. Las sustituciones preferidas incluyen los grupos metilencarbonilamino y metilenoimilimino.

Las modificaciones candidatas pueden evaluarse como se describe a continuación.

Sustitución de la estructura de ribofosfato

10 También pueden construirse estructuras que mimetizan oligonucleótidos en las que el conector fosfato y el azúcar ribosa se sustituyen por sustitutos de nucleósido o nucleótido resistentes a la nucleasa (véase el Paréntesis II de la fórmula 1 anterior). Aunque sin desear estar atados por la teoría, se cree que la ausencia de una estructura cargada de forma repetitiva disminuye la unión a las proteínas que reconocen polianiones (p.ej., nucleasas). De nuevo, aunque sin desear estar atados por la teoría, puede ser deseable en alguna realización introducir alteraciones en que las bases están ancladas por una estructura sustituta neutra.

15 Los ejemplos incluyen sustitutos de nucleósido mofilina, ciclobutilo, pirrolidina y ácido peptidonucleico (PNA). Un sustituto preferido es un sustituto de PNA.

Las modificaciones candidatas pueden evaluarse como se describe a continuación.

Modificaciones terminales

20 Los extremos 3' y 5' de un oligonucleótido pueden modificarse. Dichas modificaciones pueden ser en el extremo 3', el extremo 5' o ambos extremos de la molécula. Pueden incluir la modificación o sustitución de un fosfato terminal entero o de uno o más de los átomos del grupo fosfato. P.ej., los extremos 3' y 5' de un oligonucleótido pueden conjugarse a otras entidades moleculares funcionales tales como restos de marcaje, p.ej., fluoróforos (p.ej., pireno, TAMRA, fluoresceína, tintes Cy3 o Cy5) o grupos protectores (basados p.ej., en azufre, silicio, boro o éster). Las entidades moleculares funcionales pueden unirse al azúcar a través de un grupo fosfato y/o un espaciador. El átomo terminal del espaciador puede conectar con o sustituir al átomo de unión del grupo fosfato o el grupo O, N, S o C de C-3' o C-5' del azúcar. De forma alternativa, el espaciador puede conectar con o sustituir el átomo terminal de un sustituto de nucleótido (p.ej., PNAs). Estos espaciadores o conectores pueden incluir p.ej., $-(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nN-$, $-(CH_2)_nO-$, $-(CH_2)_nS-$, $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OH$ (p.ej., $n=3$ o 6), azúcares abásicos, amida, carboxi, amina, oxiamina, oxiimina, tioéter, disulfuro, tiourea, sulfonamida o morfolino, o reactivos de biotina y fluoresceína. Cuando una matriz espaciador/fosfato-entidad molecular funcional-espaciador/fosfato se interpone entre dos cadenas de agentes de ARNi, esta matriz puede sustituirse por un bucle de ARN en horquilla en un agente de ARN tipo horquilla. El extremo 3' puede ser un grupo $-OH$. Aunque sin desear estar atados por la teoría, se cree que la conjugación de ciertos restos puede mejorar las propiedades de transporte, hibridación y especificidad. De nuevo, aunque sin desear estar atados por la teoría, puede ser deseable introducir alteraciones terminales que mejoren la resistencia a la nucleasa.

25 Otros ejemplos de modificaciones terminales incluyen tintes, agentes de intercalado (p.ej., acridinas), agentes de reticulado (p.ej., psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, Safirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (p.ej., fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificiales (p.ej., EDTA), vehiculos lipófilos (p.ej., colesterol, ácido cólico, ácido adamantano-acético, ácido 1-pirenobutírico, dihidrotestosterona, 1,3-bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloheptadecilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritilo, o fenoxazina) y conjugados peptídicos (p.ej., péptido antenapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (p.ej., PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (p.ej., biotina), facilitadores de transporte/absorción (p.ej., aspirina, vitamina E, ácido fólico), ribonucleasas sintéticas (p.ej., imidazol, bisimidazol, histamina, agrupaciones de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complejos de Eu³⁺ de tetraazamacrociclos).

30

35

40

45

Pueden añadirse modificaciones terminales por un número de razones, que incluyen como se trata en otra parte en la presente memoria, modular la actividad o modular la resistencia a la degradación. Las modificaciones terminales útiles para modular la actividad incluyen la modificación del extremo 5' con fosfato o análogos de fosfato. P.ej., en realizaciones preferidas los agentes de ARNi, especialmente las cadenas antisentido, están 5' fosforiladas o incluyen un análogo de fosforilo en el extremo primero 5'. Las modificaciones 5'-fosfato incluyen las que son compatibles con el silenciamiento génico mediado por RISC. Las modificaciones adecuadas incluyen: 5'-monofosfato ((HO)2(O)P-O-5'); 5'-difosfato ((HO)2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-trifosfato ((HO)2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); casquete 5'-guanósina (7-metilado o no metilado) (7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); casquete 5'-adenósina (Aapp), y cualquier estructura en casquete de nucleótido modificado o no modificado (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-monotiofosfato (fosforotioato; (HO)2(S)P-O-5'); 5'-monoditiofosfato (fosforoditioato; (HO)(HS)(S)P-O-5'); 5'-fosfortiolato ((HO)2(O)P-S-5'); cualquier combinación adicional de monofosfato, difosfato y trifosfatos sustituidos con oxígeno/azufre (p.ej., 5'-alfa-tiotrifosfato, 5'-gamma-tiotrifosfato, etc.), 5'-fosforamidatos ((HO)2(O)P-NH-5', (HO)(NH2)(O)P-O-5'), 5'-alquilfosfonatos (R=alquilo=metilo, etilo, isopropilo, propilo, etc., p.ej.,

50

55

RP(OH)(O)-O-5'-, (HO)2(O)P-5'-CH2-), 5'-alquileterfosfonatos (R=alquiléter=metoximetilo (MeOCH2-), etoximetilo, etc., p.ej., RP(OH)(O)-O-5'-).

5 Las modificaciones terminales pueden ser también útiles para monitorizar la distribución, y en dichos casos los grupos preferidos a añadir incluyen fluoróforos, p.ej., fluoresceína o un tinte Alexa, p.ej., Alexa 488. Las modificaciones terminales pueden ser también útiles para mejorar la absorción, modificaciones útiles para esto incluyen el colesterol. Las modificaciones terminales pueden ser también útiles para reticular un agente de ARN a otro resto; las modificaciones útiles para esto incluyen mitomicina C.

Las modificaciones candidatas pueden evaluarse como se describe a continuación.

Las bases

10 Adenina, guanina, citosina y uracilo son las bases más comunes encontradas en el ARN. Estas bases pueden modificarse o sustituirse para proporcionar ARN que tienen propiedades mejoradas. P.ej., pueden prepararse oligorribonucleótidos resistentes a la nucleasa con estas bases o con nucleobases sintéticas y naturales (p.ej., inosina, timina, xantina, hipoxantina, nubularina, isoguanisina o tubercidina) y cualquiera de las modificaciones anteriores. De forma alternativa, los análogos sustituidos o modificados de cualquiera de las bases anteriores, p.ej.,
 15 "bases inusuales" y "bases universales" descritas en la presente memoria, pueden emplearse. Los ejemplos incluyen sin limitación 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 5-halouracilo, 5-(2-aminopropil)uracilo, 5-aminoaliluracilo, 8-halo, amino, tiol, tioalquilo, hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-
 20 sustituidas, 7-metilguanina, pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina, dihidrouracilo, 3-desaza-5-azacitosina, 2-aminopurina, 5-alquiluracilo, 7-alquilguanina, 5-alquilocitosina, 7-desazaadenina, N6,N6-dimetiladenina, 2,6-diaminopurina, 5-amino-alil-uracilo, N3-metiluracilo, 1,2,4-triazoles sustituidos, 2-piridinona, 5-nitroindol, 3-nitropirrol, 5-metoxiuracilo, ácido uracil-5-oxiacético, 5-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 5-metoxicarbonilmetil-2-
 25 tiouracilo, 5-metilaminometil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uracilo, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N4-acetilcitosina, 2-tiocitosina, N6-metiladenina, N6-isopentiladenina, 2-metil-N6-isopenteniladenina, N-metilguaninas, o bases O-alquiladas. Purinas y pirimidinas adicionales incluyen las descritas en la Patente de EE.UU. núm. 3.687.808, las descritas en la Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, y las descritas por Englisch *et al.*, *Angewandte Chemie*, Edición internacional, 1991, 30, 613.

Generalmente, los cambios de bases se prefieren menos para promover la estabilidad, pero pueden ser útiles por otras razones, p.ej., algunas, p.ej., 2,6-diaminopurina y 2-aminopurina, son fluorescentes. Las bases modificadas pueden reducir la especificidad de la diana. Esto debería tenerse en cuenta en el diseño de los agentes de ARNi.

Las modificaciones candidatas pueden evaluarse como se describe a continuación.

35 Evaluación de ARN candidatos

Se puede evaluar un agente de ARN candidato, p.ej., un ARN modificado, por una propiedad seleccionada exponiendo al agente o molécula modificada y una molécula de control a las condiciones apropiadas y evaluando la presencia de la propiedad seleccionada. Por ejemplo, la resistencia a un degradante puede evaluarse como sigue. Un ARN modificado candidato (y preferiblemente una molécula de control, normalmente la forma no modificada)
 40 pueden exponerse a condiciones degradativas, p.ej., exponerse a un medio, que incluye un agente degradativo, p.ej., una nucleasa. P.ej., se puede usar una muestra biológica, p.ej., una que es similar a un medio, que puede encontrarse, en uso terapéutico, p.ej., sangre o una fracción celular, p.ej., un homogeneizado libre de células o células alteradas. El candidato y el control podrían evaluarse entonces para la resistencia a la degradación por cualquiera de un número de enfoques. Por ejemplo, el candidato y el control podrían marcarse, preferiblemente
 45 antes de la exposición, con p.ej., una marca radioactiva o enzimática, o una marca fluorescente, tal como Cy3 o Cy5. El control y el ARN modificado pueden incubarse con el agente degradativo, y opcionalmente un control, p.ej., un agente degradativo inactivado, p.ej., inactivado por calor. Se determina entonces un parámetro físico, p.ej., tamaño, de las moléculas modificada y de control. Pueden determinarse por un método físico, p.ej., mediante electroforesis en gel de poliacrilamida o una columna de exclusión molecular, para evaluar si la molécula ha mantenido su longitud original, o la funcionalidad evaluada. De forma alternativa, puede usarse el análisis de electroinmunotransferencia de
 50 Northern para evaluar la longitud de una molécula modificada no marcada.

Un ensayo funcional puede usarse también para evaluar el agente candidato. Un ensayo funcional puede aplicarse inicialmente o después de un ensayo no funcional anterior, (p.ej., ensayo para la resistencia a la degradación) para determinar si la modificación altera la capacidad de la molécula de silenciar la expresión génica. Por ejemplo, una
 55 célula, p.ej., una célula de mamífero, tal como una célula de ratón o humana, puede co-transfectarse con un plásmido que expresa una proteína fluorescente, p.ej., GFP, y un agente de ARN candidato homólogo al transcrito que codifica la proteína fluorescente (véase, p.ej., el documento WO 00/44914). Por ejemplo, un ARNbc modificado homólogo al ARNm de GFP puede ensayarse para la capacidad de inhibir la expresión de GFP monitorizando una

disminución en la fluorescencia de la célula, en comparación con una célula de control, en que la transfección no incluyó el ARNbc candidato, p.ej., controles sin agente añadido y/o controles con un ARN no modificado añadido. La eficacia del agente candidato en la expresión génica puede evaluarse comparando la fluorescencia de la célula en presencia de los agentes de ARNbc modificado y no modificado.

- 5 En un ensayo funcional alternativo, un agente de ARNbc candidato homólogo a un gen de ratón endógeno, preferiblemente un gen que se expresa de forma materna, tal como *c-mos*, puede inyectarse en un ovocito de ratón inmaduro para evaluar la capacidad del agente para inhibir la expresión génica *in vivo* (véase, p.ej., el documento WO 01/36646). Un fenotipo del ovocito, p.ej., la capacidad de mantener la detención en la metafase II, puede monitorizarse como un indicador de que el agente está inhibiendo la expresión. Por ejemplo, la escisión del ARNm de *c-mos* por un agente de ARNbc provocaría que el ovocito saliera de la detención de la metafase e iniciara el desarrollo partenogenético (Colledge *et al.*, *Nature* 370:65-68, 1994; Hashimoto *et al.*, *Nature*, 370:68-71, 1994). El efecto del agente modificado en los niveles de ARN diana puede verificarse por electroinmunotransferencia de Northern para evaluar una disminución en el nivel del ARNm diana, o por electroinmunotransferencia de Western para evaluar una disminución en el nivel de la proteína diana, en comparación con un control negativo. Los controles pueden incluir células en que no se añade agente y/o células en que se añade un ARN no modificado.

Referencias

Referencias generales

- Los oligorribonucleótidos y oligorribonucleósidos usados de acuerdo con esta descripción pueden estar con síntesis en fase sólida, véase por ejemplo "Oligonucleotide synthesis, a practical approach", Ed. M.J. Gait, IRL Press, 1984; "Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach", Ed. F. Eckstein, IRL Press, 1991 (especialmente el Capítulo 1, Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis, Capítulo 2, Oligoribonucleotide synthesis, Capítulo 3, 2'-O—Methyloligoribonucleotide-s: synthesis and applications, Capítulo 4, Phosphorothioate oligonucleotides, Capítulo 5, Synthesis of oligonucleotide phosphorodithioates, Capítulo 6, Synthesis of oligo-2'-deoxyribonucleoside methylphosphonates, y Capítulo 7, Oligodeoxynucleotides containing modified bases. Otros procedimientos sintéticos, reactivos, grupos bloqueantes y condiciones de reacción particularmente útiles se describen en Martin, P., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504; Beaucage, S.L. e Iyer, R.P., *Tetrahedron*, 1992, 48, 2223-2311 y Beaucage, S.L. e Iyer, R.P., *Tetrahedron*, 1993, 49, 6123-6194, o referencias indicadas en ellos.

La modificación descrita en los documentos WO 00/44895, WO 01/75164 o WO 02/44321 puede usarse en la presente memoria.

Referencias del grupo fosfato

- La preparación de oligorribonucleótidos fosfinato se describe en la Patente de EE.UU. núm. 5.508.270. La preparación de oligorribonucleótidos de fosfonato de alquilo se describe en la Patente de EE.UU. núm. 4.469.863. La preparación de oligorribonucleótidos de fosforamidita se describe en la Patente de EE.UU. núm. 5.366.878. La preparación de oligorribonucleótidos de fosfotriéster se describe en la Patente de EE.UU. núm. 5.023.243. La preparación de oligorribonucleótido de boranofosfato se describe en las Patentes de EE.UU. núms. 5.130.302 y 5.177.198. La preparación de oligorribonucleótidos de 3'-desoxi-3'-amino fosforamidato se describe en la Patente de EE.UU. núm. 5.476.925. Los oligorribonucleótidos de 3'-desoxi-3'-metileno fosfonato se describe en An, H, *et al. J. Org. Chem.* 2001, 66, 2789-2801. La preparación de nucleótidos con puentes de azufre se describe en Sproat *et al. Nucleosides Nucleotides* 1988, 7.651 y Crosstick *et al., Tetrahedron Lett.* 1989, 30, 4693.

Referencias del grupo azúcar

- La modificaciones a las modificaciones 2' pueden encontrarse en Verma, S. *et al., Annu. Rev. Biochem.* 1998, 67, 99-134 y todas las referencias en ella. Las modificaciones específicas a la ribosa pueden encontrarse en las siguientes referencias: 2'-fluoro (Kawasaki *et al., J. Med. Chem.*, 1993, 36, 831-841), 2'-MOE (Martin, P. *Helv. Chim. Acta* 1996, 79, 1930-1938), "LNA" (Wengel, J. *Acc. Chem. Res.* 1999, 32, 301-310).

Referencias de la sustitución del grupo fosfato

- Los oligorribonucleósidos unidos a metileno metilimino, también identificados en la presente memoria como oligorribonucleósidos unidos a MMI, oligorribonucleósidos unidos a metilendimetilhidrazo, también identificados en la presente memoria como oligorribonucleósidos unidos a MDH, y oligonucleósidos unidos a metilencarbonilamino, también identificados en la presente memoria como oligorribonucleósidos unidos a amida-3, y oligonucleósidos unidos a metilenoaminocarbonilo, también identificados en la presente memoria como oligorribonucleósidos unidos a amida-4 además de compuestos estructurales mezclados que tienen, por ejemplo, uniones alternas MMI y PO o PS pueden prepararse como se describe en las Patentes de EE.UU. núms. 5.378.825, 5.386.023, 5.489.677 y en las solicitudes PCT publicadas PCT/US92/04294 y PCT/US92/04305 (publicadas como los documentos WO 92/20822 y WO 92/20823, respectivamente). Los oligorribonucleósidos unidos a formacetal y tioformacetal pueden prepararse como se describe en las Patentes de EE.UU. núms. 5.264.562 y 5.264.564. Los oligorribonucleósidos unidos a óxido de etileno pueden prepararse como se describe en la Patente de EE.UU. núm. 5.223.618. Las sustituciones de

siloxano se describen en Cormier, J.F *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 1988, 16, 4583. Las sustituciones de carbonato se describen en Tittensor, J.R. *J. Chem. Soc. C* 1971, 1933. Las sustituciones de carboximetilo se describen en Edge, M.D. *et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1972, 1991. Las sustituciones de carbamato se describen en Stürchak, E.P. *Nucleic Acids Res.* 1989, 17, 6129.

5 Referencias de la sustitución de la estructura de fosfato-ribosa

Los compuestos sustitutos de azúcar ciclobutilo pueden prepararse como se describe en la Patente de EE.UU. núm. 5.359.044. El sustituto de azúcar pirrolidina puede prepararse como se describe en la Patente de EE.UU. núm. 5.519.134. Los sustitutos de azúcar morfolino pueden prepararse como se describen en las Patentes de EE.UU. núms. 5.142.047 y 5.235.033, y otras descripciones de patente relacionadas. Los ácidos peptidonucleicos (PNA) se conocen per se y pueden prepararse de acuerdo con cualquiera de los diversos procedimientos indicados en *Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1996, 4, 5-23. Pueden también prepararse de acuerdo con la Patente de EE.UU. núm. 5.539.083.

Referencias de la modificación terminal

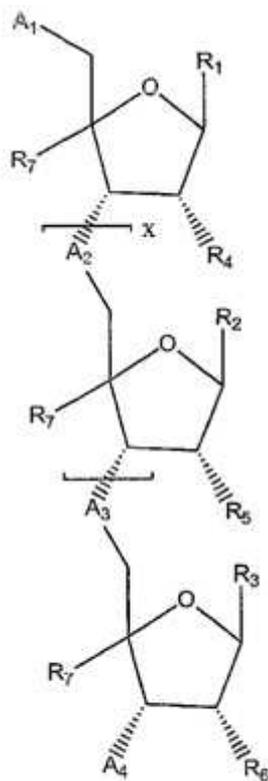
15 Las modificaciones terminales se describen en Manoharan, M. *et al.*, *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 12, 103-128 (2002) y referencias en ello.

Referencias de bases

20 Las amiditas de nucleósido de purina N-2 sustituidas pueden prepararse como se describe en la Patente de EE.UU. núm. 5.459.255. Las amiditas de nucleósido de 3-desaza-purina pueden prepararse como se describe en la Patente de EE.UU. núm. 5.457.191. Las amiditas de nucleósido de pirimidina 5,6-sustituida pueden prepararse como se describe en la Patente de EE.UU. núm. 5.614.617. Las amiditas de nucleósido de 5-propinil-pirimidina pueden prepararse como se describe en la Patente de EE.UU. núm. 5.484.908. Pueden describirse referencias adicionales en la sección anterior en modificaciones de base.

Agentes de ARNi preferidos

Los agentes de ARN preferidos tienen la siguiente estructura (véase la Fórmula 2 posterior):

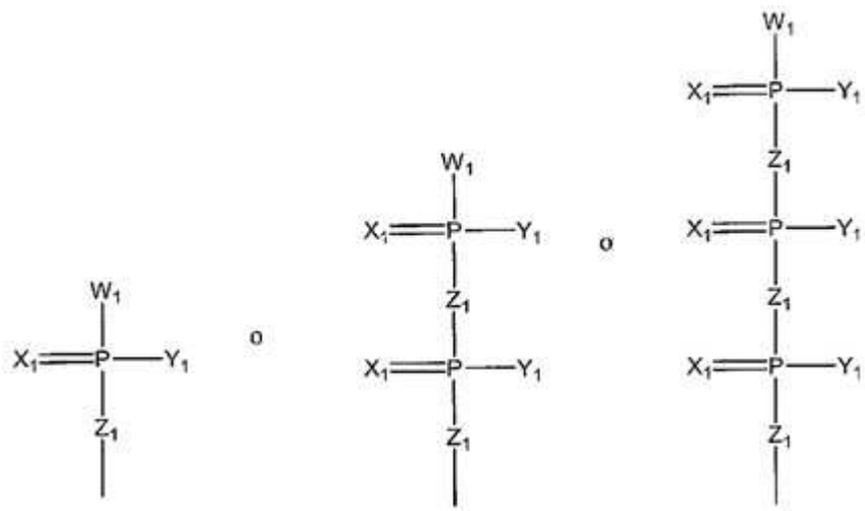


FÓRMULA 2

En referencia a la Fórmula 2 anterior, R¹, R² y R³ son cada uno, independientemente, H, (es decir, nucleótidos abásicos), adenina, guanina, citosina y uracilo, inosina, timina, xantina, hipoxantina, nubularina, tubercidina, isoguanisina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 5-haloruacilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 5-halouracilo, 5-(2-aminopropil)uracilo, 5-aminoaliluracilo, adeninas y guaninas 8-sustituidas con 8-halo, amino, tiol, tioalquilo, hidroxilo y otros, uracilos y citosinas 5-sustituidas con 5-trifluorometilo y otros, 7-metilguanina, pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina, dihidrouacilo, 3-desaza-5-azacitosina, 2-aminopurina, 5-alquiluracilo, 7-alquilguanina, 5-alquilcitosina, 7-desazaadenina, 7-desazaguanina, N6,N6-dimetiladenina, 2,6-diaminopurina, 5-amino-alil-uracilo, N3-metiluracilo, 1,2,4-triazoles sustituidos, 2-piridinona, 5-nitroindol, 3-nitropirrol, 5-metoxiuracilo, ácido uracil-5-oxiacético, 5-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 5-metoxicarbonilmetil-2-tiouracilo, 5-metilaminometil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uracilo, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N⁴-acetilcitosina, 2-tiocitosina, N6-metiladenina, N6-isopentiladenina, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, N-metilguaninas, o bases O-alquiladas.

R⁴, R⁵ y R⁶ son cada uno, independientemente, OR⁸, O(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂OR⁸; O(CH₂)_nR⁹; O(CH₂)_nOR⁹, H; halo; NH₂; NHR⁸; N(R⁸)₂; NH(CH₂CH₂NH)_mCH₂CH₂NHR⁹; NHC(O)R⁸; ciano; mercapto; SR⁸; alquil-tio-alquilo; alquilo, aralquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, alqueno, alquino, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con halo, hidroxilo, oxo, nitro, haloalquilo, alquilo, alcarilo, arilo, aralquilo, alcoxi, ariloxi, amino, alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino, acilamino, alquilcarbamoilo, arilcarbamoilo, aminoalquilo, alcocarbonilo, carboxi, hidroxialquilo, alcanosulfonilo, alcanosulfonamido, arenosulfonamido, aralquilsulfonamido, alquilcarbonilo, aciloxi, ciano, o ureido; o R⁴, R⁵ o R⁶ juntos combinan con R⁷ para formar un puente [-O-CH₂-] unido de forma covalente entre los carbonos 2' y 4' del azúcar.

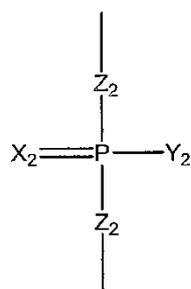
A¹ es:



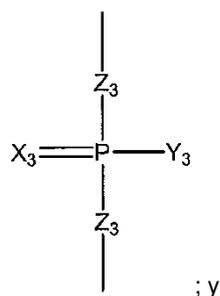
H; OH; OCH₃; W¹; un nucleótido abásico; o ausente;

(un A¹ preferido, especialmente con respecto a cadenas antisentido, se elige de 5'-monosofato ((HO)₂(O)P-O-5'), 5'-difosfato ((HO)₂(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'), 5'-trifosfato ((HO)₂(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'), casquete 5'-guanosina (7-metilado o no metilado) (7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-P-5'), casquete 5'-adenosina (A_{ppp}), y cualquier estructura de casquete de nucleótido modificado o no modificado (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'), 5'-monotiofosfato (fosfortioato; (HO)₂(S)P-O-5'), 5'-monoditiofosfato (fosforoditioato; (HO)(HS)(S)P-O-5'), 5'-fosfortiolato ((HO)₂(O)P-S-5'); cualquier combinación adicional de monosofato, difosfato y trifosfatos sustituidos con oxígeno/azufre (p.ej., 5'-alfa-tiotrifosfato, 5'-gamma-tiotrifosfato, etc.), 5'-fosforamidatos ((HO)₂(O)P-NH-5', (HO)(NH₂)(O)P-O-5', 5'-alquilfosfonatos (R=alquilo=metilo, etilo, isopropilo, propilo, etc., p.ej., RP(OH)(O)-O-5', (OH)₂(O)P-5'-CH₂-), 5'-alquileterfosfonatos (R=alquileter=metoximetilo (MeOCH₂-), etoximetilo, etc., p.ej., RP(OH)(O)-O-5')).

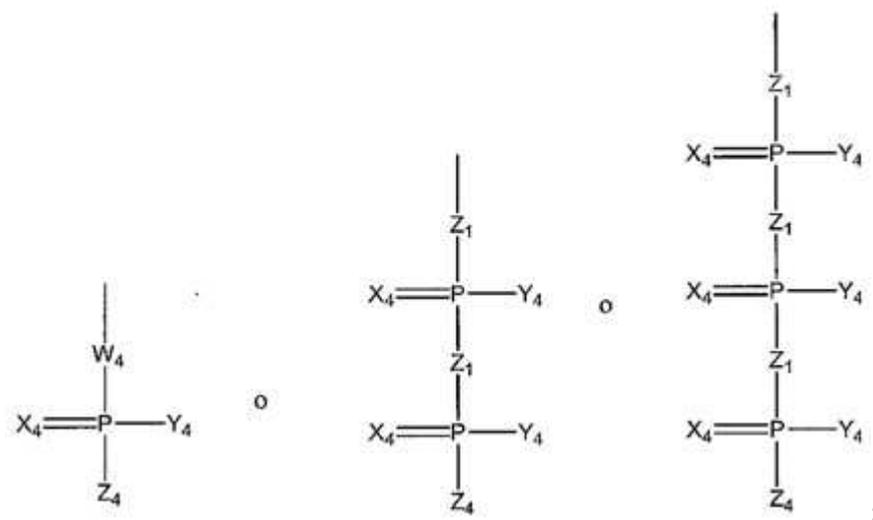
A² es:



A³ es:



A⁴ es:



5

H; Z⁴; un nucleótido invertido; un nucleótido abásico; o ausente.

W¹ es OH, (CH₂)_nR¹⁰, (CH₂)_nNHR¹⁰, (CH₂)_nOR¹⁰, (CH₂)_nSR¹⁰; O(CH₂)_nR¹⁰; O(CH₂)_nOR¹⁰, O(CH₂)_nNR¹⁰, O(CH₂)_nSR¹⁰; O(CH₂)_nSS(CH₂)_nOR¹⁰, O(CH₂)_nC(O)OR¹⁰, NH(CH₂)_nR¹⁰; NH(CH₂)_nNR¹⁰; NH(CH₂)_nOR¹⁰, NH(CH₂)_nSR¹⁰; S(CH₂)_nR¹⁰, S(CH₂)_nNR¹⁰, S(CH₂)_nOR¹⁰, S(CH₂)_nSR¹⁰, O(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂OR¹⁰; O(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂NHR¹⁰, NH(CH₂CH₂NH)_mCH₂CH₂NHR¹⁰; Q-R¹⁰, O-Q-R¹⁰, N-Q-R¹⁰, S-Q-R¹⁰ o -O-. W⁴ es O, CH₂, NH o S.

10

X¹, X², X³, y X⁴ son cada uno, independientemente, O o S.

Y¹, Y², Y³, e Y⁴ son cada uno, independientemente, OH, O⁻, OR⁸, S, Se, BH₃⁻, H, NHR⁹, N(R⁹)₂, alquilo, cicloalquilo, aralquilo, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.

15

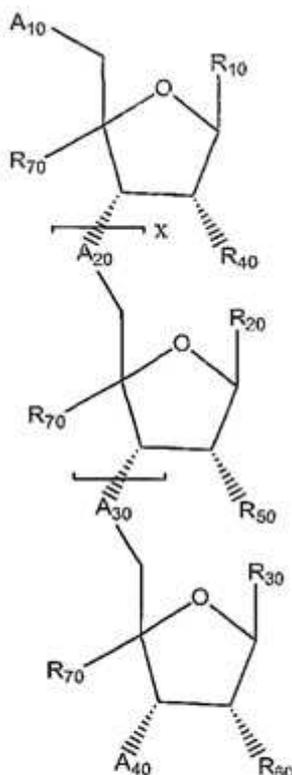
Z¹, Z², y Z³ son cada uno independientemente O, CH₂, NH o S. Z⁴ es OH, (CH₂)_nR¹⁰, (CH₂)_nNHR¹⁰, (CH₂)_nOR¹⁰, (CH₂)_nSR¹⁰; O(CH₂)_nR¹⁰; O(CH₂)_nOR¹⁰, O(CH₂)_nNR¹⁰, O(CH₂)_nSR¹⁰, O(CH₂)_nSS(CH₂)_nOR¹⁰, O(CH₂)_nC(O)OR¹⁰; NH(CH₂)_nR¹⁰; NH(CH₂)_nNR¹⁰; NH(CH₂)_nOR¹⁰, NH(CH₂)_nSR¹⁰; S(CH₂)_nR¹⁰, S(CH₂)_nNR¹⁰, S(CH₂)_nOR¹⁰, S(CH₂)_nSR¹⁰, O(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂OR¹⁰, O(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂NHR¹⁰, NH(CH₂CH₂NH)_mCH₂CH₂NHR¹⁰; Q-R¹⁰, O-Q-R¹⁰, N-Q-R¹⁰, S-Q-R¹⁰.

x es 5-100, elegido para cumplir con una longitud para un agente de ARN descrito en la presente memoria.

R⁷ es H; o se combina con R⁴, R⁵ o R⁶ para formar un puente [-O-CH₂-] unido de forma covalente entre los carbonos 2' y 4' del azúcar.

R⁸ es alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo, heteroarilo, aminoácido, o azúcar; R⁹ es NH₂, alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino, o aminoácido; y R¹⁰ es H; 5 fluoróforo (pireno, TAMRA, fluoresceína, tintes Cy3 o Cy5); azufre, silicio, boro o grupo protector éster; agente de intercalado (p.ej., acridinas), agentes de reticulado (p.ej., psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, Safirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (p.ej., fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificiales (p.ej., EDTA), vehículos lipófilos (colesterol, ácido cólico, ácido adamantanoacético, ácido 1-pirenobutírico, dihidrotestosterona, 1,3-bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geranilohexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritilo o fenoxazina) y conjugados peptídicos (p.ej., péptido antennapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (p.ej., PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, poli-amino; alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo; marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (p.ej., biotina), facilitadores de transporte/absorción (p.ej., aspirina, vitamina E, ácido fólico), ribonucleasas sintéticas (p.ej., imidazol, bisimidazol, histamina, agrupaciones de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complejos de Eu³⁺ de tetraazamacrociclos); o un agente de ARN. m es 0-1.000.000, y n es 0-20. Q es un espaciador seleccionado del grupo que consiste en azúcar abásica, amida, carboxi, oxiamina, oxiimina, tioéter, disulfuro, tiourea, sulfonamida o morfolino, reactivos de biotina o fluoresceína.

Los agentes de ARN preferidos en que el grupo fosfato entero se ha sustituido tienen la siguiente estructura (véase la Fórmula 3 posterior): 20



FÓRMULA 3

En referencia a la Fórmula 3, A¹⁰-A⁴⁰ es L-G-L; A¹⁰ y/o A⁴⁰ pueden estar ausentes, en que L es un conector, en el que uno de ambos L pueden estar presentes o ausentes y se selecciona del grupo que consiste en CH₂(CH₂)_g; N(CH₂)_g; O(CH₂)_g; S(CH₂)_g. G es un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en siloxano, carbonato, carboximetilo, carbamato, amida, tioéter, conector de óxido de etileno, sulfonato, sulfonamida, tioformacetal, formacetal, oxima, metilenimino, metilenometilimino, metilenoimidazo, metilenodimetilhidrazo y metilenoimidilimino. 25

R¹⁰, R²⁰ y R³⁰ son cada uno, independientemente, H, (es decir, nucleótidos abásicos), adenina, guanina, citosina y uracilo, inosina, timina, xantina, hipoxantina, nubularina, tubercidina, isoguanisina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros

derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 5-halouracilo, 5-(2-aminopropil)uracilo, 5-aminoaliluracilo, adeninas y guaninas 8-sustituidas con 8-halo, amino, tiol, tioalquilo, hidroxilo y otros, uracilos y citosinas 5-sustituidas con 5-trifluorometilo y otros, 7-metilguanina, pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina, dihidrouracilo, 3-desaza-5-azacitosina, 2-aminopurina, 5-alquiluracilo, 7-alquilguanina, 5-alquilcitosina, 7-desazaadenina, 7-desazaguanina, N6,N6-dimetiladenina, 2,6-diaminopurina, 5-amino-alil-uracilo, N3-metiluracilo, 1,2,4-triazoles sustituidos, 2-piridinona, 5-nitroindol, 3-nitropirrol, 5-metoxiuracilo, ácido uracil-5-oxiacético, 5-metoxycarbonilmetiluracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 5-metoxycarbonilmetil-2-tiouracilo, 5-metilaminometil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uracilo, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N⁴-acetilcitosina, 2-tiocitosina, N6-metiladenina, N6-isopentiladenina, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, N-metilguaninas, o bases O-alquiladas.

R⁴⁰, R⁵⁰ y R⁶⁰ son cada uno, independientemente, OR⁸, O(CH₂CH₂O)_mCH₂CH₂OR⁸; O(CH₂)_nR⁹; O(CH₂)_nOR⁹, H; halo; NH₂; NHR⁸; N(R⁸)₂; NH(CH₂CH₂NH)_mCH₂CH₂R⁹; NHC(O)R⁸; ciano; mercapto; SR⁷; alquil-tio-alquilo; alquilo, aralquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquenilo, alquinilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con grupos halo, hidroxilo, oxo, nitro, haloalquilo, alquilo, alcarilo, arilo, aralquilo, alcoxi, ariloxi, amino, alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino, acilamino, alquilcarbamoilo, arilcarbamoilo, aminoalquilo, alcocixarbonilo, carboxi, hidroxialquilo, alcanosulfonilo, alcanosulfonamido, arenosulfonamido, aralquilsulfonamido, alquilcarbonilo, aciloxi, ciano, y ureido; o R⁴⁰, R⁵⁰ o R⁶⁰ juntos combinan con R⁷⁰ para formar un puente [-O-CH₂-] unido de forma covalente entre los carbonos 2' y 4' del azúcar.

x es 5-100, elegido para cumplir con una longitud para un agente de ARN descrito en la presente memoria.

R⁷⁰ es H; o se combina con R⁴⁰, R⁵⁰ o R⁶⁰ para formar un puente [-O-CH₂-] unido de forma covalente entre los carbonos 2' y 4' del azúcar.

R⁸ es alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heterociclilo, heteroarilo, aminoácido o azúcar; y R⁹ es NH₂, alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino o aminoácido. m es 0-1.000.000, n es 0-20 y g es 0-2.

Sustitutos de nucleósido preferidos tienen la siguiente estructura (véase la fórmula 4 posterior):



FÓRMULA 4

S es un sustituto de nucleósido seleccionado del grupo que consiste en mofilino, ciclobutilo, pirrolidina y ácido peptidonucleico. L es un conector y se selecciona del grupo que consiste en CH₂(CH₂)_g; N(CH₂)_g; O(CH₂)_g; S(CH₂)_g; -C(O)(CH₂)_n- o puede estar ausente. M es un enlace amida; sulfonamida; sulfinato; grupo fosfato; grupo fosfato modificado como se describe en la presente memoria; o puede estar ausente.

R¹⁰⁰, R²⁰⁰ y R³⁰⁰ son cada uno, independientemente, H (es decir, nucleótidos abásicos), adenina, guanina, citosina y uracilo, inosina, timina, xantina, hipoxantina, nubularina, tubercidina, isoguanisina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 5-halouracilo, 5-(2-aminopropil)uracilo, 5-aminoaliluracilo, adeninas y guaninas 8-sustituidas con 8-halo, amino, tiol, tioalquilo, hidroxilo y otros, uracilos y citosinas 5-sustituidas con 5-trifluorometilo y otros, 7-metilguanina, pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina, dihidrouracilo, 3-desaza-5-azacitosina, 2-aminopurina, 5-alquiluracilo, 7-alquilguanina, 5-alquilcitosina, 7-desazaadenina, 7-desazaguanina, N6,N6-dimetiladenina, 2,6-diaminopurina, 5-amino-alil-uracilo, 1,2,4-triazoles sustituidos con N3-metiluracilo, 2-piridinonas, 5-nitroindol, 3-nitropirrol, 5-metoxiuracilo, ácido uracil-5-oxiacético, 5-metoxycarbonilmetiluracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 5-metoxycarbonilmetil-2-tiouracilo, 5-metilaminometil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uracilo, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N⁴-acetilcitosina, 2-tiocitosina, N6-metiladenina, N6-isopentiladenina, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, N-metilguaninas, o bases O-alquiladas.

x es 5-100, o elegido para cumplir con una longitud para un agente de ARN descrito en la presente memoria; y g es 0-2.

Monómeros resistentes a la nucleasa

Los monómeros y métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para preparar un ARN, p.ej., un agente de ARNi, que incorpora un monómero resistente a la nucleasa (NRM), tal como los descritos en la presente memoria y los descritos en la Solicitud Provisional de Estados Unidos en copropiedad y en tramitación con la presente núm. de serie 60/469.612, presentada el 9 de mayo de 2003, y la Solicitud Internacional núm. PCT/US04/07070.

Un agente de ARNi puede incluir monómeros que se han modificado para así inhibir la degradación, p.ej., mediante nucleasas, p.ej., endonucleasas o exonucleasas, encontradas en el cuerpo de un sujeto. Estos monómeros se denominan en la presente memoria como NRM, o monómeros o modificaciones que promueven la resistencia a la nucleasa. En muchos casos estas modificaciones modularán otras propiedades del agente de ARNi además, p.ej., la

5

capacidad de interactuar con una proteína, p.ej., una proteína de transporte, p.ej., albúmina sérica, o un miembro del RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN), o la capacidad de que la primera y segunda secuencia formen un fragmento doble la una con la otra o formar un fragmento doble con otra secuencia, p.ej., una molécula diana.

Aunque sin desear estar atados por la teoría, se cree que las modificaciones del azúcar, base y/o estructura de fosfato en un agente de ARNi puede mejorar la resistencia a la endonucleasa y exonucleasa, y puede mejorar las interacciones con proteínas transportadoras y uno o más de los componentes funcionales del complejo RISC. Las modificaciones preferidas son las que aumentan la resistencia a la exonucleasa y endonucleasa y por consiguiente prolongan la vida media del agente de ARNi antes de la interacción con el complejo RISC, aunque al mismo tiempo no vuelven al agente de ARNi resistente a la actividad de endonucleasas en el complejo RISC. De nuevo, aunque sin desear estar atados por ninguna teoría, se cree que la posición de las modificaciones en o cerca del extremo 3' y/o 5' de las cadenas antisentido puede dar por resultado agentes de ARNi que cumplen los criterios de resistencia a la nucleasa preferidos delineados anteriormente. De nuevo, aún sin desear estar atados por ninguna teoría, se cree que la posición de las modificaciones en p.ej., la mitad de una cadena homosenrido puede dar por resultado agentes de ARNi que es relativamente menos probable que experimenten inespecificidad.

10

15

Las modificaciones descritas en la presente memoria pueden incorporarse en cualquier ARN bicatenario y molécula tipo ARN descrita en la presente memoria, p.ej., un agente de ARNi. Un agente de ARNi puede incluir un fragmento doble que comprende una cadena homosenrido y antisentido hibridada, en que la cadena antisentido y/o la cadena homosenrido pueden incluir una o más de las modificaciones descritas en la presente memoria. La cadena antisentido incluye modificaciones en el extremo 3' y/o el extremo 5' y/o en una o más posiciones que se dan a 1-6 (p.ej., 1-5, 1-4, 1-3, 1-2) nucleótidos desde cualquier extremo de la cadena. La cadena homosenrido puede incluir modificaciones en el extremo 3' y/o el extremo 5' y/o en cualquiera de las posiciones intermedias entre los dos extremos de la cadena. El agente de ARNi puede además incluir un fragmento doble que comprende dos cadenas antisentido hibridadas. La primera y/o segunda cadena antisentido puede incluir una o más de las modificaciones descritas en la presente memoria. Por consiguiente, una y/o ambas cadenas antisentido pueden incluir modificaciones en el extremo 3' y/o el extremo 5' y/o en una o más posiciones que se dan 1-6 (p.ej., 1-5, 1-4, 1-3, 1-2) nucleótidos desde cualquier extremo de la cadena. Las configuraciones particulares se tratan a continuación.

20

25

30

Las modificaciones que pueden ser útiles para producir agentes de ARNi que cumplen los criterios de resistencia a la nucleasa preferidos delineados anteriormente pueden incluir una o más de las siguientes modificaciones químicas y/o estereoquímicas del azúcar, base y/o estructura de fosfato:

35

(i) tioatos quirales (S_P). Por consiguiente, los NRMs incluyen dímeros de nucleótido con una enriquecida o pura para una forma quiral particular de un grupo fosfato modificado que contiene un heteroátomo en la posición que no es puente, p.ej., S_P o R_P , en la posición X, donde esta es la posición ocupada normalmente por el oxígeno. El átomo en X puede ser también S, Se, Nr_2 o Br_3 . Cuando X es S, se prefiere la unión S_P enriquecida o quiralmente pura. Enriquecida significa al menos 70, 80, 90, 95 o 99% de la forma preferida. Dichas NRMs se tratan en más detalle a continuación;

40

(ii) unión de uno o más grupos catiónicos al azúcar, base y/o el átomo de fósforo de un fosfato o un resto de estructura de fosfato modificada. Por consiguiente, los NRMs preferidos incluyen monómeros en la posición terminal derivada a un grupo catiónico. Como el extremo 5' de una secuencia antisentido tendría un -OH terminal o grupo fosfato este NRM preferiblemente no se usa en el extremo 5' de una secuencia antisentido. El grupo estaría unido a una posición en la base que minimiza la interferencia con la formación de enlaces de H y la hibridación, p.ej., lejos del lado que interactúa con la base complementaria en la otra cadena, p.ej., en la posición 5' de una pirimidina o una posición 7 de una purina. Estos se tratan en más detalle a continuación;

45

(iii) uniones no fosfato en el extremo. Por consiguiente, los NRMs preferidos incluyen uniones no fosfato, p.ej., una unión de 4 átomos que dan mayor resistencia a la escisión que un enlace fosfato. Los ejemplos incluyen 3' $CH_2-NCH_3-O-CH_2-5'$ y 3' $CH_2-NH-(O=)-CH_2-5'$;

50

(iv) tiofosfatos en puente 3' y tiofosfatos en puente 5'. Por consiguiente, los NRMs preferidos pueden incluir estas estructuras;

(v) L-ARN, uniones 2'-5', uniones invertidas, a-nucleósidos. Por consiguiente, otros NRMs preferidos incluyen: L nucleósidos y nucleótidos diméricos derivados de L-nucleósidos, uniones 2'-5' fosfato, no fosfato y fosfato modificado (p.ej., tiofosfatos, fosforamidatos y boronofosfatos); dímeros que tienen uniones invertidas, p.ej., uniones 3'-3' o 5'-5'; monómeros que tienen una unión alfa en el sitio 1' en el azúcar; p.ej., las estructuras descritas en la presente memoria que tienen una unión alfa;

55

(vi) grupos conjugados. Por consiguiente, los NRM preferidos pueden incluir p.ej., un resto de direccionamiento o un ligando conjugado descrito en la presente memoria conjugado con el monómero, p.ej., a través del azúcar, base o estructura;

5 (vi) uniones abásicas. Por consiguiente, los NRM preferidos pueden incluir un monómero abásico, p.ej., un monómero abásico como se describe en la presente memoria (p.ej., un monómero sin nucleobase); un monómero aromático o heterocíclico o aromático poliheterocíclico como se describe en la presente memoria; y

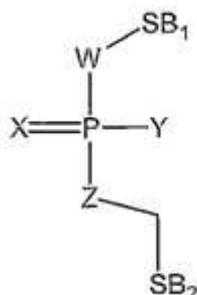
10 (vii) profármacos 5'-fosfonatos y 5'-fosfato. Por consiguiente, los NRM preferidos incluyen monómeros, preferiblemente en la posición terminal, p.ej., la posición 5', en que uno o más átomos del grupo fosfato está derivado con un grupo protector, cuyo grupo o grupos protectores, se eliminan como resultado de la acción de un componente en el cuerpo del sujeto, p.ej., una carboxiesterasa o una enzima presente en el cuerpo del sujeto. P.ej., un profármaco fosfato en que una carboxiesterasa escinde la molécula protegida dando por resultado la producción de un anión tioato que ataca a un carbono adyacente al O de un fosfato y da por resultado la producción de un fosfato desprotegido.

15 Una o más modificaciones de NRM pueden introducirse en un agente de ARNi o en una secuencia de un agente de ARNi. Una modificación de NRM puede usarse más de una vez en una secuencia o en un agente de ARNi. Como algunos NRM interfieren con la hibridación el número total incorporado, debería ser con el que se mantengan los niveles aceptables de formación de fragmento doble de agente de ARNi.

20 En algunas realizaciones las modificaciones de NRM se introducen en el extremo del sitio de escisión o en la región de escisión de una secuencia (una cadena o secuencia homosentido) que no tiene como objetivo una secuencia o gen deseado en el sujeto. Esto puede reducir el silenciamiento inespecífico.

Tioatos quirales S_P

Una modificación puede incluir una alteración, p.ej., sustitución, de uno o ambos de los oxígenos del fosfato sin enlace (X e Y) y/o de uno o más de los oxígenos del fosfato con enlace (W y Z). La fórmula X posterior representa un resto fosfato que se une a dos restos de azúcar/sustituto de azúcar-base, SB_1 y SB_2 .

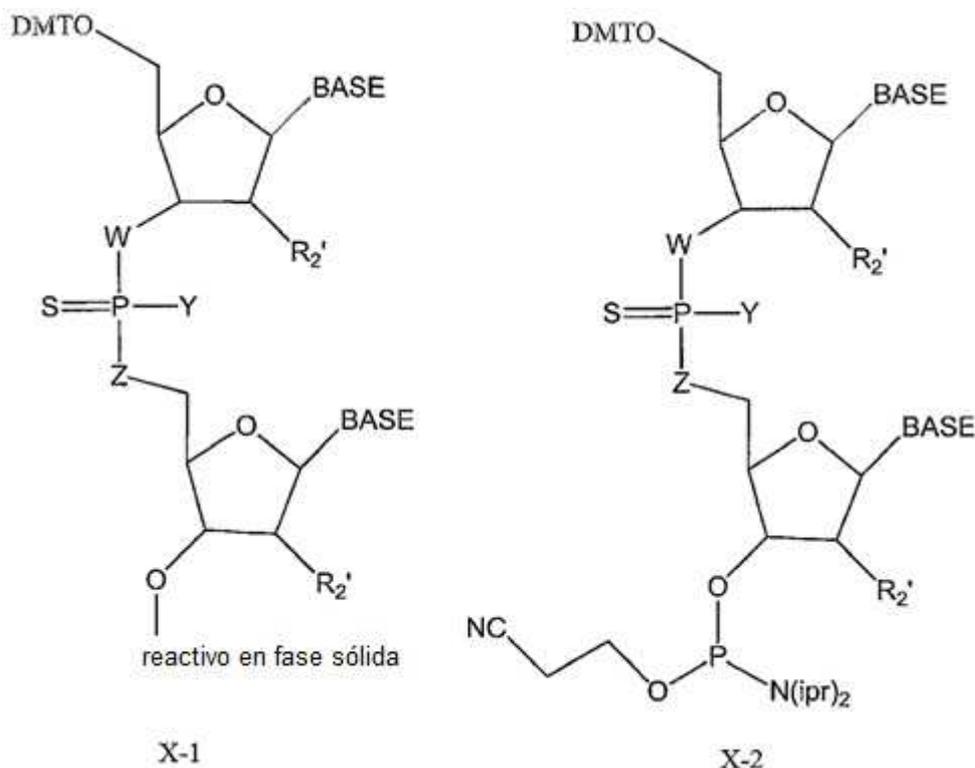


FÓRMULA X

25 En ciertas realizaciones, uno de los oxígenos del fosfato sin enlace en el resto de la estructura fosfato (X e Y) pueden sustituirse por cualquiera de los siguientes: S, Se, BR_3 (R es hidrógeno, alquilo, arilo, etc.), C (es decir, un grupo alquilo, un grupo arilo, etc.), H, NR_2 (R es hidrógeno, alquilo, arilo, etc.) u OR (R es alquilo o arilo). El átomo de fósforo en un grupo fosfato no modificado es aquiral. Sin embargo, la sustitución de uno de los oxígenos sin enlace con uno de los átomos o grupos de átomos anteriores vuelven quiral al átomo de fósforo; en otras palabras un átomo de fósforo en un grupo fosfato modificado de esta forma es un centro estereogénico. El átomo de fósforo estereogénico puede poseer o bien la configuración "R" (en la presente memoria R_P) o la configuración "S" (en la presente memoria S_P). Por consiguiente, si el 60% de la población de átomos de fósforo estereogénicos tienen la configuración R_P , entonces el 40% restante de la población de átomos de fósforo estereogénicos tienen la configuración S_P .

30 En algunas realizaciones, los agentes de ARNi, que tienen grupos fosfato en que un oxígeno sin enlace del fosfato se ha sustituido por otro átomo o grupo de átomos, pueden contener una población de átomos de fósforo estereogénicos en que al menos aproximadamente el 50% de estos átomos (p.ej., al menos aproximadamente el 60% de estos átomos, al menos aproximadamente el 70% de estos átomos, al menos aproximadamente el 80% de estos átomos, al menos el 90% de estos átomos, al menos aproximadamente el 95% de estos átomos, al menos aproximadamente el 98% de estos átomos, al menos aproximadamente el 99% de estos átomos) tienen la configuración S_P . De forma alternativa, los agentes de ARNi que tienen grupos fosfato en que un oxígeno sin enlace del fosfato se ha sustituido por otro átomo o grupo de átomos pueden contener una población de átomos de fósforo estereogénicos en que al menos aproximadamente el 50% de estos átomos (p.ej., al menos aproximadamente el

- 60% de estos átomos, al menos aproximadamente el 70% de estos átomos, al menos aproximadamente el 80% de estos átomos, al menos aproximadamente el 90% de estos átomos, al menos aproximadamente el 95% de estos átomos, al menos aproximadamente el 98% de estos átomos, al menos aproximadamente el 99% de estos átomos) tienen la configuración R_P . En otras realizaciones, la población de átomos de fósforo estereogénicos puede tener la configuración S_P y puede estar esencialmente libre de átomos de fósforo estereogénicos que tienen la configuración R_P . En aún otras realizaciones, la población de átomos de fósforo estereogénico pueden tener la configuración R_P y puede estar esencialmente libre de átomos de fósforo estereogénico que tienen la configuración S_P . Como se usa en la presente memoria, la frase "esencialmente libre de átomos de fósforo estereogénico que tienen la configuración R_P " significa que los restos que contienen átomos de fósforo estereogénicos que tienen la configuración R_P no pueden detectarse por métodos convencionales conocidos en la técnica (HPLC quiral, análisis de 1H NRM que usan reactivos de desplazamiento quirales, etc.). Como se usa en la presente memoria, la frase "esencialmente libre de átomos de fósforo estereogénico que tienen la configuración S_P " significa que los restos que contienen los átomos de fósforo estereogénico que tienen la configuración S_P no pueden detectarse por métodos convencionales conocidos en la técnica (HPLC quiral, análisis de 1H NRM que usa reactivos de desplazamiento quirales, etc.).
- En una realización preferida, los agentes de ARNi modificados contienen un grupo fosforotioato, es decir, unos grupos fosfato en que un oxígeno sin enlace del fosfato se ha sustituido por un átomo de azufre. En una realización especialmente preferida, la población de átomos de fósforo estereogénico de fosforotioato puede tener la configuración S_P y estar esencialmente libre de átomos de fósforo estereogénicos que tienen la configuración R_P .
- Los fosforotioatos pueden incorporarse en los agentes de ARNi usando dímeros, p.ej., fórmula X-1 y X-2. El primero puede usarse para introducir el fosforotioato



- en el extremo 3' de una cadena, mientras que el último puede usarse para introducir esta modificación en el extremo 5' o en una posición que se da p.ej., en los nucleótidos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de cualquier extremo de la cadena. En las fórmulas anteriores, Y puede ser 2-cianoetoxi, W y Z pueden ser O, R₂ puede ser, p.ej., un sustituyente que puede dar la configuración C-3 endo al azúcar (p.ej., OH, F, OCH₃), DMT es dimetoxitritilo, y "BASE" puede ser una base natural, inusual o una universal.

- X-1 y X-2 pueden prepararse usando reactivos quirales o dirigiendo grupos que pueden dar por resultado dímeros que contienen fosforotioato que tienen una población de átomos de fósforo estereogénicos que tienen esencialmente solo la configuración R_P (es decir, que están esencialmente libres de la configuración S_P) o solo la configuración S_P (es decir, que están esencialmente libres de la configuración R_P). De forma alternativa, pueden prepararse dímeros que tienen una población de átomos de fósforo estereogénicos en que aproximadamente el 50% de los átomos que tienen la configuración R_P y aproximadamente el 50% de los átomos que tienen la configuración S_P . Los dímeros que tienen átomos de fósforo estereogénicos con la configuración R_P pueden identificarse y separarse de dímeros que tienen átomos de fósforo estereogénicos con la configuración S_P usando p.ej., la degradación enzimática y/o técnicas de cromatografía convencional.

Grupos catiónicos

- Las modificaciones pueden incluir también la unión de uno o más grupos catiónicos al azúcar, base y/o al átomo de fósforo de un fosfato o resto de la estructura fosfato modificada. Un grupo catiónico puede unirse a cualquier átomo capaz de sustitución en una base natural, inusual o universal. Una posición preferida es una que no interfiere con la hibridación, es decir, no interfiere con las interacciones de enlace de hidrógeno necesarias para el emparejamiento de bases. Un grupo catiónico puede unirse, p.ej., a través de la posición C2' de un azúcar o posición análoga en un sustituto de azúcar cíclico o acíclico. Los grupos catiónicos pueden incluir p.ej., grupos amino protonados, derivados de p.ej., O-AMINA (AMINA= NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, o diheteroarilamino, etilendiamino, poliamino); aminoalcoxi, p.ej., O(CH₂)_nAMINA, (p.ej., AMINA = NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, o diheteroarilamino, etilendiamina, poliamino); amino (p.ej., NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino o aminoácido); o NH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-AMINA (AMINA = NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino).

Uniones no fosfato

- Las modificaciones pueden incluir también la incorporación de uniones no fosfato al extremo 5' y/o 3' de una cadena. Los ejemplos de uniones no fosfato que pueden sustituir al grupo fosfato incluyen fosfonato de metilo, hidroxilamino, siloxano, carbonato, carboximetilo, carbamato, amida, tioéter, conector de óxido de etileno, sulfonato, sulfonamida, tioformacetal, formacetal, oxima, metilenimino, metilenoetilimino, metilenoimidazolo, metilenoimidazolo y metilenoimidazolo. Las sustituciones preferidas incluyen los grupos fosfonato de metilo e hidroxilamino.
- Tiofosfatos en puente 3' y iofosfatos en puente 5'; ARN bloqueado, uniones 2'-5', uniones invertidas, α-nucleósidos; grupos conjugados; uniones abásicas; y 5'-fosfonatos y profármacos 5'-fosfato.

- En referencia a la fórmula X anterior, las modificaciones pueden incluir la sustitución de uno de los oxígenos del fosfato en el puente o el enlace en el resto de la estructura fosfato (W y Z). A diferencia de la situación donde solo uno de X o Y está alterado, el centro de fósforo en los fosforoditioatos es aquiral lo que excluye la formación de agentes de ARNi que contengan un átomo de fósforo estereogénico.

- Las modificaciones pueden incluir también la unión de dos azúcares por medio de un grupo fosfato o fosfato modificado a través de la posición 2' de un primer azúcar y la posición 5' de un segundo azúcar. Además se contemplan uniones invertidas en que tanto el primer como el segundo azúcar están cada uno unidos a través de las respectivas posiciones 3'. Los ARN modificados pueden incluir también azúcares "abásicos", que carecen de una nucleobase en C-1'. El grupo azúcar puede contener también uno o más carbonos que poseen la configuración estereoquímica contraria de la del carbono correspondiente en la ribosa. Por consiguiente, un agente de ARNi modificado puede incluir nucleótidos que contienen p.ej., arabinosa, como el azúcar. En otro subconjunto de esta modificación, la base natural, inusual o universal pueden tener la configuración α. Las modificaciones pueden incluir también L-ARN.

- Las modificaciones pueden incluir también 5'-fosfonatos, p.ej., P(O)(O)₂-X-C^{5'}-azúcar (X = CH₂, CF₂, CHF y profármacos 5'-fosfato, p.ej., P(O)[OCH₂CH₂SC(O)R]₂CH₂C^{5'}-azúcar. En el último caso, los grupos profármaco pueden descomponerse por medio de reacción primero con carboxiesterasas. El grupo tiolato de etilo restante por medio de desplazamiento S_N2 intramolecular puede salir como episulfuro para proporcionar el grupo fosfato no derivado.

- La modificación puede incluir también la adición de grupos de conjugación descritos en otra parte de la presente memoria, que se unen preferiblemente a un agente de ARNi a través de un grupo amino disponible para la conjugación.

- Las modificaciones resistentes a la nucleasa incluyen algunas que pueden situarse solo en el extremo y otras que pueden ir a cualquier posición. Generalmente las modificaciones que pueden inhibir la hibridación así es preferible usarlas solo en regiones terminales, y preferible no usarlas en el sitio de escisión o en la región de escisión de una secuencia que tiene como objetivo una secuencia o gen. El puede usarse en cualquier sitio en una secuencia homocentido, con tal que se mantenga la suficiente hibridación entre las dos secuencias del agente de ARNi. En algunas realizaciones es deseable poner el NRM en el sitio de escisión o en la región de escisión de una secuencia que no tiene como objetivo una secuencia o gen, ya que puede minimizar el silenciamiento inespecífico.

- Además, un agente de ARNi descrito en la presente memoria puede tener un saliente que no forma una estructura doble con la otra secuencia del agente de ARNi – es un saliente, pero hibrida, o bien consigo mismo, o con otro ácido nucleico, distinto de la otra secuencia del agente de ARNi.

- En la mayoría de casos, las modificaciones que promueven la resistencia a la nucleasa se distribuirán de forma diferente dependiendo de si la secuencia tendrá como objetivo una secuencia en el sujeto (a menudo denominada como secuencia antisentido) o no tendrá como objetivo una secuencia en el sujeto (a menudo denominada como una secuencia homocentido). Si una secuencia a va tener como objetivo una secuencia en el sujeto, las modificaciones que interfieren con o inhiben la escisión de endonucleasa no deberían insertarse en la región que es

- el objeto de la escisión mediada por RISC, p.ej., el sitio de escisión o la región de escisión (Como se describe en Elbashir *et al.*, 2001, Genes and Dev. 15:188, la escisión de la diana se da aproximadamente en la mitad de un ARN guía de 20 o 21 nt, o aproximadamente en los 10 u 11 nucleótidos corriente arriba del primer nucleótido que es complementario a la secuencia guía. Como se usa en la presente memoria el sitio de escisión se refiere al nucleótido a cada lado del sitio de escisión, en la diana o en la cadena del agente de ARNi que hibrida con ella. La región de escisión indica un nucleótido a 1, 2 o 3 nucleótidos del sitio de escisión, en cualquier dirección).
- 5 Dichas modificaciones pueden introducirse en las regiones terminales, p.ej., en la posición terminal o a 2, 3, 4, o 5 posiciones del extremo, de una secuencia que tiene como objetivo o una secuencia que no tiene como objetivo una secuencia en el sujeto.
- 10 Un agente de ARNi puede tener una primera y una segunda cadena elegida de las siguientes:
- Una primera cadena que no tiene como objetivo una secuencia y que tiene una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 3';
- Una primera cadena que no tiene como objetivo una secuencia y que tiene una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 5';
- 15 Una primera cadena que no tiene como objetivo una secuencia y que tiene una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 3' y que tiene una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 5';
- Una primera cadena que no tiene como objetivo una secuencia y que tiene una modificación de NRM en el sitio de escisión o en la región de escisión;
- 20 Una primera cadena que no tiene como objetivo una secuencia y que tiene una modificación de NRM en el sitio de escisión o en la región de escisión y una o más de una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 3', una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 5', o modificaciones de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones tanto del extremo 3' como del 5'; y
- 25 Una segunda cadena que tiene como objetivo una secuencia y que tiene una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 3';
- Una segunda cadena que tiene como objetivo una secuencia y que tiene una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 5' (las modificaciones de NRM del extremo 5' preferentemente no están en el extremo sino a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 5' de una cadena antisentido);
- 30 Una segunda cadena que tiene como objetivo una secuencia y que tiene una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 3' y que tiene una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 5';
- Una segunda cadena que tiene como objetivo una secuencia y que preferiblemente no tiene una modificación de NRM en el sitio de escisión o en la región de escisión;
- 35 Una segunda cadena que tiene como objetivo una secuencia y que no tiene una modificación de NRM en el sitio de escisión o en la región de escisión y una o más de una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 3', una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 5', o modificaciones de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones tanto del extremo 3' como del 5' (las modificaciones de NRM del extremo 5' preferentemente no están en el extremo sino a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 5' de una cadena antisentido).
- 40 Un agente de ARNi puede también tener como objetivo dos secuencias y puede tener una primera y segunda cadena elegidas de:
- Una primera cadena que tiene como objetivo una secuencia y que tiene una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 3';
- 45 Una primera cadena que tiene como objetivo una secuencia y que tiene una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 5' (las modificaciones de MNR del extremo 5' preferentemente no están en el extremo sino a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 5' de una cadena antisentido);
- Una primera cadena que tiene como objetivo una secuencia y que tiene una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 3' y que tiene una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 5';
- Una primera cadena que tiene como objetivo una secuencia y que preferiblemente no tiene una modificación de NRM en el sitio de escisión o en la región de escisión;
- 50 Una primera cadena que tiene como objetivo una secuencia y cuya dosis no tiene una modificación de NRM en el sitio de escisión o en la región de escisión y uno o más de una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6

posiciones del extremo 3', una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 5' o modificaciones de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones tanto del extremo 3' como 5' (las modificaciones de NRM del extremo 5' preferentemente no están en el extremo sino a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 5' de una cadena antisentido) y

- 5 Una segunda cadena que tiene como objetivo una secuencia y que tiene una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 3';

Una segunda cadena que tiene como objetivo una secuencia y que tiene una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 5' (las modificaciones de NRM del extremo 5' preferentemente no están en el extremo sino a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 5' de una cadena antisentido);

- 10 Una segunda cadena que tiene como objetivo una secuencia y que tiene una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 3' y que tiene una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 5';

Una segunda cadena que tiene como objetivo una secuencia y que preferiblemente no tiene una modificación de NRM en el sitio de escisión o en la región de escisión;

- 15 Una segunda cadena que tiene como objetivo una secuencia y cuya dosis no tiene una modificación de NRM en el sitio de escisión o en la región de escisión y una o más de una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 3', una modificación de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 5', o modificaciones de NRM en o a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones tanto del extremo 3' como 5' (las modificaciones de NRM del extremo 5' preferentemente no están en el extremo sino a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo 5' de una cadena antisentido).
- 20

Miméticos de ribosa

Los monómeros y métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para preparar un ARN, p.ej., un agente de ARNi, que incorpora un mimético de ribosa, tal como los descritos en la presente memoria y los descritos en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos en copropiedad y en tramitación con la presente núm. de serie 60/454.962, presentada el 13 de marzo de 2003, y la Solicitud internacional núm. PCT/US04/07070.

25

Por consiguiente, se describe en la presente memoria un agente de ARNi que incluye un grupo hidroxilo secundario, que puede aumentar la eficacia y/o conferir resistencia a la nucleasa al agente. Las nucleasas, p.ej., nucleasas celulares, pueden hidrolizar los enlaces fosfodiéster del ácido nucleico, dando por resultado la degradación parcial o completa del ácido nucleico. El grupo hidroxilo secundario confiere resistencia a la nucleasa a un agente de ARNi volviendo al agente de ARNi menos propenso a la degradación con nucleasa respecto a un ARNi que carece de la modificación. Aunque sin desear estar atado por la teoría, se cree que la presencia de un grupo hidroxilo secundario en el agente de ARNi puede actuar como un mimético estructural de un grupo hidroxilo de 3' ribosa, provocando así que sea menos susceptible a la degradación.

30

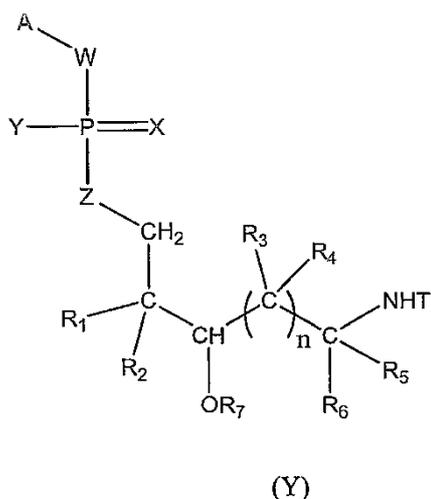
El grupo hidroxilo secundario se refiere a un radical "OH" que está unido a un átomo de carbono sustituido por otros dos carbonos y un hidrógeno. El grupo hidroxilo secundario que confiere resistencia a la nucleasa como se describe anteriormente puede ser parte de cualquier grupo que contenga un carbono acíclico. El hidroxilo puede ser también parte de cualquier grupo que contenga un carbono cíclico, y preferiblemente se cumple una o más de las siguientes condiciones (1) no hay resto ribosa entre el grupo hidroxilo y el grupo fosfato terminal o (2) el grupo hidroxilo no está en un resto azúcar que está acoplado a una base. El grupo hidroxilo está situado a al menos dos enlaces (p.ej., a al menos tres enlaces, a al menos cuatro enlaces, a al menos cinco enlaces, a al menos seis enlaces, a al menos siete enlaces, a al menos ocho enlaces, a al menos nueve enlaces, a al menos diez enlaces, etc.) del fósforo del grupo fosfato terminal del agente de ARNi. En realizaciones preferidas, hay cinco enlaces intermedios entre el fósforo del grupo fosfato terminal y el grupo hidroxilo secundario.

35

40

Los módulos de distribución del agente de ARNi preferidos con cinco enlaces intermedios entre el fósforo del grupo fosfato terminal y el grupo hidroxilo secundario tienen la siguiente estructura (véase la fórmula Y posterior):

45



En referencia a la fórmula Y, A es un agente de ARNi, que incluye cualquier agente de ARNi descrito en la presente memoria. El agente de ARNi puede estar conectado directamente o indirectamente (p.ej., a través de un espaciador o conector) a "W" del grupo fosfato. Estos espaciadores o conectores pueden incluir p.ej., $-(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nN-$, $-(CH_2)_nO-$, $-(CH_2)_nS-$, $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OH$ (p.ej., $n = 3$ o 6), azúcares abásicos, amida, carboxi, amina, oxiamina, oxiimina, tioéter, disulfuro, tiourea, sulfonamida o morfolino, o reactivos de biotina y fluoresceína.

Los agentes de ARNi pueden tener un grupo fosfato terminal que no está modificado (p.ej., W, X, Y, y Z son O) o modificado. En un grupo fosfato modificado, W y Z pueden ser independientemente NH, O, o S; y X e Y pueden ser independientemente S, Se, BH_3^- , alquilo C_1-C_6 , arilo C_6-C_{10} , H, O, O^- , alcoxi o amino (que incluyen alquilamino, arilamino, etc.). Preferiblemente, W, X y Z son O e Y es S.

R_1 y R_3 son cada uno, independientemente, hidrógeno; o alquilo C_1-C_{100} , opcionalmente sustituidos con hidroxilo, amino, halo, fosfato o sulfato y/o pueden estar opcionalmente insertados con N, O, S, alquenilo o alquinilo.

R_2 es hidrógeno; alquilo C_1-C_{100} , opcionalmente sustituido con hidroxilo, amino, halo, fosfato o sulfato y/o puede estar opcionalmente insertado con N, O, S, alquenilo o alquinilo; o cuando n es 1, R_2 puede tomarse con R_4 o R_6 para formar un anillo de 5-12 átomos.

R_4 es hidrógeno; alquilo C_1-C_{100} , opcionalmente sustituido con hidroxilo, amino, halo, fosfato o sulfato y/o puede estar opcionalmente insertado con N, O, S, alquenilo o alquinilo; o, cuando n es 1, R_4 puede tomarse con R_2 o R_5 para formar un anillo de 5-12 átomos.

R_5 es hidrógeno, alquilo C_1-C_{100} opcionalmente sustituido con hidroxilo, amino, halo, fosfato o sulfato y/o puede estar opcionalmente insertado con N, O, S, alquenilo o alquinilo; o, cuando n es 1, R_5 puede tomarse con R_4 para formar un anillo de 5-12 átomos.

R_6 es hidrógeno, alquilo C_1-C_{100} , opcionalmente sustituido con hidroxilo, amino, halo, fosfato o sulfato y/o puede estar opcionalmente insertado con N, O, S, alquenilo o alquinilo, o, cuando n es 1, R_6 puede tomarse con R_2 para formar un anillo de 6-10 átomos;

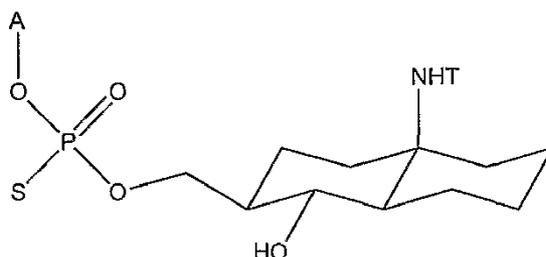
R_7 es hidrógeno, alquilo C_1-C_{100} , o $C(O)(CH_2)_qC(O)NHR_8$; T es hidrógeno o un grupo funcional; n y q son cada uno independientemente 1-100; R_8 es alquilo C_1-C_{10} o arilo C_6-C_{10} ; y R_9 es hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , arilo C_6-C_{10} o un agente de soporte sólido.

Las realizaciones preferidas pueden incluir uno de más de los siguientes subconjuntos de módulos de distribución del agente de ARNi.

En un subconjunto de módulos de distribución de agente de ARNi, A puede conectarse directamente o indirectamente a través del carbono del azúcar ribosa 3' o 5' terminal del agente de ARNi.

En otro subconjunto de módulos de distribución del agente de ARNi, X, W, y Z u O e Y es S.

En aún otro subconjunto de módulos de distribución del agente de ARNi, n es 1, y R_2 y R_6 se toman juntos para formar un anillo que contiene seis átomos y R_4 y R_5 se toman juntos para formar un anillo que contiene seis átomos. Preferiblemente, el sistema anular es una *trans*-decalina. Por ejemplo, el módulo de distribución del agente de ARNi de este subconjunto puede incluir un compuesto de Fórmula (Y-1):



El grupo funcional puede ser, por ejemplo, un grupo de direccionamiento (p.ej., un esteroide o un carbohidrato), un grupo indicador (p.ej., un fluoróforo), o una marca (un resto marcado isotópicamente). El grupo de direccionamiento puede incluir además agentes de unión a proteínas, grupos de direccionamiento a células endoteliales (p.ej., péptidos y miméticos RGD), grupos de direccionamiento a células cancerígenas (p.ej., folato, vitamina B12, biotina), grupos de direccionamiento a células óseas (p.ej., bisfosfonatos, poliglutamatos, poliaspartatos), manosa multivalente, (p.ej., pruebas de macrófagos), lactosa, galactosa, N-acetil-galactosamina, anticuerpos monoclonales, glucoproteínas, lectinas, melanotropina o tirotrópina.

Como puede apreciarse por un experto, los métodos de sintetizado de los compuestos de las fórmulas en la presente memoria serán evidentes para los expertos en la técnica. Los compuestos sintetizados pueden separarse de una mezcla de reacción y purificarse adicionalmente por un método tal como cromatografía en columna, cromatografía líquida a alta presión, o recristalización. Adicionalmente, las diversas etapas sintéticas pueden realizarse en una secuencia u orden alternativo para dar los compuestos deseados. Las transformaciones químicas sintéticas y metodologías del grupo protector (protección y desprotección) útiles en el sintetizado de los compuestos descritos en la presente memoria se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, las que se describen en R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T.W. Greene y P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2ª Ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser y M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic synthesis*, John Wiley and Sons (1994); y L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995), y ediciones posteriores de los mismos.

Palíndromos

Los monómeros y métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para preparar un ARN, p.ej., un agente de ARNi, que tiene una estructura palindrómica como se describe en la presente memoria y las descritas en una o más de la Solicitud Provisional de Estados Unidos núm. de serie 60/452.682, presentada el 7 de marzo de 2003; Solicitud Provisional de Estados Unidos núm. de serie 60/462.894, presentada el 14 de abril de 2003; y la Solicitud Internacional núm. PCT/US04/07070, presentada el 8 de marzo de 2004. Los agentes de ARNi descritos en la presente memoria pueden tener como objetivo más de una región de ARN. Por ejemplo, un agente de ARNi puede incluir una primera y segunda secuencia que son suficientemente complementarias la una con la otra para hibridar. La primera secuencia puede ser complementaria a una primera región de ARN diana y la segunda secuencia puede ser complementaria a una segunda región de ARN diana. Las secuencias primera y segunda del agente de ARNi pueden estar en diferentes cadenas de ARN, y el malapareamiento entre las secuencias primera y segunda puede ser menor que 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o 1%. Las secuencias primera y segunda del agente de ARNi están en la misma cadena de ARN, y en una realización relacionada más del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 1% del agente de ARNi puede estar en forma bimolecular. Las secuencias primera y segunda del agente de ARNi pueden ser totalmente complementarias la una a la otra.

La primera región de ARN diana puede estar codificada por un primer gen y la segunda región de ARN diana puede estar codificada por un segundo gen, o las regiones de ARN diana primera y segunda pueden ser regiones diferentes de un ARN de un único gen. Las secuencias primera y segunda pueden diferir en al menos 1 nucleótido.

Las regiones de ARN diana primera y segunda pueden estar en transcritos codificados por variantes de la primera y segunda secuencia, p.ej., alelos primero y segundo, de un gen. Las variantes de secuencia pueden ser mutaciones, o polimorfismos, por ejemplo. La primera región de ARN diana puede incluir una sustitución, inserción o eliminación de nucleótido respecto a la segunda región de ARN diana, o la segunda región de ARN diana puede ser un mutante o una variante de la primera región diana.

Las regiones de ARN diana primera y segunda puede comprender regiones de ARN víricas o humanas. Las regiones de ARN diana primera y segunda pueden estar también en transcritos variantes de un oncogen o incluir diferentes mutaciones de un transcrito génico supresor tumoral. Además, las regiones de ARN diana primera y segunda pueden corresponder a puntos calientes para la variación genética.

Las composiciones descritas en la presente memoria pueden incluir mezclas de moléculas de agente de ARNi. Por ejemplo, un agente de ARNi puede contener una primera secuencia y una segunda secuencia suficientemente complementarias la una a la otra para hibridar, y además la primera secuencia es complementaria a una primera

5 región de ARN diana y la segunda secuencia es complementaria a una segunda región de ARN diana. La mezcla puede incluir además al menos una variedad de agente de ARNi adicional que incluye una tercera secuencia y una cuarta secuencia suficientemente complementarias la una a la otra para hibridar, y donde la tercera secuencia es complementaria a una tercera región de ARN diana y la cuarta secuencia es complementaria a una cuarta región de ARN diana. Además, la primera o segunda secuencia puede ser suficientemente complementaria a la tercera o cuarta secuencias para ser capaz de hibridar la una con la otra. Las secuencias primera y segunda pueden estar en la misma o diferente cadena de ARN, y la tercera y cuarta secuencias pueden estar en la misma o diferente cadena de ARN.

10 Las regiones de ARN diana pueden ser secuencias variantes de un ARN vírico o humano, y en ciertas realizaciones, al menos dos de las regiones de ARN diana pueden estar en transcritos variantes de un oncogén o gen supresor tumoral. Las regiones de ARN diana pueden corresponder a puntos calientes genéticos.

15 Los métodos de fabricación de una composición de agente de ARNi pueden incluir obtener o proporcionar información sobre una región de un ARN de un gen diana (p.ej., un gen vírico o humano, o un oncogén supresor tumoral, p.ej., p53), donde la región tiene alta variabilidad o frecuencia mutacional (p.ej., en humanos). Además, puede obtenerse o proporcionarse información sobre una pluralidad de dianas de ARN en la región, donde cada diana de ARN corresponde a una variante o mutante diferente del gen (p.ej., una región que incluye el codón que codifica p53 248Q y/o p53 249S). El agente de ARNi puede construirse de manera que una primera secuencia sea complementaria a una primera de la pluralidad de dianas de ARN variantes (p.ej., que codifican 249Q) y una segunda secuencia es complementaria a una segunda de la pluralidad de dianas de ARN variantes (p.ej., que codifican 249S), y las secuencias primera y segunda pueden ser suficientemente complementarias para hibridar.

20 El análisis de secuencia, p.ej., para identificar mutantes comunes en el gen diana, puede usarse para identificar una región del gen diana que tiene alta variabilidad o frecuencia mutacional. Una región de un gen diana que tiene alta variabilidad o frecuencia mutacional puede identificarse obteniendo o proporcionando información de genotipo sobre el gen diana a partir de una población.

25 La expresión de un gen diana puede modularse, p.ej., regularse por disminución o silenciarse, proporcionando un agente de ARNi que tiene una primera secuencia y una segunda secuencia suficientemente complementaria la una a la otra para hibridar. Además, la primera secuencia puede ser complementaria a una primera región de ARN diana y la segunda secuencia puede ser complementaria a una segunda región de ARN diana.

30 Un agente de ARNi puede incluir una primera secuencia complementaria a una primera región diana de ARN variante y una segunda secuencia complementaria a una segunda región diana de ARN variante. Las regiones diana de ARN variantes primera y segunda pueden corresponder a la primera y segunda variantes o mutantes de un gen diana, p.ej., gen vírico, supresor tumoral u oncogén. Las regiones de ARN diana variantes primera y segunda pueden incluir variantes alélicas, mutaciones (p.ej., mutaciones puntuales) o polimorfismos del gen diana. Las regiones diana de ARN variantes primera y segunda pueden corresponder a puntos calientes genéticos.

35 Una pluralidad de agente de ARNi (p.ej., un panel o banco) puede proporcionarse.

Estructuras dobles de Watson-Crick distintas de las canónicas

40 Los monómeros y métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para preparar un ARN, p.ej., un agente de ARNi, que tiene monómeros que pueden formar un emparejamiento distinto de uno de Watson-Crick canónico con otro monómero, p.ej., un monómero en otra cadena, tal como los descritos en la presente memoria y los descritos en la Solicitud Provisional de Estados Unidos núm. de serie 60/465.665, presentada el 25 de abril de 2003, y la Solicitud Internacional núm. PCT/US04/07070, presentada el 8 de marzo de 2004.

45 El uso de "emparejamiento distinto del de Watson-Crick canónico" entre monómeros de una cadena doble pueden usarse para controlar, a menudo para promover, la fusión de todo o parte de un fragmento doble. El agente de ARNi puede incluir un monómero en una posición seleccionada o restringida que da por resultado un primer nivel de estabilidad en el fragmento doble del agente de ARNi (p.ej., entre las dos moléculas separadas de un agente de ARNi bicatenario) y un segundo nivel de estabilidad en un fragmento doble entre una secuencia de un agente de ARNi y otra molécula de secuencia, p.ej., una secuencia diana o inespecífica en un sujeto. En algunos casos el segundo fragmento doble tienen un nivel relativamente mayor de estabilidad, p.ej., en un fragmento doble entre una secuencia antisentido de un agente de ARNi y un ARNm diana. En el caso de uno o más de los monómeros, la posición de los monómeros en el agente de ARNi, y la secuencia diana (a veces denominada en la presente memoria como los parámetros de selección o restricción), se seleccionan de manera que el fragmento doble del agente de ARNi es tiene una energía de asociación libre comparativamente menor (que aunque sin desear estar atados por un mecanismo o teoría, se cree que contribuye a la eficacia promoviendo la disociación del agente de ARNi doble en el contexto del RISC) mientras que el fragmento doble formado entre una secuencia de direccionamiento antisentido y su secuencia diana, tiene una energía de asociación libre relativamente mayor (que aunque sin desear estar atados a un mecanismo o teoría, se cree que contribuye a la eficacia promoviendo la asociación de la secuencia antisentido y el ARN diana).

- En otros casos el segundo fragmento doble tiene un nivel de estabilidad relativamente menor, p.ej., en un fragmento doble entre una secuencia homosentido de un agente de ARNi y un ARNm inespecífico. En este caso uno o más de los monómeros, la posición de los monómeros en el agente de ARNi, y una secuencia inespecífica, se seleccionan de manera que el fragmento doble de agente de ARNi es tiene una energía de asociación libre comparativamente mayor mientras que el fragmento doble formado entre una secuencia de direccionamiento homosentido y su secuencia inespecífica, tiene una energía de asociación libre relativamente menor (que aunque sin desear estar atados por un mecanismo o teoría, se cree que reduce el nivel de silenciamiento inespecífico contribuyendo a la eficacia promoviendo la separación del fragmento doble formado por la cadena homosentido y la secuencia inespecífica).
- 5
- 10 Por consiguiente, inherente a la estructura del agente de ARNi es la propiedad de tener una primera estabilidad para el fragmento doble dentro del agente de ARNi y una segunda estabilidad para un fragmento doble formado entre una secuencia del agente de ARNi y otro ARN, p.ej., un ARNm diana. Como se trata anteriormente, esto puede conseguirse mediante la selección sensata de uno o más de los monómeros en una posición seleccionada o restringida, la selección de la posición en el fragmento doble para situar la posición seleccionada o restringida, y la
- 15 selección de la secuencia de una secuencia diana (p.ej., la región particular de un gen diana que va a ser objetivo). Las secuencias de agente de ARNi que satisfacen estas necesidades se denominan a veces en la presente memoria como secuencias restringidas. El uso de los parámetros de restricción o selección puede ser, p.ej., mediante inspección o mediante métodos asistidos por ordenador. El uso de los parámetros puede dar por resultado la selección de una secuencia diana y de monómeros particulares para dar un resultado deseado en términos de
- 20 estabilidad, o estabilidad relativa, de un fragmento doble.
- Por consiguiente, en otro aspecto, se describe en la presente memoria un agente de ARNi que incluye: una primera secuencia que tiene como objetivo una primera región diana y una segunda secuencia que tiene como objetivo una segunda región diana. Las secuencias primera y segunda tienen suficiente complementariedad la una a la otra para hibridar, p.ej., bajo condiciones fisiológicas, p.ej., bajo condiciones fisiológicas pero no en contacto con una helicasa u otra enzima desenrolladora. En una región doble del agente de ARNi, en una posición seleccionada o restringida, la primera región diana tiene un primer monómero, y la segunda región diana tiene un segundo monómero. Los monómeros primero y segundo ocupan composiciones complementarias o correspondientes. Uno, y preferiblemente ambos monómeros se seleccionan de manera que la estabilidad del emparejamiento de los monómeros que tienen parte en un fragmento doble entre la primera y segunda secuencia diferirá de la estabilidad del emparejamiento
- 25 entre la primera o segunda secuencia con una secuencia diana.
- Normalmente, los monómeros se seleccionarán (la selección de la secuencia diana puede necesitarse también) de manera que formarán un emparejamiento en el fragmento doble del agente de ARNi que tiene una menor energía de disociación libre, y un T_m menor, que la que poseerán por el emparejamiento del monómero con su monómero complementario en un fragmento doble entre la secuencia del agente de ARNi y un fragmento doble de ARN diana.
- 30
- 35 La restricción situada en los monómeros puede aplicarse a un sitio seleccionado o a más de un sitio seleccionado. Por medio del ejemplo, la restricción puede aplicarse a más de 1, pero menos de 3, 4, 5, 6 o 7 sitios en un fragmento doble de agente de ARNi.
- Un sitio restringido o seleccionado pues estar presente en un número de posiciones en el fragmento doble del agente de ARNi. P.ej., un sitio restringido o seleccionado puede estar presente a 3, 4, 5 o 6 posiciones de cualquier extremo, 3' o 5' de una secuencia duplicada. Un sitio restringido o seleccionado puede estar presente en el centro de la región doble, p.ej., puede estar a más de 3, 4, 5, o 6 posiciones del extremo de una región duplicada.
- 40
- En alguna realización la región doble del agente de ARNi tendrá, malapareamientos, además del sitio o sitios seleccionados o restringidos. Preferiblemente tendrá no más de 1, 2, 3, 4 o 5 bases, que no forman pares de Watson-Crick canónicos o que no hibridan. Los salientes se tratan en detalle en otra parte de la presente memoria pero son preferiblemente de aproximadamente 2 nucleótidos de longitud. Los salientes pueden ser complementarios a las secuencias génicas que son objetivo o pueden ser otra secuencia. TT es una secuencia de saliente preferida. Las secuencias de agente de ARNi primera y segunda pueden también unirse, p.ej., mediante bases adicionales para formar una horquilla, o mediante otros conectores que no son bases.
- 45
- Los monómeros pueden seleccionarse de manera que: los monómeros primero y segundo son ribonucleótidos que se dan de forma natural, o ribonucleótidos modificados que tienen bases que se dan de forma natural, y cuando ocupan sitios complementarios o bien no emparejan y no tienen un considerable nivel de enlace de H, o forman un emparejamiento de Watson-Crick no canónico y forman un patrón no canónico de enlace de H, que normalmente tienen una menor energía de disociación libre que la vista en un emparejamiento de Watson-Crick canónico, o se emparejan de otra forma para dar una energía de asociación libre que es menor que la de un valor preseleccionado o es menor, p.ej., que la de un emparejamiento canónico. Cuando una (o ambas) de las secuencias de agente de ARNi forma un fragmento doble con una diana, el primer (o segundo) monómero forma un emparejamiento de Watson-Crick canónico con la base en la posición complementaria en la diana, o forma un emparejamiento de Watson-Crick no canónico que tiene una mayor energía de disociación libre y un mayor T_m que lo visto en el emparejamiento en el agente de ARNi. Los emparejamientos de Watson-Crick clásicos son como sigue: A-T, G-C y
- 50
- 55

A-U. Los emparejamientos de Watson-Crick no canónicos se conocen en la técnica y pueden incluir, U-U, G-G, G- A_{trans} , G- A_{cis} y GU.

- 5 El monómero en una o ambas secuencias se selecciona de manera que, no se empareja, o forma un par con su monómero correspondiente en la otra secuencia que minimiza la estabilidad (p.ej., el enlace de H formado entre el monómero en el sitio seleccionado en una secuencia y su monómero en el sitio correspondiente en la otra secuencia son menos estables que los enlaces de H formados por el monómero uno (o ambos) de las secuencias con la respectiva secuencia diana. El monómero en una o ambas cadenas se elige también para promover la estabilidad en uno o ambos de los fragmentos dobles hechos por una cadena y su secuencia diana. P.ej., uno o más de los monómeros y las secuencias diana se seleccionan de manera que en la posición seleccionada o restringida, no se forman enlaces de H, o se forma un emparejamiento no canónico en el fragmento doble del agente de ARNi, o si no se emparejan de otra forma para dar una energía de asociación libre que es menor que la de un valor preseleccionado o es menor, p.ej., que la de un emparejamiento canónico, pero cuando una (o ambas) secuencias forman un fragmento doble con la respectiva diana, el emparejamiento en el sitio seleccionado o restringido es un emparejamiento de Watson-Crick canónico.
- 10
- 15 La inclusión de dichos monómeros tendrá uno o más de los siguientes efectos: desestabilizará el fragmento doble del agente de ARNi, desestabilizará las interacciones entre la secuencia homosenrido y secuencias diana involuntarias, a veces denominadas como secuencias inespecíficas, e interacciones dobles entre la secuencia y la diana deseada no se desestabilizará.

A manera de ejemplo:

- 20 El monómero en el sitio seleccionado en la primera secuencia incluye una A (o una base modificada que empareje con T), y el monómero en la posición seleccionada en la segunda secuencia se elige de un monómero que no emparejará o que formará un emparejamiento no canónico, p.ej., G. Estos serán útiles en las aplicaciones en las que la secuencia diana para la primera secuencia tenga una T en la posición seleccionada. En realizaciones donde ambos fragmentos dobles diana están estabilizados es útil en donde la secuencia diana para la segunda cadena tiene un monómero que formará un emparejamiento de Watson-Crick canónico con el monómero seleccionado para la posición seleccionada en la segunda cadena.
- 25

- 30 El monómero en el sitio seleccionado en la primera secuencia incluye U (o una base modificada que empareja con A), y el monómero en la posición seleccionada en la segunda secuencia se elige de un monómero que no emparejará o que formará un emparejamiento no canónico con, p.ej., U o G. Estos serán útiles en aplicaciones en las que la secuencia diana para la primera secuencia tiene una T en la posición seleccionada. En las realizaciones donde ambos fragmentos dobles diana están estabilizados es útil en donde la secuencia diana para la segunda cadena tiene un monómero que formará un emparejamiento de Watson-Crick canónico con el monómero seleccionado para la posición seleccionada en la segunda cadena.

- 35 El monómero en el sitio seleccionado en la primera secuencia incluye una G (o una base modificada que empareja con C), y el monómero en la posición seleccionada en la segunda secuencia se elige de un monómero que no emparejará o que formará un emparejamiento no canónico, p.ej., G, A_{cis} , A_{trans} o U. Estos serán útiles en aplicaciones en las que la secuencia diana para la primera secuencia tiene una T en la posición seleccionada. En realizaciones donde ambos fragmentos dobles diana están estabilizados es útil en donde la secuencia diana para la segunda cadena tiene un monómero que formará un emparejamiento de Watson-Crick canónico con el monómero seleccionado para la posición seleccionada en la segunda cadena.
- 40

- 45 El monómero en el sitio seleccionado en la primera secuencia incluye una C (o una base modificada que empareja con G), y el monómero en la posición seleccionada en la segunda secuencia se elige de un monómero que no emparejará o que formará un emparejamiento no canónico. Estos serán útiles en aplicaciones en las que la secuencia diana para la primera secuencia tiene una T en la posición seleccionada. En realizaciones donde ambos fragmentos dobles diana están estabilizados es útil en donde la secuencia diana para la segunda cadena tiene un monómero que formará un emparejamiento de Watson-Crick canónico con el monómero seleccionado para la posición seleccionada en la segunda cadena.

- 50 Un monómero o monómeros modificados o que no se dan de forma natural pueden elegirse de manera que cuando un monómero modificado o que no se da de forma natural ocupa unas posiciones en la posición seleccionada o restringida en un agente de ARNi muestran una primera energía de disociación libre y cuando uno (o ambos) de ellos empareja con un monómero que se da de forma natural, el par muestra una segunda energía de disociación libre, que es normalmente mayor que la del emparejamiento de los monómeros primero y segundo. P.ej., cuando los monómeros primero y segundo ocupan posiciones complementarias o bien no se emparejan y no tienen un nivel considerable de enlace de H, o forman un enlace más débil que uno de ellos podría formar con un monómero que se da de forma natural, y reducen la estabilidad de ese fragmento doble, aunque cuando el fragmento doble disocia al menos una de las cadenas formará un fragmento doble con una diana en que el monómero seleccionado promoverá la estabilidad, p.ej., el monómero formará un par más estable con un monómero que se da de forma natural en la secuencia diana que el emparejamiento formado en el agente de ARNi.
- 55

Un ejemplo de dicho emparejamiento es 2-amino A y cualquiera de un análogo de 2-tiopirimidina de U o T.

5 Cuando están situados en posiciones complementarias del agente de ARNi estos monómeros emparejarán muy mal y minimizarán la estabilidad. Sin embargo, se forma un fragmento doble entre 2-amino A y el U de una diana que se da de forma natural, o un fragmento doble es entre 2-tio U y la A de una diana que se da de forma natural o 2-tio T y la A de una diana que se da de forma natural tendrá una energía de disociación relativamente mayor y será más estable. Esto se muestra en la FIG. 12.

10 El par mostrado en la FIG. 12 (la 2-amino A y el 2-s U y T) es ejemplar. En otra realización, el monómero en la posición seleccionada en la cadena homosenrido puede ser un resto de emparejamiento universal. Un agente de emparejamiento universal formará algún grado de enlace de H con más de uno y preferiblemente todos los demás monómeros que se dan de forma natural. Unos ejemplos de un resto de emparejamiento universal es un monómero que incluye 3-nitropirrol. (Ejemplos de otros análogos de base universal candidatos pueden encontrarse en la técnica, p.ej., en Loakes, 2001, NAR 29:2437-2447. Pueden encontrarse también ejemplos en la sección de Bases universales posterior). En estos casos el monómero en la posición correspondiente de la cadena antisentido puede elegirse por su capacidad para formar un fragmento doble con la diana y puede incluir, p.ej., A, U, G, o C.

15 Los agentes de ARNi descritos en la presente memoria pueden incluir:

20 Una secuencia homosenrido, que preferiblemente no tiene como objetivo una secuencia en un sujeto, y una secuencia antisentido, que tiene como objetivo un gen diana en un sujeto. Las secuencias homosenrido y antisentido tienen suficiente complementariedad la una con la otra para hibridar, p.ej., bajo condiciones fisiológicas, p.ej., bajo condiciones fisiológicas pero no en contacto con una helicasa u otra enzima desenrollante. En una región doble del agente de ARNi, en una posición seleccionada o restringida, los monómeros se seleccionan de manera que:

25 El monómero en la secuencia homosenrido se selecciona de manera que, no empareja, o forma un par con su monómero correspondiente en la cadena antisentido que minimiza la estabilidad (p.ej., el enlace de H formado entre el monómero en el sitio seleccionado en la cadena homosenrido y su monómero en el sitio correspondiente en la cadena antisentido son menos estables que los enlaces de H formados por el monómero de la secuencia antisentido y su pareja de Watson-Crick canónica o, si el monómero en la cadena antisentido incluye una base modificada, el análogo natural de la base modificada y su pareja de Watson-Crick canónica).

El monómero que está en la posición correspondiente en la cadena antisentido se selecciona de manera que maximiza la estabiliza de un fragmento doble que se forma con la secuencia diana, p.ej., forma un emparejamiento de Watson-Crick canónico con el monómero en la posición correspondiente en la cadena diana.

30 Opcionalmente, el monómero en la secuencia homosenrido se selecciona de manera que, no empareja, o forma un par con su monómero correspondiente en la cadena antisentido que minimiza la estabilidad con una secuencia inespecífica.

35 La inclusión de dichos monómeros tendrá uno o más de los siguientes efectos: desestabilizará el fragmento doble de agente de ARNi, desestabilizará las interacciones entre la secuencia homosenrido y las secuencias diana involuntarias, a veces denominadas como secuencias inespecíficas, y las interacciones del fragmento doble entre la cadena antisentido y la diana deseada no se desestabilizará.

La restricción situada en los monómeros puede aplicarse a un sitio seleccionado o a más de un sitio seleccionado. Por medio del ejemplo, la restricción puede aplicarse a más de 1, pero menos de 3, 4, 5, 6, o 7 sitios en un fragmento doble del agente de ARNi.

40 Un sitio restringido o seleccionado puede estar presente en un número de posiciones en el fragmento doble del agente de ARNi. P.ej., un sitio restringido o seleccionado puede estar presente a 3, 4, 5 o 6 posiciones de cualquier extremo, 3' o 5' de una secuencia duplicada. Un sitio restringido o seleccionado puede estar presente en la mitad de la región doble, p.ej., puede estar a más de 3, 4, 5 o 6 posiciones desde el extremo de una región duplicada.

45 En alguna realización la región doble del agente de ARNi tendrá, malapareamientos, además del sitio o sitios seleccionados o restringidos. Preferiblemente no tendrá más de 1, 2, 3, 4 o 5 bases, que no forman pares de Watson-Crick canónicos o que no hibridan. Los salientes se tratan en detalle en otra parte en la presente memoria pero son preferiblemente de aproximadamente 2 nucleótidos de longitud. Los salientes pueden ser complementarios a las secuencias génicas que son objetivo o pueden ser otra secuencia. TT es una secuencia saliente preferida. Las secuencias de agente de ARNi primera y segunda también pueden unirse, p.ej., mediante bases adicionales para formar una horquilla, o mediante otros conectores que no son base.

50 Los monómeros pueden seleccionarse de manera que: los monómeros primero y segundo son ribonucleótidos que se dan de forma natural, o ribonucleótidos modificados que tienen bases que se dan de forma natural, y cuando ocupan sitios complementarios o bien no emparejan y no tienen un considerable nivel de enlaces de H, o forman un emparejamiento de Watson-Crick no canónico y forman un patrón no canónico de enlaces de H, que normalmente tienen una menor energía de disociación libre que la vista en un emparejamiento de Watson-Crick canónico, o si no emparejan para dar una energía de asociación libre que es menor que la de un valor preseleccionado o es menor,

p.ej., que la de un emparejamiento canónico. Cuando una (o ambas) de las secuencias de agente de ARNi forma un fragmento doble con una diana, el primer (o segundo) monómero forma un emparejamiento de Watson-Crick canónico con la base en la posición complementaria en la diana, o forma un emparejamiento de Watson-Crick no canónico que tiene una mayor energía de disociación libre y un mayor T_m que el visto en el emparejamiento en el agente de ARNi. Los emparejamiento clásicos de Watson-Crick son como sigue: A-T, G-C, y A-U. Los emparejamiento de Watson-Crick no canónicos se conocen en la técnica y pueden incluir, U-U, G-G, G- A_{trans} , G- A_{cis} y GU.

El monómero en una o ambas de las secuencias se selecciona de manera que, no empareja, o forma un par con su correspondiente monómero en la otra secuencia que minimiza la estabilidad (p.ej., el enlace de H formado entre el monómero en el sitio seleccionado en una secuencia y su monómero en el sitio correspondiente en la otra secuencia son menos estables que los enlaces de H formados por uno monómero (o ambos) de las secuencias con la secuencia diana respectiva. El monómero en una o ambas cadenas se elige también para promover la estabilidad en uno o ambos de los fragmentos dobles hechos por una cadena y su secuencia diana. P.ej., uno o más de los monómeros y las secuencias diana se seleccionan de manera que en la posición seleccionada o restringida, no se forman enlaces de H, o se forma un emparejamiento no canónico en el fragmento doble del agente de ARNi, o si no emparejan de otra forma para dar una energía de asociación libre que es menor que la de un valor preseleccionado o es menor p.ej., que la de un emparejamiento canónico, pero cuando una (o ambas) secuencias forman un fragmento doble con la diana respectiva, el emparejamiento en el sitio seleccionado o restringido es un emparejamiento de Watson-Crick canónico.

La inclusión de dichos monómeros tendrá uno o más de los siguientes efectos: desestabilizará el fragmento doble del agente de ARNi, desestabilizará las interacciones entre la secuencia homosenrido y secuencias diana involuntarias, a veces denominadas como secuencias inespecíficas, y las interacciones dobles entre la secuencia y la diana deseada no se desestabilizarán.

A modo de ejemplo:

El monómero en el sitio seleccionado en la primera secuencia incluye una A (o una base modificada que empareja con T), y el monómero en la posición seleccionada en la segunda secuencia se elige de un monómero que no emparejará o que formará un emparejamiento no canónico con, p.ej., G. Estos serán útiles en aplicaciones en las que la secuencia diana para la primera secuencia tiene una T en la posición seleccionada. En las realizaciones donde ambos fragmentos dobles diana están estabilizados es útil en donde la secuencia diana para la cadena segunda tiene un monómero que formará un emparejamiento de Watson-Crick canónico con el monómero seleccionado para la posición seleccionada en la segunda cadena.

El monómero en el sitio seleccionado en la primera secuencia incluye U (o una base modificada que empareja con A), y el monómero en la posición seleccionada en la segunda secuencia se elige de un monómero que no emparejará o que formará un emparejamiento no canónico, p.ej., U o G. Estos serán útiles en aplicaciones en las que la secuencia diana para la primera secuencia tiene una T en la posición seleccionada. En las realizaciones donde ambos fragmentos dobles diana están estabilizados es útil en donde la secuencia diana para la segunda cadena tiene un monómero que formará un emparejamiento de Watson-Crick canónico con el monómero seleccionado para la posición seleccionada en la segunda cadena.

El monómero en el sitio seleccionado en la primera secuencia incluye una G (o una base modificada que empareja con C), y el monómero en la posición seleccionada en la segunda secuencia se elige de un monómero que no emparejará o que formará un emparejamiento no canónico con, p.ej., G, A_{cis} , A_{trans} o U. Estos serán útiles en aplicaciones en las que la secuencia diana para la primera secuencia tiene una T en la posición seleccionada. En realizaciones donde ambos fragmentos dobles diana están estabilizados es útil en donde la secuencia diana para la segunda cadena tiene un monómero que formará un emparejamiento de Watson-Crick canónico con el monómero seleccionado para la posición seleccionada en la segunda cadena.

El monómero en el sitio seleccionado en la primera secuencia incluye una C (o una base modificada que empareja con G), y el monómero en la posición seleccionada en la segunda secuencia se elige de un monómero que no emparejará o que formará un emparejamiento no canónico. Estos serán útiles en aplicaciones en las que la secuencia diana para la primera secuencia tiene una T en la posición seleccionada. En realizaciones donde ambas cadenas dobles diana están estabilizadas es útil en donde la secuencia diana para la segunda cadena tiene un monómero que formará un emparejamiento de Watson-Crick canónico con el monómero seleccionado para la posición seleccionada en la segunda cadena.

Un monómero o monómeros modificados o que no se dan de forma natural pueden elegirse de manera que cuando un monómero modificado o que no se da de forma natural ocupa unas posiciones en la posición seleccionada o restringida en un agente de ARNi muestran una primera energía de disociación libre y cuando uno (o ambos) de ellos emparejan con un monómero que se da de forma natural, el par muestra una segunda energía de disociación libre, que es normalmente mayor que la del emparejamiento de los monómeros primero y segundo. P.ej., cuando los monómeros primero y segundo ocupan posiciones complementarias o bien no emparejan o no tienen un nivel considerable de enlaces de H, o forman un enlace más débil que uno de ellos formaría con un monómero que se da

de forma natural, y reducen la estabilidad de ese fragmento doble, pero cuando el fragmento doble se disocia al menos una de las cadenas formará un fragmento doble con una diana en que el monómero seleccionado promoverá la estabilidad, p.ej., el monómero formará un par más estable con un monómero que se da de forma natural en la secuencia diana que el emparejamiento que formó en el agente de ARNi.

5 Un ejemplo de dichos emparejamientos es 2-amino A y cualquiera de un análogo de 2-tio pirimidina de U o T.

Cuando están situados en posiciones complementarias del agente de ARNi estos monómeros emparejarán muy mal y minimizarán la estabilidad. Sin embargo, un fragmento doble se forma entre 2 amino A y el U de una diana que se da de forma natural, o un fragmento doble es entre 2-tio U y la A de una diana que se da de forma natural o 2-tio T y la A de una diana que se da de forma natural tendrá una energía de disociación libre relativamente mayor y será más estable.

10 El monómero en la posición seleccionada en la cadena homosenrido puede ser un resto de emparejamiento universal. Un agente de emparejamiento universal formará algún grado de enlace de H con más de uno y preferiblemente todos los monómeros que se dan de forma natural. Un ejemplo de un resto de emparejamiento universal es un monómero que incluye 3-nitropirrol. (Ejemplos de otros análogos de base universal candidatos pueden encontrarse en la técnica, p.ej., en Loakes, 2001, NAR 29:2437-2447. También pueden encontrarse ejemplos en la sección de Bases universales posterior). En estos casos el monómero en la posición correspondiente de la cadena antisentido puede elegirse por su capacidad para formar un fragmento doble con la diana y puede incluir, p.ej., A, U, G o C.

Los agentes de ARNi de la invención pueden incluir:

20 Una secuencia homosenrido, que preferiblemente no tiene como objetivo una secuencia en un sujeto, y una secuencia antisentido, que tiene como objetivo un gen diana en un sujeto. Las secuencias homosenrido y antisentido tienen suficiente complementariedad la una con la otra para hibridar, p.ej., en condiciones fisiológicas, p.ej., en condiciones fisiológicas pero no en contacto con una helicasa u otra enzima desenrollante. En una región doble del agente de ARNi, en una posición seleccionada o restringida, los monómeros se seleccionan de manera que:

25 El monómero en la secuencia homosenrido se selecciona de manera que, no empareja, o forma un par con su correspondiente monómero en la cadena antisentido que minimiza la estabilidad (p.ej., el enlace de H formado entre el monómero en el sitio seleccionado en la cadena homosenrido y su monómero en el sitio correspondiente en la cadena antisentido son menos estables que los enlaces de H formados por el monómero de la secuencia antisentido y su pareja de Watson-Crick canónica o, si el monómero en la cadena antisentido incluye una base modificada, el análogo natural de la base modificada y su pareja de Watson-Crick canónica);

30 El monómero está en la posición correspondiente en la cadena antisentido se selecciona de manera que maximiza la estabilidad de un fragmento doble que forma con la secuencia diana, p.ej., forma un emparejamiento de Watson-Crick canónico con el monómero en la posición correspondiente en la cadena diana;

35 Opcionalmente, el monómero en la secuencia homosenrido se selecciona de manera que, no empareja, o forma un par con su correspondiente monómero en la cadena antisentido que minimiza la estabilidad con una secuencia inespecífica.

40 La inclusión de dichos monómeros tendrá uno o más de los siguientes efectos: desestabilizará el fragmento doble del agente de ARNi, desestabilizará las interacciones entre la secuencia homosenrido y secuencias diana involuntarias, a veces denominadas como secuencias inespecíficas, y las interacciones dobles entre la cadena antisentido y la diana deseada no se desestabilizarán.

La restricción situada en los monómeros puede aplicarse a un sitio seleccionado o a más de un sitio seleccionado. Por medio del ejemplo, la restricción puede aplicarse a más de 1, pero menos de 3, 4, 5, 6 o 7 sitios en un fragmento doble del agente de ARNi.

45 Un sitio restringido o seleccionado puede estar presente en un número de posiciones en el fragmento doble del agente de ARNi. P.ej., un sitio restringido o seleccionado puede estar presente a 3, 4, 5 o 6 posiciones de cualquier extremo, 3' o 5' de una secuencia duplicada. Un sitio restringido o seleccionado puede estar presente en el centro de la región doble, p.ej., puede estar a más de 3, 4, 5 o 6 posiciones del extremo de una región doble.

El agente de ARNi puede seleccionarse para tener como objetivo un amplio espectro de genes, que incluyen cualquiera de los genes descritos en la presente memoria.

50 En una realización preferida el agente de ARNi tiene una arquitectura (arquitectura se refiere a uno o más de la longitud total, longitud de una región doble, la presencia, número, posición o longitud de salientes, forma de cadena cantar frente a bicatenaria) descrita en la presente memoria.

P.ej., el agente de ARNi puede ser menor de 30 nucleótidos de longitud, p.ej., 21-23 nucleótidos. Preferiblemente, el ARNi tiene 21 nucleótidos de longitud y hay una región doble de aproximadamente 19 pares. En una realización, el

ARNi tiene 21 nucleótidos de longitud, y la región doble del ARNi tiene 19 nucleótidos. En otra realización, el ARNi es mayor de 30 nucleótidos de longitud.

En alguna realización la región doble del agente de ARNi tendrá, malapareamientos, además del sitio o sitios seleccionados o restringidos. Preferiblemente no tendrá más de 1, 2, 3, 4 o 5 bases, que no forman pares de Watson-Crick canónicos o que no hibridan. Los salientes se tratan en detalle en otro sitio en la presente memoria pero tienen preferiblemente aproximadamente 2 nucleótidos de longitud. Los salientes pueden ser complementarios a las secuencias génicas que son objetivo o pueden ser otra secuencia. TT es una secuencia saliente preferida. La primera y segunda secuencias del agente de ARNi pueden también unirse, p.ej., mediante bases adicionales para formar una horquilla, o por otros conectores que no son bases.

5 Puede hacerse uso de uno o más parámetros de selección o restricción de manera que: los monómeros en el sitio seleccionado en las secuencias homosentido y antisentido son ambos ribonucleótidos que se dan de forma natural, o ribonucleótidos modificados que tienen bases que se dan de forma natural, y cuando ocupan sitios complementarios en el fragmento doble del agente de ARNi o bien no emparejan y no tienen un considerable nivel de enlaces de H, o forman un emparejamiento de Watson-Crick no canónico y por consiguiente forman un patrón no canónico de enlaces de H, que tienen generalmente una menor energía de disociación libre que la vista en un emparejamiento de Watson-Crick, o si no emparejan para dar una energía de asociación libre que es menor que la de un valor preseleccionado o es menor, p.ej., que la de un emparejamiento canónico. Cuando una, normalmente la secuencia antisentido de las secuencias del agente de ARNi forma un fragmento doble con otra secuencia, generalmente una secuencia en el sujeto, y generalmente una secuencia diana, el monómero forma un emparejamiento de Watson-Crick clásico con la base en la posición complementaria en la diana, o forma un emparejamiento de Watson-Crick no canónico que tiene una mayor energía de disociación libre y un mayor Tm que el visto en el emparejamiento en el agente de ARNi. Opcionalmente, cuando la otra secuencia del agente de ARNi, normalmente la secuencia homosentido forma un fragmento doble con otra secuencia, generalmente una secuencia en el sujeto, y generalmente una secuencia inespecífica, el monómero falla en formar un emparejamiento de Watson-Crick canónico con la base en la posición complementaria en la secuencia inespecífica, p.ej., forma o forma un emparejamiento de Watson-Crick no canónico que tiene una menor energía de disociación libre y un menor Tm.

A modo de ejemplo:

30 El monómero en el sitio seleccionado en la cadena antisentido incluye una A (o una base modificada que empareja con T), el monómero correspondiente en la diana es una T, y la cadena homosentido se elige de una base que no emparejará o que formará un par no canónico con, p.ej., G;

El monómero en el sitio seleccionado en la cadena antisentido incluye un U (o una base modificada que empareja con A), el monómero correspondiente en la diana es una A, y la cadena homosentido se elige de un monómero que no emparejará o que formará un emparejamiento no canónico, p.ej., U o G;

35 El monómero en el sitio seleccionado en la cadena antisentido incluye una C (o una base modificada que empareja con G), el monómero correspondiente en la diana es una G, y la cadena homosentido se elige de un monómero que no emparejará o que formará un emparejamiento no canónico, p.ej., G, A_{cis}, A_{trans} o U; o

El monómero en el sitio seleccionado en la cadena antisentido incluye una G (o una base modificada que empareja con C), el monómero correspondiente en la diana es una C, y la cadena homosentido se elige de un monómero que no emparejará o que formará un emparejamiento no canónico.

40 En otra realización un monómero o monómeros modificados o que no se dan de forma natural se elige de manera que cuando ocupa una posición complementaria en un agente de ARNi muestran una primera energía de disociación libre y cuando uno (o ambos) de ellos empareja con un monómero que se da de forma natural, el par muestra una segunda energía de disociación libre, que es normalmente mayor que la del emparejamiento de los monómeros primero y segundo. P.ej., cuando los monómeros primero y segundo ocupan posiciones complementarias o bien no emparejan y no tienen un nivel considerable de enlaces de H, o forman un enlace más débil del que uno de ellos formaría con un monómero que se da de forma natural, y reducen la estabilidad de ese fragmento doble, pero cuando el fragmento doble se disocia al menos una de las cadenas formará un fragmento doble con una diana en que el monómero seleccionado promoverá estabilidad, p.ej., el monómero formará un par más estable con un monómero que se da de forma natural en la secuencia diana que el emparejamiento que formó en el agente de ARNi.

55 Un ejemplo de dicho emparejamiento es 2-amino A y cualquiera de un análogo de 2-tio pirimidina de U o T. Como se trata anteriormente, cuando se sitúan en posiciones complementarias del agente de ARNi estos monómeros emparejarán muy mal y minimizarán la estabilidad. Sin embargo, un fragmento doble se forma entre 2-amino A y el U de una diana que se da de forma natural, o se forma un fragmento doble entre 2-tio U y la A de una diana que se da de forma natural o 2-tio T y la A de una diana que se da de forma natural tendrá una energía de disociación libre relativamente mayor y será más estable.

El monómero en la posición seleccionada en la cadena homosentido puede ser un resto de emparejamiento universal. Un agente de emparejamiento universal formará algún grado de enlace de H con más de uno y

preferiblemente todos los demás monómeros que se dan de forma natural. Unos ejemplos de un resto de emparejamiento universal es un monómero que incluye 3-nitropirrol. Ejemplos de otros análogos de base universal candidatos pueden encontrarse en la técnica, p.ej., en Loakes, 2001, NAR 29:2437-2447. En estos casos el monómero en la posición correspondiente de la cadena antisentido puede elegirse por su capacidad para formar un fragmento doble con la diana y puede incluir, p.ej., A, U, G o C.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un agente de ARNi que incluye: una secuencia homosentido, que preferiblemente no tiene como objetivo una secuencia en un sujeto, y una secuencia antisentido, que tiene como objetivo una pluralidad de secuencias diana en un sujeto, en los que las dianas difieren en la secuencia en solo 1 o un pequeño número, p.ej., no más de 5, 4, 3 o 2 posiciones. Las secuencias homosentido o antisentido tienen suficiente complementariedad la una a la otra para hibridar, p.ej., en condiciones fisiológicas, p.ej., en condiciones fisiológicas pero no en contacto con una helicasa u otra enzima desenrollante. En la secuencia de la cadena antisentido del agente de ARNi se selecciona de manera que una, algunas o todas las posiciones que corresponden a posiciones que difieren en la secuencia entre las secuencias diana, la cadena antisentido incluirá un monómero que formará enlaces de H con al menos dos diferentes secuencias diana. En un ejemplo preferido la secuencia antisentido incluirá un monómero universal o promiscuo, p.ej., un monómero que incluye 5-nitropirrol, 2-amino A, 2-tio U o 2-tio T, u otra base universal indicada en la presente memoria.

En una realización preferida el agente de ARNi tiene como objetivo secuencias repetidas (que difieren en solo una o un número pequeño de posiciones la una de la otra) en un único gen, una pluralidad de genes, o un genoma vírico, p.ej., el genoma de VHC.

Una realización se ilustra en las FIGs. 13 y 14.

En otro aspecto, descrito en la presente memoria se determina, p.ej., por medida o cálculo, la estabilidad de un emparejamiento entre monómeros en una posición seleccionada o restringida en el fragmento doble del agente de ARNi, y preferiblemente que determina la estabilidad para el correspondiente emparejamiento en un fragmento doble entre una secuencia del agente de ARNi y otro ARN, p.ej., una secuencia diana. Las determinaciones pueden compararse. Un agente de ARNi así analizado puede usarse en el desarrollo de un agente de ARNi modificado adicionalmente o puede administrarse a un sujeto. Este análisis puede realizarse sucesivamente para refinar o diseñar agentes de ARNi optimizados.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un kit que incluye uno o más de los siguiente: un ARNi descrito en la presente memoria, un recipiente estéril en que el agente de ARNi se describe, e instrucciones de uso.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un agente de ARNi que contiene una secuencia restringida hecha por un método descrito en la presente memoria. El agente de ARNi pueden tener como objetivo uno o más de los genes que se tratan en la presente memoria.

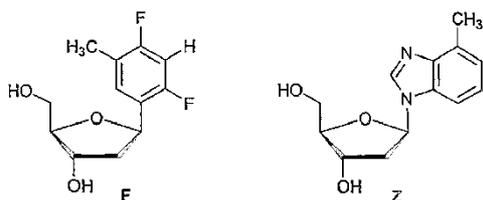
Los agentes de ARNi que tienen sitios restringidos o seleccionados, p.ej., como se describen en la presente memoria, pueden usarse de cualquier forma descrita en la presente memoria. Por consiguiente, los agentes de ARNi que tienen sitios restringidos o seleccionados, p.ej., como se describen en la presente memoria, pueden usarse para silenciar una diana, p.ej., en cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria y para dirigirse a cualquiera de los genes descritos en la presente memoria o para tratar cualquiera de los trastornos descritos en la presente memoria. Los agentes de ARNi que tienen sitios restringidos o seleccionados, p.ej., como se describen en la presente memoria, pueden incorporarse en cualquiera de las formulaciones o preparados, p.ej., preparados farmacéuticos o estériles descritos en la presente memoria. Los agentes de ARNi que tienen sitios restringidos o seleccionados, p.ej., como se describe en la presente memoria, pueden administrarse mediante cualquiera de las rutas de administración descritas en la presente memoria.

El término "distinto del emparejamiento de Watson-Crick canónico" como se usa en la presente memoria, se refiere a un emparejamiento entre un primer monómero en una primera secuencia y un segundo monómero en la posición correspondiente en una segunda secuencia de un fragmento doble en que uno o más de lo siguiente es verdad: (1) esencialmente no hay emparejamiento entre los dos, p.ej., no hay un nivel significativo de enlace de H entre los monómeros o el enlace entre los monómeros no contribuye de ninguna forma significativa a la estabilidad del fragmento doble; (2) los monómeros son un emparejamiento no canónico de monómeros que tienen una bases que se dan de forma natural, es decir, son distintos de A-T, A-U o G-C, y forman enlaces de H monómero-monómero, aunque generalmente el patrón de enlace de H formado es menos fuerte que los enlaces formados por un emparejamiento canónico; o (3) al menos uno de los monómeros incluye unas bases que no se dan de forma natural y los enlaces de H formados entre los monómeros es, preferiblemente formado es menos fuerte que los enlaces formados por un emparejamiento canónico, específicamente uno o más de A-T, A-U, G-C.

El término "inespecífico" como se usa en la presente memoria, se refiere a una secuencia distinta de la secuencia a silenciar.

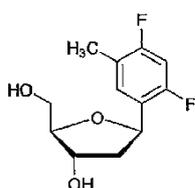
Bases universales: "comodines", complementariedad basada en la forma

(Bi-stranded, multisite replication of a base pair between difluorotoluene and adenine: confirmation by "inverse" sequencing. Lui, D.; Moran, S.; Kool, E.T. *Chem. Biol.*, 1997, 4, 919-926).



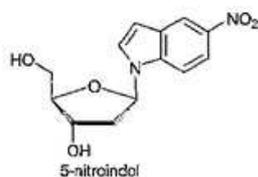
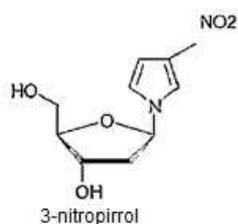
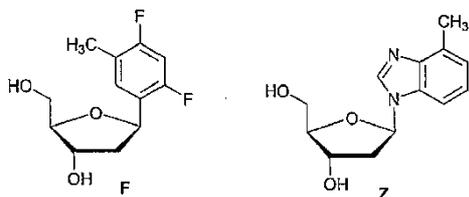
5 (Importance of terminal base pair hydrogen-bonding in 3'-end proofreading by the Klenow fragment of DNA polymerase I. Morales, J.C.; Kool, E.T. *Biochemistry*, 2000, 39, 2626-2632).

(Selective and stable DNA base pairing without hydrogen bonds. Matray, T.J.; Kool, E.T.J. *Am.Chem. Soc.*, 1998, 120, 6191,6192).

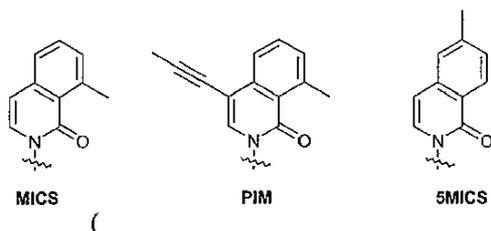


10 (Difluorotoluene, a nonpolar isostere for thymine, codes specifically and efficiently for adenine in DNA replication. Moran, S. Ren, R.X.-F.; Rumney IV, S.; Kool, E.T. *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119, 2056-2057)

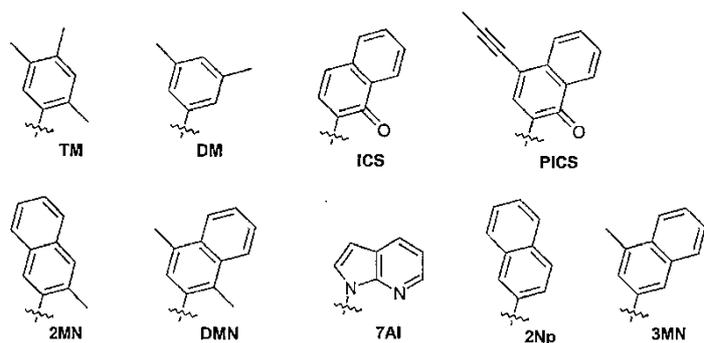
(Structure and base pairing properties of a replicable nonpolar isostere for deoxyadenosine. Guckian, K.M.; Morales, J.C.; Kool, E.T. *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 9652-9656



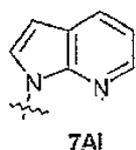
15



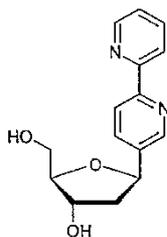
(Universal bases for hybridization, replication and chain termination. Berger, M.; Wu, Y.; Ogawa, A.K.; McMinn, D.L.; Schultz, P.G.; Romesberg, F.E. *Nucleic Acids Res.*, 2000, 28, 2911-2914)



- 5 (1. Efforts toward the expansion of the genetic alphabet: Information storage and replication with unnatural hydrophobic base pairs. Ogawa, A. K.; Wu, Y.; McMinn, D. L.; Liu, J.; Schultz, P. G.; Romesberg, F. E. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 3274-3287. 2. Rational design of an unnatural base pair with increased kinetic selectivity. Ogawa, A. K.; Wu, Y.; Berger, M.; Schultz, P. G.; Romesberg, F. E. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 8803-8804)



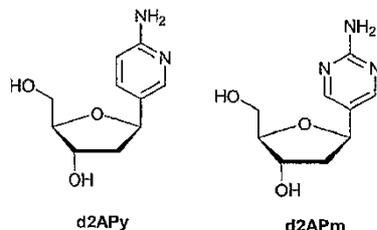
(Efforts toward expansion of the genetic alphabet: replication of DNA with three base pairs. Tae, E. L.; Wu, Y.; Xia, G.; Schultz, P. G.; Romesberg, F. E. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 7439-7440)



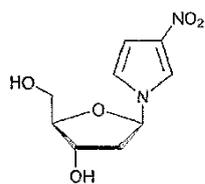
- 10 (1. Efforts toward expansion of the genetic alphabet: Optimization of interbase hydrophobic interactions. Wu, Y.; Ogawa, A. K.; Berger, M.; McMinn, D. L.; Schultz, P. G.; Romesberg, F. E. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 7621-7632. 2. Efforts toward expansion of genetic alphabet: DNA polymerase recognition of a highly stable, self-pairing hydrophobic base. McMinn, D. L.; Ogawa, A. K.; Wu, Y.; Liu, J.; Schultz, P. G.; Romesberg, F. E. *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 11585-11586)

(A stable DNA duplex containing a non-hydrogen-bonding and non-shape complementary base couple: Interstrand stacking as the stability determining factor. Brotschi, C.; Haberli, A.; Leumann, C. *J. Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, 40, 3012-3014)

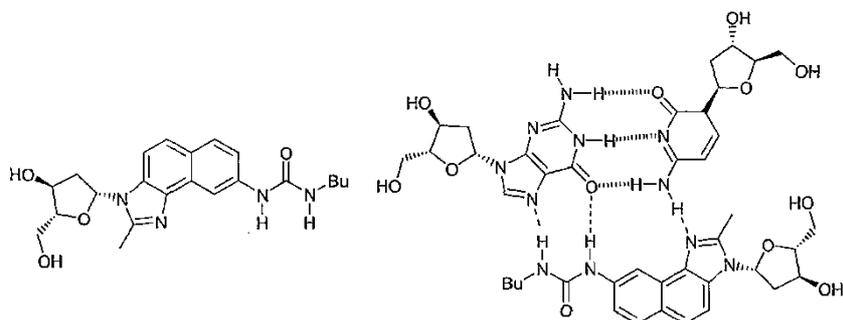
- 20 (2,2'-Bipyridine Ligandoside: A novel building block for modifying DNA with intra-duplex metal complexes. Weizman, H.; Tor, Y. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 3375-3376)



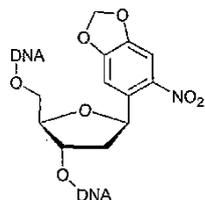
(Minor groove hydration is critical to the stability of DNA duplexes. Lan, T.; McLaughlin, L. W. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 6512-13)



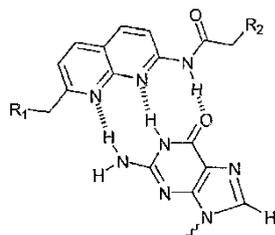
- (Effect of the Universal base 3-nitropyrrole on the selectivity of neighboring natural bases. Oliver, J. S.; Parker, K. A.; Suggs, J. W. *Organic Lett.*, 2001, 3, 1977-1980. 2. Effect of the 1-(2'-deoxy-β-D-ribofuranosyl)-3-nitropyrrole residue on the stability of DNA duplexes and triplexes. Amosova, O.; George J.; Fresco, J. R. *Nucleic Acids Res.*, 1997, 25, 1930-1934. 3. Synthesis, structure and deoxyribonucleic acid sequencing with a universal nucleosides: 1-(2'-deoxy-β-D-ribofuranosyl)-3-nitropyrrole. Bergstrom, D. E.; Zhang, P.; Toma, P. H.; Andrews, P. C.; Nichols, R. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, 1201-1209)



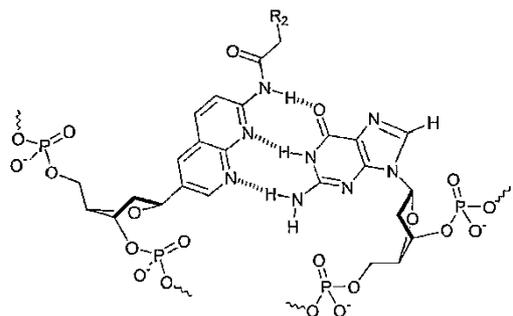
- (Model studies directed toward a general triplex DNA recognition scheme: a novel DNA base that binds a CG base-pair in an organic solvent. Zimmerman, S. C.; Schmitt, P. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, 10769-10770)



(A universal, photocleavable DNA base: nitropiperonyl 2'-deoxyriboside. *J. Org. Chem.*, 2001, 66, 2067-2071)



- (Recognition of a single guanine bulge by 2-acylamino-1,8-naphthyridine. Nakatani, K.; Sando, S.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 2172-2177. b. Specific binding of 2-amino-1,8-naphthyridine into single guanine bulge as evidenced by photooxidation of GC doublet, Nakatani, K.; Sando, S.; Yoshida, K.; Saito, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, 11, 335-337)



Modificaciones asimétricas

Los monómeros y métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para preparar un ARN, p.ej., un agente de ARNi, que puede modificarse asimétricamente como se describe en la presente memoria, y como se describe en la Solicitud Internacional núm. de serie PCT/US04/07070, presentada el 8 de marzo de 2004.

5 Un agente de ARNi modificado asimétricamente es uno en que una cadena tiene una modificación que no está presente en la otra cadena. Una modificación asimétrica es una modificación encontrada en una cadena pero no en la otra cadena. Cualquier modificación, p.ej., cualquier modificación descrita en la presente memoria, puede estar presente como una modificación asimétrica. Una modificación asimétrica puede conferir cualquiera de las propiedades deseadas asociadas con una modificación, p.ej., las propiedades tratadas en la presente memoria. P.ej., una modificación asimétrica puede: conferir resistencia a la degradación, una alteración en la vida media; 10 dirigir al agente de ARNi a una diana particular, p.ej., a un tejido particular; modular, p.ej., aumentar o disminuir, la afinidad de una cadena por su secuencia complemento o diana; o impedir o promover la modificación de un resto terminal, p.ej., modificación por una quinasa u otras enzimas implicadas en la ruta del mecanismo RISC. La designación de una modificación como que tiene una propiedad no significa que no tenga otra propiedad, p.ej., una modificación que se refiere como una que promueve la estabilización podría también mejorar el direccionamiento.

15 Aunque sin desear estar atados por la teoría o cualquier modelo mecanístico particular, se cree que la modificación asimétrica permite a un agente de ARNi optimizarse en vista de las funciones diferentes o "asimétricas" de las cadenas homosenrido y antisentido. Por ejemplo, ambas cadenas pueden modificarse para aumentar la resistencia a la nucleasa, sin embargo, como algunos cambios pueden inhibir la actividad de RISC, estos cambios pueden elegirse para la cadena homosenrido. Además, como algunas modificaciones, p.ej., restos de direccionamiento, 20 pueden añadir grupos muy voluminosos que, p.ej., pueden interferir con la actividad de escisión del complejo RISC, dichas modificaciones se sitúan preferiblemente en la cadena homosenrido. Por consiguiente, los restos de direccionamiento, especialmente los voluminosos (p.ej., colesterol), se añaden preferentemente a la cadena homosenrido. En una realización, una modificación asimétrica en que un fosfato de la estructura se sustituye con S, p.ej., una modificación de fosforotioato, está presente en la cadena antisentido, y una modificación 2', p.ej., 2' OMe está presente en la cadena homosenrido. Un resto de direccionamiento puede estar presente en cualquiera (o 25 ambos) extremos 5' o 3' de la cadena homosenrido del agente de ARNi. En un ejemplo preferido, un P de la estructura se sustituye con S en la cadena antisentido, 2'OMe está presente en la cadena homosenrido, y un resto de direccionamiento se añade a cualquiera de los extremos 5' o 3' de la cadena homosenrido del agente de ARNi.

30 En una realización preferida un agente de ARNi modificado asimétricamente tiene una modificación en la cadena homosenrido cuya modificación no se encuentra en la cadena antisentido y la cadena antisentido tiene una modificación que no se encuentra en la cadena homosenrido.

Cada cadena puede incluir una o más modificaciones asimétricas. Por medio de ejemplo: una cadena puede incluir una primera modificación asimétrica que confiere una primera propiedad en el agente de ARNi y la otra cadena puede tener una segunda modificación asimétrica que confiere una segunda propiedad en el ARNi. P.ej., una 35 cadena, p.ej., la cadena homosenrido puede tener una modificación que dirige al agente de ARNi a un tejido, y la otra cadena, p.ej., la cadena antisentido, tiene una modificación que promueve la hibridación con la secuencia génica diana.

40 En algunas realizaciones ambas cadenas puede modificarse para optimizar la misma propiedad, p.ej., para aumentar la resistencia a la degradación nucleolítica, pero se eligen diferentes modificaciones para las cadenas homosenrido y antisentido, p.ej., porque las modificaciones afectan a otras propiedades también. P.ej., como algunos cambios pueden afectar a la actividad de RISC estas modificaciones se eligen para la cadena homosenrido.

45 En una realización una cadena tiene una modificación 2' asimétrica, p.ej., una modificación 2' OMe, y la otra cadena tiene una modificación asimétrica de la estructura fosfato, p.ej., una modificación fosforotioato. Así que, en una realización la cadena antisentido tiene una modificación 2' OMe asimétrica y la cadena homosenrido tiene una modificación fosforotioato asimétrica (o viceversa). En una realización particularmente preferida el agente de ARNi tendrá modificaciones 2'-O alquilo asimétricas, preferiblemente 2'-OMe, en la cadena homosenrido y modificación P de la estructura asimétrica, preferiblemente una modificación fosforotioato en la cadena antisentido. Puede haber una o múltiples modificaciones 2'-OMe, p.ej., al menos 2, 3, 4, 5 o 6, de las subunidades de la cadena homosenrido pueden modificarse así. Puede haber una o múltiples modificaciones fosforotioato, p.ej., al menos 2, 3, 4, 5 o 6 de 50 las subunidades de la cadena antisentido pueden modificarse así. Es preferible tener un agente de ARNi en el que hay múltiples modificaciones 2'-OMe en la cadena homosenrido y múltiples modificaciones fosforotioato en la cadena antisentido. Todas las subunidades en una o ambas cadenas pueden modificarse así. Una realización particularmente preferida de modificación asimétrica múltiple en ambas cadenas tiene una región doble de aproximadamente 20-21, y preferiblemente 19, subunidades de longitud y uno o dos salientes 3' de aproximadamente 2 subunidades de longitud.

55 Las modificaciones asimétricas son útiles para promover la resistencia a la degradación mediante nucleasas, p.ej., endonucleasas. Los agentes de ARNi pueden incluir una o más modificaciones asimétricas que promueven la resistencia a la degradación. En realizaciones preferidas la modificación en la cadena antisentido es una que no interferirá con el silenciamiento de la diana, p.ej., una que no interferirá con la escisión de la diana. La mayoría si no todos los sitios en una cadena son vulnerables, en algún grado, a la degradación por endonucleasas. Se pueden 60

determinar sitios que son relativamente vulnerables e insertar modificaciones asimétricas que inhiben la degradación. Es a menudo deseable proporcionar una modificación asimétrica de un sitio UA en un agente de ARNi, y en algunos casos es deseable proveer a la secuencia UA en ambas cadenas con modificación asimétrica. Los ejemplos de modificaciones que inhiben la degradación endonucleolítica pueden encontrarse en la presente memoria. Modificaciones particularmente favorecidas incluyen: modificaciones 2', p.ej., provisión de un resto 2' OMe en el U, especialmente en una cadena homosentido; modificación de la estructura, p.ej., con la sustitución de un O con un S, en la estructura fosfato, p.ej., la provisión de una modificación fosforotioato, en el U o la A o ambos, especialmente en una cadena antisentido; sustitución del U con un conector amino C5; sustitución de la A con una G (los cambios de secuencia se prefiere que estén situados en la cadena homosentido y no en la cadena antisentido); y modificación de la en la posición 2', 6', 7' u 8'. Son realizaciones preferidas aquellas en que una o más de estas modificaciones están presentes en la cadena homosentido pero no en la antisentido, o realizaciones donde la cadena antisentido tiene menos de dichas modificaciones.

La modificación asimétrica puede usarse para inhibir la degradación por exonucleasas. Las modificaciones asimétricas pueden incluir aquellas en que solo una cadena se modifica además de aquellas en que ambas se modifican. En realizaciones preferidas la modificación en la cadena antisentido es una que no interferirá con el silenciamiento de la diana, p.ej., una que no interferirá con la escisión de la diana. Algunas realizaciones tendrán una modificación asimétrica en la cadena homosentido, p.ej., en un saliente 3', p.ej., en el extremo 3', y en la cadena antisentido, p.ej., en un saliente 3', p.ej., en el extremo 3'. Si las modificaciones introducen restos de diferentes tamaños es preferible que el mayor esté en la cadena homosentido. Si las modificaciones introducen restos de diferente carga es preferible que la que tenga mayor carga esté en la cadena homosentido.

Ejemplos de modificaciones que inhiben la degradación exonucleolítica pueden encontrarse en la presente memoria. Las modificaciones particularmente favorecidas incluyen: modificación 2', p.ej., provisión de un resto OMe 2' en un saliente 3', p.ej., en el extremo 3' (extremo 3' significa en el átomo 3' de la molécula o el resto más 3', p.ej., la posición más 3' P o 2', como se indica por el contexto); modificación de la estructura, p.ej., con la sustitución de un P con un S, p.ej., la provisión de una modificación de fosforotioato, o el uso de un P metilado en un saliente 3', p.ej., en el extremo 3'; combinación de una modificación 2', p.ej., provisión de un resto OMe 2' y modificación de la estructura, p.ej., con la sustitución de un P con un S, p.ej., la provisión de una modificación fosforotioato, o el uso de un P metilado, en un saliente 3', p.ej., en el extremo 3'; modificación con un alquilo 3'; modificación con una pirrolidina abásica en un saliente 3', p.ej., en el extremo 3'; modificación con naproxeno, ibuprofeno u otros restos que inhiben la degradación en el extremo 3'. Las realizaciones preferidas son aquellas en que una o más de esas modificaciones están presentes en la cadena homosentido pero no en la antisentido, o realizaciones donde la cadena antisentido tiene menos de dichas modificaciones.

Las modificaciones, p.ej., las descritas en la presente memoria, que afectan al direccionamiento pueden proporcionarse como modificaciones asimétricas. Las modificaciones de direccionamiento que pueden inhibir el silenciamiento, p.ej., inhibiendo la escisión de una diana, pueden proporcionarse como modificaciones asimétricas de la cadena homosentido. Un resto que altera la biodistribución, p.ej., colesterol, puede proporcionarse en una o más, p.ej., dos, modificaciones asimétricas de la cadena homosentido. Las modificaciones de direccionamiento que introducen restos que tienen un peso molecular relativamente grande, p.ej., un peso molecular de más de 400, 500 o 1000 daltons, o que introduce un resto cargado (p.ej., que tiene más de una carga positiva o una carga negativa) pueden situarse en la cadena homosentido.

Las modificaciones, p.ej., las descritas en la presente memoria, que modulan, p.ej., aumentan o disminuyen, la afinidad de una cadena por su complemento o diana, pueden proporcionarse como modificaciones asimétricas. Estas incluyen: 5 metil U; 5 metil C; pseudouridina, ácidos nucleicos bloqueados, 2 tio U y 2-amino-A. En algunas realizaciones uno o más de estos se proporciona en la cadena antisentido.

Los agentes de ARNi tienen una estructura definida, con una cadena homosentido y una cadena antisentido, y en muchos casos salientes monocatenarios cortos, p.ej., de 2 o 3 nucleótidos están presentes en uno o más extremos 3'. La modificación asimétrica puede usarse para optimizar la actividad de dicha estructura, p.ej., colocándose selectivamente en el ARNi. P.ej., la región terminal del agente de ARNi definido por el extremo 5' de la cadena homosentido y el extremo 3' de la cadena antisentido es importante para la función. Esta región puede incluir nucleótidos emparejados 2, 3 o 4 terminales y cualquier saliente 3'. En las realizaciones preferidas se usan las modificaciones asimétricas que dan por resultado uno o más de lo siguiente: modificaciones del extremo 5' de la cadena homosentido que inhibe la activación quinasa de la cadena homosentido, que incluye, p.ej., uniones de conjugados que dirigen la molécula o el uso de modificaciones que protegen frente a la degradación exonucleolítica 5'; o modificaciones de cualquier cadena, pero preferiblemente de la cadena homosentido, que mejoran la unión entre la cadena homosentido y antisentido y promueven así una estructura "apretada" a este extremo de la molécula.

La región terminal del agente de ARNi definido por el extremo 3' de la cadena homosentido y el extremo 5' de la cadena antisentido es también importante para la función. Esta región puede incluir los nucleótidos terminales emparejados 2, 3 o 4 y cualquier saliente 3'. Las realizaciones preferidas incluyen modificaciones asimétricas de cualquier cadena, pero preferiblemente la cadena homosentido, que disminuyen la unión entre la cadena homosentido y antisentido y por lo tanto promueven una estructura "abierta" en este extremo de la molécula. Dichas modificaciones incluyen disponer conjugados que dirigen la molécula o modificaciones que promueven la resistencia

a la nucleasa en la cadena homosenido en esta región. La modificación de la cadena antisenido que inhiben la activación quinasa se evitan en las realizaciones preferidas.

Modificaciones ejemplares para disposición asimétrica en la cadena homosenido incluyen las siguientes:

- 5 (a) modificaciones de la estructura, p.ej., modificación de un P de la estructura, que incluye la sustitución de P con S, o P sustituido con alquilo o alilo, p.ej., Me, y ditioatos (S-P=S); estas modificaciones pueden usarse para promover la resistencia a la nucleasa;
- 10 (b) 2'-O-alquilo, p.ej., 2'-OMe, 3'-O-alquilo, p.ej., 3'-OMe (en posiciones terminal y/o interna); estas modificaciones pueden usarse para promover la resistencia a la nucleasa o para mejorar la unión de la cadena homosenido o antisenido, las modificaciones 3' pueden usarse en el extremo 5' de la cadena homosenido para evitar la activación de la cadena homosenido por RISC;
- (c) uniones 2'-5' (con 2'-H, 2'-OH y 2'-OMe y con P=O o P=S) estas modificaciones pueden usarse para promover la resistencia a la nucleasa o para inhibir la unión de la cadena homosenido a la antisenido, o puede usarse en el extremo 5' de la cadena homosenido para evitar la activación de la cadena homosenido por RISC;
- 15 (d) azúcares L (p.ej., L-ribosa, L-arabinosa con 2'-H, 2'-OH y 2'-OMe); estas modificaciones pueden usarse para promover la resistencia a la nucleasa o para inhibir la unión de la cadena homosenido a la antisenido, o pueden usarse en el extremo 5' de la cadena homosenido para evitar la activación de la cadena homosenido por RISC;
- 20 (e) azúcares modificados (p.ej., ácidos nucleicos bloqueados (LNA), ácidos nucleicos de hexosa (HNA) y ácidos nucleicos de ciclohexeno (CeNA)); estas modificaciones pueden usarse para promover la resistencia a la nucleasa o para inhibir la unión de la cadena homosenido a la cadena antisenido, o puede usarse en el extremo 5' de la cadena homosenido para evitar la activación de la cadena por RISC;
- (f) modificaciones de nucleobase (p.ej., pirimidinas C-5 modificadas, purinas N-2 modificadas, purinas N-7 modificadas, purinas N-6 modificadas), estas modificaciones pueden usarse para promover la resistencia a la nucleasa o para mejorar la unión de la cadena homosenido a la antisenido;
- 25 (g) grupos catiónicos y grupos Zwitteriónicos (preferiblemente en un extremo), estas modificaciones pueden usarse para promover la resistencia a la nucleasa;
- (h) grupos conjugados (preferiblemente en posiciones terminales), p.ej., naproxeno, biotina, colesterol, ibuprofeno, ácido fólico, péptidos y carbohidratos; estas modificaciones pueden usarse para promover la resistencia a la nucleasa o para dirigir la molécula, o puede usarse en el extremo 5' de la cadena homosenido para evitar la activación de la cadena homosenido por RISC.
- 30 Modificaciones ejemplares para la disposición asimétrica en la cadena antisenido incluyen las siguientes:
- (a) modificaciones de la estructura, p.ej., modificación de un P de la estructura, que incluye sustitución de P con S, o P sustituido con alquilo o alilo, p.ej., Me, y ditioatos (S-P=S);
- (b) 2'-O-alquilo, p.ej., 2'-OMe (en posiciones terminales);
- 35 (c) uniones 2'-5' (con 2'-H, 2'-OH y 2'-OMe) p.ej., terminales en el extremo 3'); p.ej., con P=O o P=S preferiblemente en el extremo 3', estas modificaciones se excluyen preferiblemente de la región terminal 5' ya que pueden interferir con la actividad enzimática de RISC tal como actividad quinasa;
- (d) azúcares L (p.ej., L-ribosa, L-arabinosa con 2'-H, 2'-OH y 2'-OMe); p.ej., terminales en el extremo 3'; p.ej., con P=O o P=S preferiblemente en el extremo 3', estas modificaciones se excluyen preferiblemente de la región terminal 5' ya que pueden interferir con la actividad quinasa;
- 40 (e) azúcares modificados (p.ej., LNA, HNA y CeNA); estas modificaciones se excluyen preferiblemente de la región terminal 5' ya que pueden contribuir a aumentos indeseados de emparejamientos entre las cadenas homosenido y antisenido, se prefiere a menudo tener una estructura "floja" en la región 5', adicionalmente, pueden interferir con la actividad quinasa;
- 45 (f) modificaciones de nucleobase (p.ej., pirimidinas C-5 modificadas, purinas N-2 modificadas, purinas N-7 modificadas, purinas N-6 modificadas);
- (g) grupos catiónicos y grupos Zwitteriónicos (preferiblemente en un extremo); grupos conjugados (preferiblemente en posiciones terminales), p.ej., naproxeno, biotina, colesterol, ibuprofeno, ácido fólico, péptidos y carbohidratos, pero grupos voluminosos o generalmente grupos que inhiben la actividad RISC se preferirían menos.
- 50 El 5'-OH de la cadena antisenido debería dejarse libre para promover la actividad. En algunas realizaciones preferidas las modificaciones que promueven la resistencia a la nucleasa deberían incluirse en el extremo 3', particularmente en el saliente 3'.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un método para optimizar, p.ej., estabilizar, un agente de ARNi. El método incluye seleccionar una secuencia que tiene actividad, introducir una o más modificaciones asimétricas en la secuencia, en la que la introducción de la modificación asimétrica optimiza una propiedad del agente de ARNi pero no da por resultado una disminución en la actividad.

- 5 La disminución en la actividad puede ser menor que un nivel preseleccionado de disminución. En las realizaciones preferidas la disminución en la actividad significa una disminución de menos de 5, 10, 20, 40 o 50% de la actividad, en comparación con un ARNi por lo demás similar que carece de la modificación introducida. La actividad puede medirse, p.ej., in vivo, o in vitro, siendo un resultado en cualquiera suficiente para demostrar el mantenimiento de actividad necesario.
- 10 La propiedad optimizada puede ser cualquier propiedad descrita en la presente memoria y en particular las propiedades tratadas en la sección en modificaciones asimétricas proporcionada en la presente memoria. La modificación puede ser cualquier modificación asimétrica, p.ej., una modificación asimétrica descrita en la sección en modificaciones asimétricas descrita en la presente memoria. Modificaciones asimétricas particularmente preferidas son modificaciones 2'-Oalquilo, p.ej., modificaciones 2'-OMe, particularmente en la secuencia homosentido, y modificaciones de un O estructural, particularmente modificaciones fosforotioato, en la secuencia antisentido.
- 15

En una realización preferida se selecciona una secuencia homosentido y se provee con una modificación asimétrica, mientras en otras realizaciones se selecciona una secuencia antisentido y se provee con una modificación asimétrica. En algunas realizaciones tanto la secuencia homosentido como la antisentido se seleccionan y cada una se provee con una o más modificaciones asimétricas.

- 20 Pueden introducirse múltiples modificaciones asimétricas en cualquiera o ambas de las secuencias homosentido y antisentido. Una secuencia puede tener al menos 2, 4, 6, 8 o más modificaciones y todos o esencialmente todos los monómeros de una secuencia pueden modificarse.

La tabla 2 muestra ejemplos que tienen la cadena I con una modificación seleccionada y la cadena II con una modificación seleccionada.

- 25 Tabla 2. Modificaciones ejemplares de la cadena I y la cadena II

Cadena I	Cadena II
Resistencia a la nucleasa (p.ej., 2'-OMe)	Biodistribución (p.ej., P=S)
Conjugado de biodistribución (p.ej., lipófilo)	Funcionalidad de unión a proteína (p.ej., Naproxeno)
Funcionalidad de distribución tisular (p.ej., carbohidratos)	Funcionalidad de direccionamiento celular (p.ej., folato para células cancerígenas)
Funcionalidad de distribución tisular (p.ej., restos de direccionamiento a células renales)	Funcionalidad fusogénica (p.ej., polietileniminas)
Direccionamiento a células cancerígenas (p.ej., péptidos RGD e iminas)	Funcionalidad fusogénica (p.ej., péptidos)
Resistencia a la nucleasa (p.ej., 2'-OMe)	Aumento en la afinidad de unión (5-Me-C, 5-Me-U, 2-tio-U, 2-amino-A, G-clamp, LNA)
Funcionalidad de distribución tisular	Funcionalidad de mejora de la actividad de RISC
Funcionalidades de cambio de conformación helicoidal	Funcionalidad de distribución tisular (P=S; lipófilo, carbohidratos)

Arquitectura Z-X-Y

- 30 Los monómeros y métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para preparar un ARN, p.ej., un agente de ARNi, que tiene una arquitectura o estructura Z-X-Y tal como los descritos en la presente memoria y los descritos en la Solicitud Provisional de Estados Unidos en copropiedad y en tramitación con la presente núm. de serie 60/510.246, presentada el 9 de octubre de 2003, la Solicitud provisional de Estados Unidos en copropiedad y en tramitación con la presente núm. de serie 60/510.318, presentada el 10 de octubre de 2003, y la Solicitud Internacional en copropiedad y en tramitación con la presente núm. PCT/US04/07070, presentada el 8 de marzo de 2004.

Por consiguiente, un agente de ARNi puede tener un primer segmento, la región Z, un segundo segmento, la región X, y opcionalmente una tercera región, la región Y:

Z-X-Y.

5 Puede ser deseable modificar las subunidades en uno o ambos de Z y/o Y por un lado y X por el otro lado. En algunos casos tendrán la misma modificación o la misma clase de modificación pero será más habitual el caso de que las modificaciones hechas en Z y/o Y diferirán de las hechas en X.

10 La región Z típicamente incluye un extremo de un agente de ARNi. La longitud de la región Z puede variar, pero será típicamente de 2-14, más preferiblemente 2-10, subunidades de longitud. Es típicamente monocatenaria, es decir, no tendrá emparejamiento de bases con las bases de otra cadena, aunque puede en algunas realizaciones auto-asociarse, p.ej., para formar una estructura en bucle. Dichas estructuras pueden formarse mediante la formación de un bucle en el extremo de la cadena y formando un fragmento doble intracadena. P.ej., pueden formarse 2, 3, 4, 5 o más pares de bases intra-cadena, que tienen una región de salida del bucle o de conexión, típicamente de 2 o más subunidades que no se emparejan. Esto puede ocurrir en uno o ambos extremos de una cadena. Una realización típica de una región Z es un saliente monocatenario, p.ej., un saliente de la longitud descrita en otra parte en la presente memoria. La región Z puede por consiguiente ser o incluir una cadena sencilla terminal 3' o 5'. Puede ser una cadena hom sentido o antisentido pero si es antisentido se prefiere que sea un saliente 3'. Los enlaces entre subunidades típicos en la región Z incluyen: P=O; P=S; S-P=S; P-NR₂; y P-Br₂. También pueden estar presentes enlaces entre subunidades P=X quirales (donde X es S, N o B). (Estos enlaces entre subunidades se tratan en más detalle en otra parte en la presente memoria). Otras modificaciones de subunidad de la región Z preferidas (también tratadas en otra parte en la presente memoria) pueden incluir: modificaciones y restos 3'-OR, 3'SR, 2'-OMe, 3'-OMe y 2'-OH; bases de configuración alfa; y modificaciones 2' arabino.

25 La región X será un fragmento doble en la mayoría de los casos, en el caso de un agente de ARNi monocatenario, con una región correspondiente de la cadena sencilla, o en el caso de un agente de ARNi bicatenario, con la región correspondiente de la otra cadena. La longitud de la región X puede variar pero será típicamente de entre 10-45 y lo más preferible entre 15 y 35 subunidades. Las regiones X particularmente preferidas incluirán 17, 18, 19, 29, 21, 22, 23, 24 o 25 pares de nucleótidos, aunque se describen otras longitudes adecuadas en otra parte de la presente memoria y pueden usarse. Las subunidades de la región X típicas incluyen subunidades 2'-OH. En realizaciones típicas se prefieren enlaces fosfato entre subunidades mientras que los enlaces fosforotioato o no fosfato están ausentes. Otras modificaciones preferidas en la región X incluyen: modificaciones para mejorar el enlace, p.ej., modificaciones de nucleobase; modificaciones de nucleobase catiónicas; y pirimidinas C-5 modificadas; p.ej., ailaminas. Algunas realizaciones tienen 4 o más subunidades 2'OH consecutivas. Aunque el uso de fosforotioato no se prefiere a veces pueden usarse si conectan menos de 4 subunidades 2'OH consecutivas.

35 La región Y generalmente se ajustará a los parámetros presentados para las regiones Z. Sin embargo, las regiones X y Z no necesitan ser iguales, pueden estar presentes diferentes tipos y números de modificaciones, y de hecho, una será normalmente un saliente 3' y una será normalmente un saliente 5'.

En una realización preferida el agente de ARNi tendrá una región Y y/o Z que tiene cada una ribonucleósidos en que el 2'-OH está sustituido, p.ej., con 2'-OMe u otro alquilo; y una región X que incluye al menos cuatro subunidades de ribonucleósido consecutivas en que el 2'-OH permanece sin sustituir.

40 Las uniones de subunidad (las uniones entre subunidades) de un agente de ARNi pueden modificarse, p.ej., para promover la resistencia a la degradación. Numerosos ejemplos de dichas modificaciones se describen en la presente memoria, un ejemplo de las cuales es la unión fosforotioato. Estas modificaciones pueden proporcionarse entre las subunidades de cualquiera de las regiones Y, X y Z. Sin embargo, se prefiere que su existencia se minimice y en particular se prefiere que se eviten las uniones modificadas consecutivas.

45 En una realización preferida el agente de ARNi tendrá una región Y y Z que tiene cada una ribonucleósidos en que el 2'-OH está sustituido, p.ej., con 2'-OMe; y una región X que incluye al menos cuatro subunidades consecutivas, p.ej., subunidades de ribonucleósido en que el 2'-OH permanece sin sustituir.

50 Como se menciona anteriormente, las uniones de subunidades de un agente de ARNi pueden modificarse, p.ej., para promover la resistencia a la degradación. Estas modificaciones pueden proporcionarse entre las subunidades de cualquiera de las regiones Y, X y Z. Sin embargo, se prefiere que se minimicen y en particular se prefiere que se eviten las uniones modificadas consecutivas.

55 Por consiguiente, en una realización preferida, no todas las uniones de subunidades del agente de ARNi están modificadas y más preferiblemente el número máximo de subunidades consecutivas unidas por un enlace diferente a fosfodiéster serán 2, 3 o 4. Los agentes de ARNi particularmente preferidos no tendrán cuatro o más subunidades consecutivas, p.ej., subunidades de ribonucleósido 2'-hidroxilo, en que cada subunidad se une por uniones modificadas – es decir, uniones que se han modificado para estabilizarlas de la degradación en comparación con las uniones fosfodiéster que se dan de forma natural en ARN y ADN.

- Se prefiere particularmente minimizar la existencia en la región X. Por consiguiente, en las realizaciones preferidas cada una de las uniones de subunidades de nucleósido en X serán uniones fosfodiéster, o si las uniones de subunidades en la región X se modifican, dichas modificaciones se minimizarán. P.ej., aunque las regiones Y y/o Z pueden incluir uniones entre subunidades que se han estabilizado frente a la degradación, dichas modificaciones se minimizarán en la región X, y en particular las modificaciones consecutivas se minimizarán. Por consiguiente, en las realizaciones preferidas el número máximo de subunidades consecutivas unidas por enlaces distintos a fosfodiéster será 2, 3 o 4. Las regiones X particularmente preferidas no tendrán cuatro o más subunidades consecutivas, p.ej., subunidades de ribonucleósido 2'-hidroxilo, en que cada subunidad se une por uniones modificadas – es decir uniones que se han modificado para estabilizarlas de la degradación en comparación con las uniones fosfodiéster que se dan de forma natural en ARN y ADN.
- En una realización preferida Y y/o Z estarán libres de uniones fosforotioato, aunque cualquiera o ambas pueden contener otras modificaciones, p.ej., otras modificaciones de las uniones de las subunidades.
- En una realización preferida la región X, o en algunos casos, el agente de ARNi entero, no tiene más de 3 o no más de 4 subunidades que tengan restos 2' idénticos.
- En una realización preferida la región X, o en algunos casos, el agente de ARNi entero, no tiene más de 3 o no más de 4 subunidades que tienen uniones de subunidades idénticas.
- En una realización preferida una o más uniones de fosforotioato (u otras modificaciones de la unión de subunidades) están presentes en Y y/o Z, pero dichas uniones modificadas no conectan dos subunidades adyacentes, p.ej., nucleósidos, que tienen una modificación 2', p.ej., un resto 2' –O-alquilo. P.ej., cualquiera de restos 2' –O-alquilo adyacentes en la Y y/o Z, están conectados por una unión distinta de una unión fosforotioato.
- En una realización preferida cada uno de Y y/o Z tiene independientemente solo una unión fosforotioato entre subunidades adyacentes, p.ej., nucleósidos, que tienen una modificación 2', p.ej., nucleósidos 2' –O-alquilo. Si hay un segundo conjunto de subunidades adyacentes, p.ej., nucleósidos, que tienen una modificación 2', p.ej., nucleósidos 2' –O-alquilo, en Y y/o Z ese segundo conjunto está conectado por una unión distinta de una unión fosforotioato, p.ej., una unión modificada distinta de una unión fosforotioato.
- En una realización preferida cada uno de Y y/o Z tiene independientemente más de una unión fosforotioato que conecta pares adyacentes de subunidades, p.ej., nucleósidos, que tienen una modificación 2', p.ej., nucleósidos 2' –O-alquilo, pero al menos un par de subunidades adyacentes, p.ej., nucleósidos, que tienen una modificación 2', p.ej., nucleósidos 2' –O-alquilo, se van a conectar mediante una unión distinta a una unión fosforotioato, p.ej., una unión modificada distinta de una unión fosforotioato.
- En una realización preferida una de las limitaciones enumeradas anteriormente en subunidades adyacentes en Y y/o Z se combina con una limitación en las subunidades en X. P.ej., una o más uniones fosforotioato (u otras modificaciones de la unión de subunidades) están presentes en Y y/o Z, pero dichas uniones modificadas no conectan dos subunidades adyacentes, p.ej., nucleósidos, que tienen una modificación 2', p.ej., un resto 2' –O-alquilo. P.ej., cualquier resto 2' –O-alquilo adyacente en la Y y/o Z, están conectados por una unión diferente de una unión fosforotioato. Además, la región X tiene no más de 3 o no más de 4 subunidades idénticas, p.ej., subunidades que tienen restos 2' idénticos o la región X no tiene más de 3 o no más de 4 subunidades que tienen uniones de subunidades idénticas.
- Una región Y y/o Z puede incluir al menos una, y preferiblemente 2, 3 o 4 de una modificación descrita en la presente memoria. Dichas modificaciones puede elegirse, independientemente, de cualquier modificación descrita en la presente memoria, p.ej., a partir de subunidades resistentes a la nucleasa, subunidades con bases modificadas, subunidades con uniones entre subunidades modificadas, subunidades con azúcares modificados, y subunidades unidas a otro resto, p.ej., un resto de direccionamiento. En una realización preferida más de 1 de dichas subunidades pueden estar presentes pero en algunas realizaciones se prefiere que no más de 1, 2, 3 o 4 de dichas modificaciones se den, o se den de forma consecutiva. En una realización preferida la frecuencia de la modificación diferirá entre Y y/o Z y X, p.ej., la modificación estará presente en una de Y y/o Z o X y ausente en la otra.
- Una región X puede incluir al menos una, y preferiblemente 2, 3, o 4 de una modificación descrita en la presente memoria. Dichas modificaciones pueden elegirse, independientemente, de cualquier modificación descrita en la presente memoria, p.ej., de subunidades resistentes a la nucleasa, subunidades con bases modificadas, subunidades con uniones entre subunidades modificadas, subunidades con azúcares modificados, y subunidades unidas a otro resto, p.ej., un resto de direccionamiento. En una realización preferida más de 1 de dichas subunidades pueden estar presentes pero en algunas realizaciones se prefiere que no se den más de 1, 2, 3 o 4 de dichas modificaciones, o que se den de forma consecutiva.
- Una SMSR (descrita en otra parte de la presente memoria) puede introducirse en uno o más puntos en una o ambas cadenas de un agente de ARNi bicatenario. Una SMSR puede situarse en una región Y y/o Z, a o cerca (a 1, 2 o 3 posiciones) del extremo 3' o 5' de la cadena homsentido o a o cerca (a 2 o 3 posiciones del) extremo 3' de la cadena antisentido. En algunas realizaciones se prefiere no tener una SMSR a o cerca (a 1, 2, o 3 posiciones del)

extremo 5' de la cadena antisentido. Una SMSR puede situarse en la región X, y se situará preferiblemente en la cadena homosenntido o en el área de la cadena antisentido no crítica para la unión antisentido a la diana.

Modificación diferencial de la estabilidad del fragmento doble terminal

5 En un aspecto, los monómeros y métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para preparar un agente de ARNi que tiene modificación diferencial de la estabilidad del fragmento doble terminal (DMTDS).

Además, los monómeros y métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para preparar agentes de ARNi que tienen DMTDS y otros elementos descritos en la presente memoria. P.ej., los monómeros y métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para preparar un agente de ARNi descrito en la presente memoria, p.ej., un agente de ARNi palindrómico, un agente de ARNi que tienen un emparejamiento no canónico, un agente de ARNi que tiene como objetivo un gen descrito en la presente memoria, p.ej., un gen activo en el riñón, un agente de ARNi que tiene una arquitectura o estructura descrita en la presente memoria, un ARNi asociado con un agente de distribución anfipático descrito en la presente memoria, un ARNi asociado con un módulo de distribución de fármacos descrita en la presente memoria, un agente de ARNi administrado como se describe en la presente memoria, o un agente de ARNi formulado como se describe en la presente memoria, que también incorpora DMTDS.

20 Los agentes de ARNi pueden optimizarse aumentando la propensión del fragmento doble a desasociar o fundir (disminuyendo la energía libre de la asociación del fragmento doble), en la región del extremo 5' del fragmento doble de la cadena antisentido. Esto puede conseguirse, p.ej., mediante la inclusión de subunidades que aumentan la propensión del fragmento doble a desasociarse o fundir en la región del extremo 5' de la cadena antisentido. Puede conseguirse también mediante la unión de un ligando que aumenta la propensión del fragmento doble a desasociarse o fundir en la región de la cadena 5'. Aunque sin desear estar atado por la teoría, el efecto puede deberse a la promoción del efecto de una enzima tal como una helicasa, por ejemplo, promoviendo el efecto de la enzima en la proximidad del extremo 5' de la cadena antisentido.

25 Los inventores también han descubierto que los agentes de ARNi pueden optimizarse disminuyendo la propensión del fragmento doble a desasociarse o fundir (aumentando la energía libre de la asociación del fragmento doble) en la región del extremo 3' del fragmento doble de la cadena antisentido. Esto puede conseguirse, p.ej., mediante la inclusión de subunidades que disminuyen la propensión del fragmento doble a desasociarse o fundir en la región del extremo 3' de la cadena antisentido. Puede también conseguirse mediante la unión del ligando que disminuye la propensión del fragmento doble a desasociarse o fundir en la región del extremo 5'.

30 Las modificaciones que aumentan la tendencia del extremo 5' del fragmento doble a desasociarse pueden usarse solas o en combinación con otras modificaciones descritas en la presente memoria, p.ej., con modificaciones que disminuyen la tendencia del extremo 3' del fragmento doble a desasociarse. Asimismo, las modificaciones que disminuyen la tendencia del extremo 3' del fragmento doble a desasociarse pueden usarse solas o en combinación con otras modificaciones descritas en la presente memoria, p.ej., con modificaciones que aumentan la tendencia del extremo 5' del fragmento doble a desasociarse.

Disminución de la estabilidad del extremo 5' AS del fragmento doble

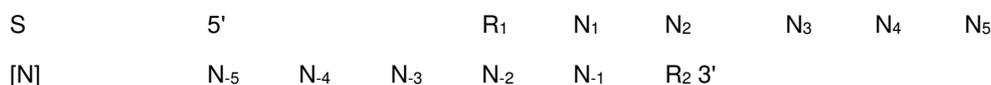
40 Los pares de subunidades pueden ordenarse en base a su propensión a promover la disociación o fusión (p.ej., en la energía libre de asociación o disociación de un emparejamiento particular, el enfoque más sencillo es examinar los pares en base a un par individual, aunque también puede usarse el análisis del vecino de al lado o similar). En términos de promoción de la disociación:

A:U	se prefiere sobre	G:C;
G:U	se prefiere sobre	G:C;
I:C	se prefiere sobre	G:C (I=inosina);

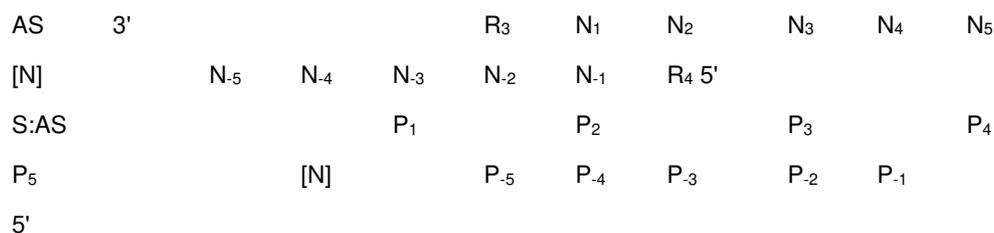
Malapareamientos, p.ej., emparejamientos no canónicos o diferentes de los canónicos (como se describe en otra parte en la presente memoria) se prefieren sobre los emparejamientos canónicos (A:T, A:U, G:C);

Los emparejamientos que incluyen una base universal se prefieren sobre los emparejamientos canónicos.

45 Se puede hacer un diagrama de un agente de ARNi bc típico como sigue:



ES 2 702 942 T3



S indica la cadena homosenidido; AS indica la cadena antisentido; R₁ indica un saliente de la cadena homosenidido 5' opcional (y no preferido); R₂ indica un saliente homosenidido 3' opcional (aunque preferido), R₃ indica un saliente antisentido homosenidido 3' opcional (aunque preferido); R₄ indica un saliente antisentido 5' opcional (y no preferido); N indica subunidades; [N] indica que pueden estar presentes pares de subunidades adicionales; y P_x indica un emparejamiento de N_x homosenidido y N_x antisentido. Los salientes no se muestran en el diagrama P. En algunas realizaciones un saliente AS 3' corresponde a la región Z, la región del fragmento doble corresponde a la región X, y el saliente de la cadena S 3' corresponde a la región Y, como se describe en otra parte en la presente memoria. (El diagrama no pretende implicar longitudes máximas o mínimas, sobre lo que se proporciona guía en otra parte en la presente memoria).

Se prefiere que los emparejamientos que disminuyen la propensión a formar un fragmento doble se usen en 1 o más posiciones en el fragmento doble en el extremo 5' de la cadena AS. El par terminal (el par más 5' en términos de la cadena AS) se designa como P₋₁, y las posiciones de emparejamiento posteriores (yendo en la dirección 3' en términos de la cadena AS) en el fragmento doble se designan, P₋₂, P₋₃, P₋₄, P₋₅, etcétera. La región preferida en que modificar para modular la formación del fragmento doble es en P₋₅ a P₋₁, más preferiblemente P₋₄ a P₋₁, más preferiblemente P₋₃ a P₋₁. La modificación en P₋₁, se prefiere particularmente, sola o con modificación(ones) en otra(s) posición(ones), p.ej., cualquiera de las posiciones recién identificadas. Se prefiere que al menos 1, y más preferiblemente 2, 3, 4 o 5 de los pares de una de las regiones enumeradas se elijan independientemente del grupo de:

- A:U
- G:U
- I:C

Pares malapareados, p.ej., emparejamientos no canónicos o distintos de los canónicos o emparejamientos que incluyen una base universal.

En realizaciones preferidas el cambio en la subunidad necesario para alcanzar un emparejamiento que promueva la disociación se hará en la cadena homosenidido, aunque en algunas realizaciones el cambio se hará en la cadena antisentido.

En una realización preferida los al menos 2, o 3, de los pares en P₋₁, a P₋₄, son pares que promueven la disociación.

En una realización preferida los al menos 2, o 3, de los pares en P₋₁, a P₋₄, son A:U.

En una realización preferida los al menos 2, o 3, de los pares en P₋₁, a P₋₄, son G:U.

En una realización preferida los al menos 2, o 3, de los pares en P₋₁, a P₋₄, son I:C.

En una realización preferida los al menos 2, o 3, de los pares en P₋₁, a P₋₄, son pares malapareados, p.ej., emparejamientos emparejamientos no canónicos o distintos a los canónicos.

En una realización preferida los al menos 2, o 3, de los pares en P₋₁, a P₋₄, son emparejamientos que incluyen una base universal.

Aumento de la estabilidad del extremo 3' AS del fragmento doble

Los pares de subunidad pueden ordenarse en base a su propensión a promover la estabilidad e inhibir la disociación o fusión (p.ej., en la energía libre de asociación o disociación de un emparejamiento particular, el enfoque más sencillo es examinar los pares en base a un par individual, aunque pueden usarse también el análisis del vecino de al lado o similar). En términos de promoción de la estabilidad del fragmento doble:

G:C se prefiere sobre A:U

Se prefieren las parejas de Watson-Crick (A:T, A:U, G:C) sobre los emparejamientos no canónicos o distintos de los canónicos.

Se prefieren los análogos que aumentan la estabilidad sobre las parejas de Watson-Crick (A:T, A:U, G:C)

2-amino-A:U se prefiere sobre A:U

2-tioU o 5Me-tio-U:A se prefieren sobre U:A

G-clamp (un análogo de C que tiene 4 enlaces de hidrógeno):G se prefiere sobre C:G

5 Guanadino-G-clamp:G se prefiere sobre C:G

Pseudo uridina:A se prefiere sobre U:A

10 Las modificaciones de azúcar, p.ej., modificaciones 2', p.ej., 2'F, ENA, o LNA, que mejoran el enlace se prefieren sobre restos no modificados y pueden estar presentes en una o ambas cadenas para mejorar la estabilidad del fragmento doble. Se prefiere que los emparejamientos que aumentan la propensión para formar un fragmento doble se usen a 1 o más de las posiciones en el fragmento doble en el extremo 3' de la cadena AS. El par terminal (el par más 3' en términos de la cadena AS) se designa como P₁, y las posteriores posiciones de emparejamiento (yendo en la dirección 5' en términos de la cadena AS) en el fragmento doble se designan, P₂, P₃, P₄, P₅, etcétera. La región preferida en que modificar para modular la formación del fragmento doble es a P₅ a P₁, más preferiblemente P₄ a P₁, más preferiblemente P₃ a P₁. La modificación en P₁, se prefiere particularmente, sola o con modificación(ones) en otra(s) posición(ones), p.ej., cualquiera de las posiciones recién identificadas. Se prefiere que al menos 1, y más preferiblemente 2, 3, 4 o 5 de los pares de las regiones enumeradas se elijan independientemente del grupo de:

G:C

Un par que tiene un análogo que aumenta la estabilidad sobre las parejas de Watson-Crick (A:T, A:U, G:C)

2-amino-A:U

20 2-tio U o 5 Me-tio-U:A

G-clamp (un análogo de C que tiene 4 enlaces hidrógeno):G

Guanadino-G-clamp:G

Pseudouridina:A

25 Un par en que una o ambas subunidades tiene una modificación de azúcar, p.ej., una modificación 2', p.ej., 2'F, ENA o LNA, que mejora la unión.

En una realización preferida los al menos 2, o 3, de los pares en P₋₁, a P₋₄, son pares que promueven la estabilidad del fragmento doble.

En una realización preferida los al menos 2, o 3, de los pares en P₁, a P₄, son G:C.

30 En una realización preferida los al menos 2, o 3, de los pares en P₁, a P₄, son un par que tienen un análogo que aumenta la estabilidad sobre las parejas de Watson-Crick.

En una realización preferida los al menos 2, o 3, de los pares en P₁, a P₄, son 2-amino-A:U.

En una realización preferida los al menos 2, o 3, de los pares en P₁, a P₄, son 2-tio U o 5 Me-tio-U:A.

En una realización preferida los al menos 2, o 3, de los pares en P₁, a P₄, son G-clamp:G.

En una realización preferida los al menos 2, o 3, de los pares en P₁, a P₄, son guanidino-G-clamp:G.

35 En una realización preferida los al menos 2, o 3, de los pares en P₁, a P₄, son pseudo-uridina:A.

En una realización preferida los al menos 2, o 3, de los pares en P₁, a P₄, son un par en que una o ambas subunidades tienen una modificación de azúcar, p.ej., una modificación 2', p.ej., 2'F, ENA o LNA, que mejora la unión.

40 Los G-clamps y los guanidino G-clamps se tratan en las siguientes referencias: Holmes y Gait, "The Synthesis of 2'-O-Methyl G-Clamp Containing Oligonucleotides and Their Inhibition of the HIV-1 Tat-TAR Interaction", *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 22:1259-1262, 2003; Holmes *et al.*, "Steric inhibition of human immunodeficiency virus type-1 Tat-dependent trans-activation in vitro and in cells by oligonucleotides containing 2'-O-methyl G-clamp ribonucleoside analogues", *Nucleic Acids Research*, 31:2759-2768, 2003; Wilds, *et al.*, "Structural basis for recognition of guanosine by a synthetic tricyclic cytosine analogue: Guanidinium G-clamp", *Helvetica Chimica Acta*, 86:966-978, 2003; Rajeev, *et al.*, "High-Affinity Peptide Nucleic Acid Oligomers Containing Tricyclic Cytosine Analogues", *Organic Letters*, 4:4395-4398, 2002; Ausin, *et al.*, "Synthesis of Amino- and Guanidino-G-Clamp PNA

45

Monomers", *Organic Letters*, 4:4073-4075, 2002; Maier *et al.*, "Nuclease resistance of oligonucleotides containing the tricyclic cytosine analogues phenoxazine and 9-(2-aminoethoxy)-phenoxazine ("G-clamp") and origin of their nuclease resistance properties", *Biochemistry*, 41:1323-7, 2002; Flanagan, *et al.*, "A cytosine analog that confers enhanced potency to antisense oligonucleotides", *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 96:3513-8, 1999.

Disminuir simultáneamente la estabilidad del extremo 5' AS del fragmento doble y aumentar la estabilidad del extremo 3' AS del fragmento doble

Como se trata anteriormente, un agente de ARNi puede modificarse para disminuir la estabilidad del extremo 5' AS del fragmento doble y aumentar la estabilidad del extremo 3' AS del fragmento doble. Esto puede efectuarse combinando una o más de las modificaciones que disminuyen la estabilidad en el extremo 5' AS del fragmento doble con una o más de las modificaciones que aumentan la estabilidad en el extremo 3' AS del fragmento doble. Por lo tanto una realización preferida incluye la modificación en P₅ a P₋₁, más preferiblemente P₄ a P₋₁ y más preferiblemente P₃ a P₋₁. La modificación a P₋₁ se prefiere particularmente, sola o con otra posición, p.ej., las posiciones recién identificadas. Se prefiere que al menos 1, y más preferiblemente 2, 3, 4 o 5 de los pares de una de las regiones enumeradas del extremo 5' AS de la región del fragmento doble se elija independientemente del grupo de:

A:U

G:U

I:C

Pares malapareados, p.ej., emparejamientos no canónicos o distintos de los canónicos que incluyen una base universal; y

Una modificación en P₅ a P₁, más preferiblemente P₄ a P₁ y más preferiblemente P₃ a P₁. La modificación a P₁, se prefiere particularmente, sola o con otra posición, p.ej., las posiciones recién identificadas. Se prefiere que al menos 1, y más preferiblemente 2, 3, 4 o 5 de los pares de una de las regiones enumeradas del extremo 3' AS de la región doble se elija independientemente del grupo de:

G:C

Un par que tiene un análogo que aumenta la estabilidad sobre las parejas de Watson-Crick (A:T, A:U, G:C)

2-amino-A:U

2-tio U o 5 Me-tio-U:A

G-clamp (un análogo de C que tiene 4 enlaces de hidrógeno):G

Guanidinio-G-clamp:G

Pseudo uridina:A

Un par en que una o ambas subunidades tiene una modificación de azúcar, p.ej., una modificación 2', p.ej., 2'F, ENA o LNA, que mejora la unión.

También se describen en la presente memoria métodos de selección y fabricación de agentes de ARNi que tienen DMTDS. P.ej., cuando se criba una secuencia diana para secuencias candidatas para usar como agentes de ARNi se pueden seleccionar secuencias que tienen una propiedad DMTDS descrita en la presente memoria o una que pueda modificarse, preferiblemente con tan pocos cambios como sea posible, especialmente en la cadena AS, para proporcionar un nivel deseado de DMTDS.

También se describe en la presente memoria el proporcionar una secuencia de agente de ARNi candidato, y modificar al menos una P en P₅ a P₋₁ y/o al menos un P en P₅ a P₁ para proporcionar un agente de ARNi DMTDS.

Los agentes de ARNi DMTDS pueden usarse en cualquier método descrito en la presente memoria, p.ej., para silenciar cualquier gen descrito en la presente memoria, para tratar cualquier trastorno descrito en la presente memoria, en cualquier formulación descrita en la presente memoria, y generalmente en y/o con los métodos y composiciones descritas en otra parte en la presente memoria. Los agentes de ARNi DMTDS pueden incorporar otras modificaciones descritas en la presente memoria, p.ej., la unión de agentes de direccionamiento o la inclusión de modificaciones que mejoran la estabilidad, p.ej., la inclusión de monómeros resistentes a la nucleasa o la inclusión de salientes monocatenarios (p.ej., salientes AS 3' y/o salientes de cadena S 3') que se auto-asocian para formar la estructura de fragmento doble intra-cadena.

Preferiblemente estos agentes de ARNi tendrán una arquitectura descrita en la presente memoria.

Otras realizaciones

Un ARN, p.ej., un agente de ARNi, puede producirse en una célula *in vivo*, p.ej., a partir de moldes de ADN exógenos que se distribuyen en la célula. Por ejemplo, los moldes de ADN pueden insertarse en vectores y usarse como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica pueden distribuirse a un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (Patente de EE.UU. núm. 5.328.470), o por inyección estereotáctica (véase, p.ej., Chen *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3054-3057, 1994). El preparado farmacéutico del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en que está incrustado el vehículo de distribución génica. Los moldes de ADN, por ejemplo, pueden incluir dos unidades de transcripción, una que produce un transcrito que incluye la cadena superior de un agente de ARNi y una que produce un transcrito que incluye la cadena inferior de un agente de ARNi. Cuando los moldes se transcriben, el agente de ARNi se produce, y se procesa en fragmentos del agente ARNp que median el silenciamiento génico.

Distribución *in vivo*

Un agente de ARNi puede unirse, p.ej., unirse de forma no covalente a un polímero para la distribución eficiente del agente de ARNi a un sujeto, p.ej., un mamífero, tal como un humano. El agente de ARNi puede, por ejemplo, complejarse con ciclodextrina. Las ciclodextrinas se han usado como vehículos de distribución de compuestos terapéuticos. Las ciclodextrinas pueden formar complejos de inclusión con fármacos que son capaces de adaptarse a la cavidad hidrófoba de la ciclodextrina. En otros ejemplos, las ciclodextrinas forman asociaciones no covalentes con otras moléculas biológicamente activas tales como oligonucleótidos y derivados de los mismos. El uso de ciclodextrinas crea un complejo de distribución de fármacos soluble en agua, que puede modificarse con grupos de direccionamiento u otros grupos funcionales. El sistema de distribución celular de ciclodextrina para oligonucleótidos descrito en la Patente de EE.UU. núm. 5.691.316 es adecuado para usar en métodos descritos en la presente memoria. En este sistema, un oligonucleótido se compleja de forma no covalente con una ciclodextrina, o el oligonucleótido se une de forma covalente con adamantina que a su vez se asocia de forma no covalente con una ciclodextrina.

La molécula de distribución puede incluir un copolímero de ciclodextrina lineal o un copolímero de ciclodextrina oxidada lineal que tiene al menos un ligando unido al copolímero de ciclodextrina. Los sistemas de distribución, como se describe en la Patente de EE.UU. núm. 6.509.323, son adecuados para usar en métodos descritos en la presente memoria. Un agente de ARNi puede unirse al copolímero de ciclodextrina lineal y/o copolímero de ciclodextrina oxidada lineal. Cualquiera o ambos de los copolímeros de ciclodextrina o ciclodextrina oxidada pueden reticularse a otro polímero y/o unirse a un ligando.

Una composición para la distribución de ARNi puede emplear un "complejo de inclusión", un compuesto molecular que tiene la estructura característica de un aducto. En esta estructura, la "molécula huésped" encierra espacialmente al menos parte de otro compuesto en el vehículo de distribución. El compuesto encerrado (la "molécula invitada") se sitúa en la cavidad de la molécula huésped sin afectar a la estructura marco del huésped. Un "huésped" es preferiblemente ciclodextrina, pero puede ser cualquiera de las moléculas sugeridas en la Publicación de Patente de EE.UU. 2003/0008818.

Las ciclodextrinas pueden interactuar con una variedad de especies iónicas y moleculares, y los compuestos de inclusión resultantes pertenecen a la clase de complejos "huésped-invitado". En la relación huésped-invitado, los sitios de unión de las moléculas huésped e invitado deberían ser complementarios en el sentido estereoeléctrico. Una composición descrita en la presente memoria puede contener al menos un polímero y al menos un agente terapéutico, generalmente en forma de un compuesto particulado del polímero y agente terapéutico, p.ej., el agente de ARNi. El agente de ARNi puede contener uno o más agentes complejantes. Al menos un polímero del compuesto particulado puede interactuar con el agente complejante en una interacción huésped-invitado o invitado-huésped para formar un complejo de inclusión entre el polímero y el agente complejante. El polímero y, más particularmente, el agente complejante puede usarse para introducir la funcionalidad en la composición. Por ejemplo, al menos un polímero del compuesto particulado tiene funcionalidad huésped y forma un complejo de inclusión con un agente complejante que tiene funcionalidad invitado. De forma alternativa, al menos un polímero del compuesto particulado tiene funcionalidad invitado y forma un complejo de inclusión con un agente complejante que tiene funcionalidad huésped. Un polímero del compuesto particulado puede contener también las funcionalidades tanto huésped como invitado y formar complejos de inclusión con agentes complejantes invitado y agentes complejantes huésped. Un polímero con funcionalidad puede, por ejemplo, facilitar el direccionamiento celular y/o el contacto celular (p.ej., direccionamiento o contacto con una célula renal), tráfico celular, y/o entrada y liberación en la célula.

En la formación del compuesto particulado, el agente de ARNi puede o no retener su actividad biológica o terapéutica. En la liberación desde la composición terapéutica, específicamente, desde el polímero del compuesto particulado, la actividad del agente de ARNi se restaura. Por consiguiente, el compuesto particulado ventajosamente ofrece protección al agente de ARNi frente a la pérdida de actividad debido a, por ejemplo, la degradación y ofrece biodisponibilidad mejorada. Por consiguiente, una composición puede usarse para proporcionar estabilidad, particularmente estabilidad de almacenamiento o disolución, a un agente de ARNi o cualquier compuesto químico activo. El agente de ARNi puede modificarse adicionalmente con un ligando antes o después de la formación del

compuesto particulado o la composición terapéutica. El ligando puede proporcionar funcionalidad adicional. Por ejemplo, el ligando puede ser un resto de direccionamiento.

Efectos fisiológicos

- 5 Los agentes de ARNi descritos en la presente memoria pueden diseñarse de manera que determinar la toxicidad terapéutica se haga más fácilmente por la complementariedad del agente de ARNi con una secuencia tanto humana como de animal no humano. Mediante estos métodos, un agente de ARNi puede consistir en una secuencia que es totalmente complementaria a una secuencia de ácido nucleico de un humano y una secuencia de ácido nucleico de al menos un animal no humano, p.ej., un mamífero no humano, tal como un roedor, rumiante o primate. Por ejemplo, el mamífero no humano puede ser un ratón, rata, perro, cerdo, cabra, oveja, vaca, mono, *Pan paniscus*, *Pan troglodytes*, *Macaca mulatto*, o mono *Cynomolgus*. La secuencia del agente de ARNi podría ser complementaria a secuencias en genes homólogos, p.ej., oncogenes o genes supresores tumorales, del mamífero no humano y el humano. Determinando la toxicidad del agente de ARNi en el mamífero no humano, se puede extrapolar la toxicidad del agente de ARNi en un humano. Para un ensayo de toxicidad más intenso, el agente de ARNi puede ser complementario a un humano y a más de uno, p.ej., dos o tres o más, animales no humanos.
- 15 Los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para correlacionar cualquier efecto fisiológico de un agente de ARNi en un humano, p.ej., cualquier efecto indeseado, tal como un efecto tóxico, o cualquier efecto positivo o deseado.

Módulo de distribución

- 20 Los monómeros y métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para preparar un ARN, p.ej., un agente de ARNi descrito en la presente memoria, que puede usarse con un conjugado o módulo de distribución de fármaco, tal como los descritos en la presente memoria y los descritos en la Solicitud Provisional de Estados Unidos en copropiedad y en tramitación con la presente núm. de serie 60/454.265, presentada el 12 de marzo de 2003, y la Solicitud Internacional núm. de serie PCT/US04/07070, presentada el 8 de marzo de 2004.

- 25 Los agentes de ARNi pueden complejarse con un agente de distribución que caracteriza un complejo modular. El complejo puede incluir un agente de transporte unido a uno o más de (preferiblemente dos o más, más preferiblemente los tres de): (a) un agente de condensación (p.ej., un agente capaz de atraer, p.ej., unir, un ácido nucleico, p.ej., a través de interacciones iónicas o electrostáticas); (b) un agente fusogénico (p.ej., un agente capaz de fusionarse y/o transportarse a través de una membrana celular, p.ej., una membrana de endosoma); y (c) un grupo de direccionamiento, p.ej., un agente de direccionamiento a célula o tejido, p.ej., una lectina, glucoproteína, lípido o proteína, p.ej., un anticuerpo, que se une a un tipo de célula específica tal como una célula renal.

- 30 Un agente de ARNi, p.ej., agente de ARNi o agente de ARNp descrito en la presente memoria, puede unirse, p.ej., acoplarse o enlazarse, al complejo modular. El agente de ARNi puede interactuar con el agente de condensación del complejo, y el complejo puede usarse para distribuir un agente de ARNi a una célula, p.ej., *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, el complejo puede usarse para distribuir un agente de ARNi a un sujeto que lo necesita, p.ej., para distribuir un agente de ARNi a un sujeto que tiene un trastorno, p.ej., un trastorno descrito en la presente memoria, tal como una enfermedad o trastorno del riñón.

El agente fusogénico y el agente de condensación pueden ser agentes diferentes o uno y el mismo agente. Por ejemplo, una cadena de poliamino, p.ej., polietilimina (PEI), puede ser el agente fusogénico y/o el agente de condensación.

- 40 El agente de distribución puede ser un complejo modular. Por ejemplo, el complejo puede incluir un agente de transporte unido a uno o más (preferiblemente dos o más, más preferiblemente a los tres de):

(a) un agente de condensación (p.ej., un agente capaz de atraer, p.ej., unirse a un ácido nucleico, p.ej., a través de una interacción iónica),

- 45 (b) un agente fusogénico (p.ej., un agente capaz de fusionarse y/o transportarse a través de una membrana celular, p.ej., una membrana de endosoma), y

- (c) un grupo de direccionamiento, p.ej., un agente de direccionamiento a célula o tejido, p.ej., una lectina, glucoproteína, lípido o proteína, p.ej., un anticuerpo, que se une a un tipo de célula específica tal como una célula renal. Un grupo de direccionamiento puede ser tirotropina, melanotropina, lectina, glucoproteína, proteína surfactante A, carbohidrato de mucina, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, manosa multivalente con N-acetil-glucosamina, fucosa multivalente, poliaminoácidos glucosilados, galactosa multivalente, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, un lípido, colesterol, un esteroide, ácido biliar, folato, vitamina B12, biotina, neproxina, o un péptido RGD o mimético de péptido RGD.

Agentes de transporte

5 El agente de transporte de un complejo modular descrito en la presente memoria puede ser un sustrato para la unión de uno o más de: un agente de condensación, un agente fusogénico y un grupo de direccionamiento. El agente de transporte carecería preferiblemente de una actividad enzimática endógena. El agente sería preferiblemente una molécula biológica, preferiblemente una macromolécula. Los vehículos biológicos poliméricos se prefieren. Se preferiría también que la molécula de transporte sea biodegradable.

10 El agente de transporte puede ser una sustancia que se dé de forma natural, tal como una proteína (p.ej., albúmina sérica humana (HSA), lipoproteína de baja densidad (LDL) o globulina); carbohidrato (p.ej., un dextrano, pululano, quitina, quitosano, inulina, ciclodextrina o ácido hialurónico); o lípido. La molécula de transporte puede ser también una molécula recombinante o sintética, tal como un polímero sintético, p.ej., un poliaminoácido sintético. Ejemplos de poliaminoácidos incluyen polilisina (PLL), poli(ácido L-aspártico), poli(ácido L-glutámico); copolímero de estireno-anhídrido de ácido maleico, copolímero poli(L-lactida-co-glicolida), copolímero de diviniléter-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), poli(alcohol de vinilo) (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrilico), polímeros de N-isopropilacrilamida, o polifosfazina. Otras moléculas de transporte útiles pueden identificarse por métodos rutinarios.

15 Un agente de transporte puede caracterizarse por uno o más de: (a) es al menos de 1 Da de tamaño; (b) tiene al menos 5 grupos cargados, preferiblemente entre 5 y 5000 grupos cargados; (c) está presente en el complejo en una relación de al menos 1:1 de agente de transporte a agente fusogénico; (d) está presente en el complejo en una relación de al menos 1:1 de agente de transporte a agente de condensación; (e) está presente en el complejo en una relación de al menos 1:1 de agente de transporte a agente de direccionamiento.

20 Agentes fusogénicos

Un agente fusogénico de un complejo modular descrito en la presente memoria puede ser un agente que es responsable de, p.ej., cambios de carga dependiendo de, el pH del medio. Al encontrarse con el pH de un endosoma, puede provocar un cambio físico, p.ej., un cambio en las propiedades osmóticas que interrumpen o aumentan la permeabilidad de la membrana del endosoma. Preferiblemente, el agente fusogénico cambia la carga, p.ej., se protona, a pH menor que el intervalo fisiológico. Por ejemplo, el agente fusogénico puede protonarse a pH 4,5-6,5. El agente fusogénico puede servir para liberar al agente de ARNi en el citoplasma de una célula después de que el complejo se absorbe, p.ej., por medio de endocitosis, por la célula, aumentando así la concentración celular del agente de ARNi en la célula.

30 En una realización, el agente fusogénico puede tener un resto, p.ej., un grupo amino, que, cuando se expone a un intervalo de pH específico, experimentará un cambio, p.ej., en la carga, p.ej., protonación. El cambio en la carga del agente fusogénico puede desencadenar un cambio, p.ej., un cambio osmótico, en una vesícula, p.ej., una vesícula endocítica, p.ej., un endosoma. Por ejemplo, el agente fusogénico, al exponerse al pH del medio de un endosoma, provocará una solubilidad o cambio osmótico sustancial suficiente para aumentar la porosidad de (preferiblemente la ruptura) de la membrana endosómica.

35 El agente fusogénico puede ser un polímero, preferiblemente una cadena poliamino, p.ej., polietilenimina (PEI). La PEI puede ser lineal, ramificada, sintética o natural. La PEI puede ser, p.ej., PEI sustituida con alquilo, o PEI sustituida con lípido.

40 En otras realizaciones, el agente fusogénico puede ser polihistidina, poliimidazol, polipiridina, polipropilenimina, melitina o una sustancia de poliactal, p.ej., un poliactal catiónico. En alguna realización, el agente fusogénico puede tener una estructura alfa helicoidal. El agente fusogénico puede ser un agente disruptor de membrana, p.ej., melitina.

45 Un agente fusogénico puede tener una o más de las siguientes características: (a) es al menos de 1 Da de tamaño; (b) tiene al menos 10 grupos cargados, preferiblemente entre 10 y 5000 grupos cargados, más preferiblemente entre 50 y 1000 grupos cargados; (c) está presente en el complejo en una relación de al menos 1:1 de agente fusogénico a agente de transporte; (d) está presente en el complejo en una relación de al menos 1:1 de agente fusogénico a agente de condensación; (e) está presente en el complejo en una relación de al menos 1:1 de agente fusogénico a agente de direccionamiento.

50 Otros agentes fusogénicos adecuados pueden probarse e identificarse por un experto. La capacidad de un compuesto para responder a, p.ej., el cambio de carga dependiendo de, el pH del medio puede probarse por métodos rutinarios, p.ej., en un ensayo celular. Por ejemplo, un compuesto de ensayo se combina o se pone en contacto con una célula, y se permite a la célula absorber el compuesto de ensayo; p.ej., por endocitosis. Un preparado de endosoma puede hacerse entonces a partir de las células contactadas y compararse el preparado de endosomas con un preparado de endosomas de células de control. Un cambio, p.ej., una disminución, en la fracción de endosomas de las células contactadas frente a la células de control indica que el compuesto de ensayo puede funcionar como un agente fusogénico. De forma alternativa, la célula contactada y la célula de control pueden evaluarse, p.ej., por microscopía, p.ej., por microscopía óptica o electrónica, para determinar una diferencia en la población de endosomas en las células. El compuesto de ensayo puede marcarse. En otro tipo de ensayo, un complejo modular descrito en la presente memoria se construye usando uno o más agentes fusogénicos de ensayo

o putativos. El complejo modular puede construirse usando un ácido nucleico marcado en vez del ARNi. La capacidad del agente fusogénico para responder a, p.ej., el cambio de carga dependiendo del pH del medio, una vez que el complejo modular se absorbe por la célula, puede evaluarse, p.ej., mediante la preparación de un preparado de endosomas, o por técnicas de microscopía, como se describe anteriormente. Un ensayo de dos etapas puede realizarse también, en el que un primer ensayo evalúa la capacidad de un compuesto de ensayo solo para responder a, p.ej., el cambio de carga dependiendo del pH del medio; y un segundo ensayo evalúa la capacidad de un complejo modular que incluye el compuesto de ensayo para responder a, p.ej., el cambio de carga dependiendo del pH del medio.

Agente de condensación

10 El agente de condensación de un complejo modular descrito en la presente memoria puede interactuar con (p.ej., atraer, contiene o se une a) un agente de ARNi y actúa para (a) condensar, p.ej., reducir el tamaño o carga del agente de ARNi y/o (b) proteger el agente de ARNi, p.ej., proteger el agente de ARNi frente a la degradación. El agente de condensación puede incluir un resto, p.ej., un resto cargado, que puede interactuar con un ácido nucleico, p.ej., un agente de ARNi, p.ej., por interacciones iónicas. El agente de condensación sería preferiblemente un polímero cargado, p.ej., una cadena policatiónica. El agente de condensación puede ser una polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudo-péptido-poli-amina, poliamina peptidomimética, poliamina dendrímica, arginina, amidina, protamina, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina, o un péptido alfa helicoidal.

20 Un agente de condensación puede tener las siguientes características: (a) al menos 1 Da de tamaño; (b) tiene al menos 2 grupos cargados, preferiblemente entre 2 y 100 grupos cargados; (c) está presente en el complejo a una relación de al menos 1:1 de agente de condensación a agente de transporte; (d) está presente en el complejo a una relación de al menos 1:1 de agente de condensación a agente fusogénico; (e) está presente en el complejo a una relación de al menos 1:1 de agente de condensación a agente de direccionamiento.

25 Otros agentes de condensación adecuados pueden probarse e identificarse por un experto, p.ej., evaluando la capacidad de un agente de ensayo para interactuar con un ácido nucleico, p.ej., un agente de ARNi. La capacidad de un agente de ensayo para interactuar con un ácido nucleico, p.ej., un agente de ARNi, p.ej., para condensar o proteger el agente de ARNi, puede evaluarse por técnicas rutinarias. En un ensayo, un agente de ensayo se pone en contacto con un ácido nucleico, y el tamaño y/o carga del ácido nucleico contactado se evalúa por una técnica adecuada para detectar cambios en la masa molecular y/o carga. Dichas técnicas incluyen electroforesis en gel no desnaturante, métodos inmunológicos, p.ej., inmunoprecipitación, filtración en gel, cromatografía de interacción iónica, y similares. Un agente de ensayo se identifica como un agente de condensación si cambia la masa y/o carga (preferiblemente ambas) del ácido nucleico contactado en comparación con el control. Un ensayo de dos etapas puede también realizarse, en el que un primer ensayo evalúa la capacidad de un compuesto de ensayo solo para interactuar con, p.ej., enlazar con, p.ej., condensar la carga y/o masa de un ácido nucleico; y un segundo ensayo evalúa la capacidad de un complejo modular que incluye el compuesto de ensayo para interactuar con, p.ej., enlazar con, p.ej., condensar la carga y/o masa de un ácido nucleico.

Agentes de distribución anfipáticos.

40 Los monómeros y métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para preparar un ARN, p.ej., un agente de ARNi descrito en la presente memoria, que puede usarse con un conjugado o módulo de distribución anfipático, tal como los descritos en la presente memoria y los descritos en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos en copropiedad y en tramitación con la presente núm. de serie 60/455.050, presentada el 13 de marzo de 2003, y la Solicitud Internacional núm. de serie PCT/US04/07070, presentada el 8 de marzo de 2004.

45 Una molécula anfipática es una molécula que tiene una región hidrófoba y una hidrófila. Dichas moléculas pueden interactuar con (p.ej., penetrar o alterar) lípidos, p.ej., una bicapa lipídica de una célula. Como tal, pueden servir como agente de distribución para un ARNi (p.ej., un ARNi o ARNp descrito en la presente memoria) asociado (p.ej. unido). Una molécula anfipática preferida para usar en las composiciones descritas en la presente memoria (p.ej., los constructos de ARNi anfipáticos descritos en la presente memoria) es un polímero. El polímero puede tener una estructura secundaria, p.ej., una estructura secundaria de repetición.

50 Un ejemplo de un polímero anfipático es un polipéptido anfipático, p.ej., un polipéptido que tiene una estructura secundaria de manera que el polipéptido tiene una cara hidrófila y una hidrófoba. El diseño de estructuras peptídicas anfipáticas (p.ej., polipéptidos alfa-helicoidales) es rutinario para un experto en la técnica. Por ejemplo, las siguientes referencias proporcionan guía: Grell et al. (2001) "Protein design and folding: template trapping of self-assembled helical bundles" *J Pept Sci* 7(3):146-51; Chen et al., (2002) "Determination of stereochemistry stability coefficients of amino acid side-chains in an amphipathic alpha-helix" *J Pep Res* 59(1):18-33; Iwata et al. (1994) "Design and synthesis of amphipathic 3(10)-helical peptides and their interactions with phospholipid bilayers and ion channel formation" *J Biol Chem* 269(7):4928-33; Cornut et al. (1994) "The amphipathic alpha-helix concept. Application to the de novo design of ideally amphipathic Leu, Lys peptides with hemolytic activity higher than that of melittin" *FEBS Lett* 349(1):29-33; Negrete et al. (1998) "Deciphering the structural code for proteins: helical propensities in domain classes and statistical multiresidue information in alpha-helices", *Protein Sci* 7(6):1368-79.

Otro ejemplo de un polímero anfipático es un polímero hecho de dos o más subunidades anfipáticas, p.ej. dos o más subunidades que contienen restos cíclicos (p.ej., un resto cíclico que tiene uno o más grupos hidrófilos y uno o más grupos hidrófobos). Por ejemplo, la subunidad puede contener un esteroide, p.ej., ácido cólico, o un resto aromático. Dichos restos preferiblemente pueden mostrar atropisomerismo, de manera que pueden formar caras hidrófobas e hidrófilas opuestas cuando están en una estructura polimérica.

La capacidad de una molécula anfipática putativa para interactuar con una membrana lipídica, p.ej., una membrana celular, puede probarse por métodos rutinarios, p.ej., en una célula libre o ensayo celular. Por ejemplo, un compuesto de ensayo se combina o se pone en contacto con una bicapa lipídica sintética, una fracción de membrana celular, o una célula, y el compuesto de ensayo se evalúa por su capacidad para interactuar con, penetrar o alterar la bicapa lipídica, membrana celular o célula. El compuesto de ensayo puede marcarse para detectar la interacción con la bicapa lipídica, membrana celular o célula. En otro tipo de ensayo, el compuesto de ensayo se une a una molécula indicadora o un agente de ARNi (p.ej., un ARNi o ARNp descrito en la presente memoria) y la capacidad de la molécula indicadora o agente de ARNi para penetrar la bicapa lipídica, membrana celular o célula se evalúa. Un ensayo de dos etapas puede realizarse también, en el que un primer ensayo evalúa la capacidad de un compuesto de ensayo solo para interactuar con una bicapa lipídica, membrana celular o célula; y un segundo ensayo evalúa la capacidad de un constructo (p.ej., un constructo descrito en la presente memoria) que incluye el compuesto de ensayo y un indicador o agente de ARNi para interactuar con una bicapa lipídica, membrana celular o célula.

Un polímero anfipático útil en las composiciones descritas en la presente memoria tiene al menos 2, preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 10, 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 50000 o más subunidades (p.ej., aminoácidos o subunidades cíclicas). Un polímero anfipático sencillo puede estar unido a uno o más, p.ej., 2, 3, 5, 10 o más agentes de ARNi (p.ej., agentes de ARNi o ARNp descritos en la presente memoria). En algunas realizaciones, un polímero anfipático puede contener subunidades tanto de aminoácido como cíclicas, p.ej., subunidades aromáticas.

Se describe en la presente memoria una composición que incluye un agente de ARNi (p.ej., un ARNi o ARNp descrito en la presente memoria) en asociación con una molécula anfipática. Dichas composiciones pueden denominarse en la presente memoria como "constructos de ARNi anfipáticos". Dichas composiciones y constructos son útiles en la distribución o direccionamiento de agentes de ARNi, p.ej., distribución o direccionamiento de agentes de ARNi a una célula. Aunque sin querer estar atados por la teoría, dichas composiciones y constructos pueden aumentar la porosidad de, p.ej., pueden penetrar o alterar, un lípido (p.ej., una bicapa lipídica de una célula), p.ej., para permitir la entrada del agente de ARNi en una célula.

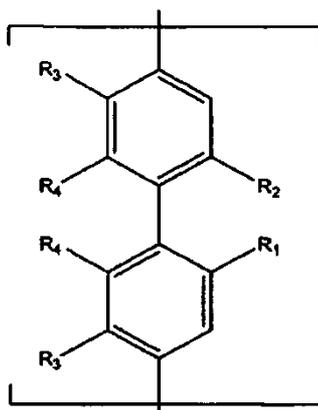
En un aspecto, se describe en la presente memoria una composición que comprende un agente de ARNi (p.ej., un agente de ARNi o ARNp descrito en la presente memoria) unido a una molécula anfipática. El agente de ARNi y la molécula anfipática pueden mantenerse en contacto continuo el uno con la otra mediante uniones covalentes o no covalentes.

La molécula anfipática de la composición o constructo es preferiblemente diferente de un fosfolípido, p.ej., distinto de una micela, membrana o fragmento de membrana.

La molécula anfipática de la composición o constructo es preferiblemente un polímero. El polímero puede incluir dos o más subunidades anfipáticas. Uno o más grupos hidrófilos y uno o más grupos hidrófobos pueden estar presentes en el polímero. El polímero puede tener una estructura secundaria de repetición además de una primera cara y una segunda cara. La distribución de los grupos hidrófilos y los grupos hidrófobos a lo largo de la estructura secundaria de repetición puede ser tal que una cara del polímero sea una cara hidrófila y la otra cara del polímero sea una cara hidrófoba.

La molécula anfipática puede ser un polipéptido, p.ej., un polipéptido que comprende una conformación α -helicoidal como su estructura secundaria.

En una realización, el polímero anfipático incluye una o más subunidades que contienen uno o más restos cíclicos (p.ej., un resto cíclico que tiene uno o más grupos hidrófilos y/o uno o más grupos hidrófobos). En una realización, el polímero es un polímero de restos cíclicos de manera que los restos tienen grupos hidrófobos e hidrófilos alternos. Por ejemplo, la subunidad puede contener un esteroide, p.ej., ácido cólico. En otro ejemplo, la subunidad puede contener un resto aromático. El resto aromático puede ser uno que pueda mostrar atropisomerismo, p.ej., un 2,2'-bis(sustituido)-1-1'-binaftilo o 2,2'-bis(sustituido)bifenilo. Una subunidad puede incluir un resto aromático de Fórmula (M):



(M)

Se describe en la presente memoria una composición que incluye un agente de ARNi (p.ej., un ARNi o ARNp descritos en la presente memoria) en asociación con una molécula anfipática. Dichas composiciones pueden denominarse en la presente memoria como "constructos de ARNi anfipáticos". Dichas composiciones y constructos son útiles en la distribución o direccionamiento de los agentes de ARNi, p.ej., distribución o direccionamiento de los agentes de ARNi a una célula. Aunque sin querer estar atados por la teoría, dichas composiciones y constructos pueden aumentar la porosidad de, p.ej., pueden penetrar o alterar, un lípido (p.ej., una bicapa lipídica de una célula), p.ej., para permitir la entrada del agente de ARNi en una célula.

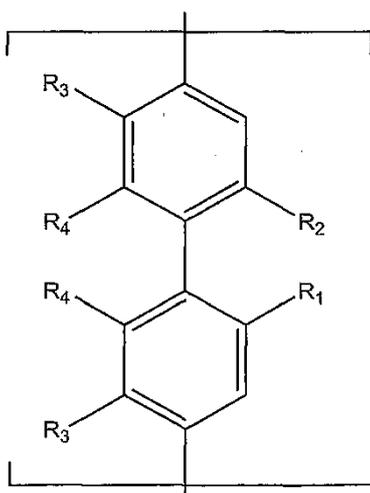
En un aspecto, se describe en la presente memoria una composición que comprende un agente de ARNi (p.ej., un agente de ARNi o ARNp descrito en la presente memoria) unido a una molécula anfipática. El agente de ARNi y la molécula anfipática pueden mantenerse en contacto continuo el uno con la otra mediante uniones o covalentes o no covalentes.

La molécula anfipática de la composición o constructo es preferiblemente diferente de un fosfolípido, p.ej., distinto de una micela, membrana o fragmento de membrana.

La molécula anfipática de la composición o constructo es preferiblemente un polímero. El polímero puede incluir dos o más subunidades anfipáticas. Uno o más grupos hidrófilos y uno o más grupos hidrófobos pueden estar presentes en el polímero. El polímero puede tener una estructura secundaria de repetición además de una primera cara y una segunda cara. La distribución de los grupos hidrófilos y los grupos hidrófobos a lo largo de la estructura secundaria de repetición puede ser tal que una cara del polímero es una cara hidrófila y la otra cara del polímero es una cara hidrófoba.

La molécula anfipática puede ser un polipéptido, p.ej., un polipéptido que comprende una conformación α -helicoidal como su estructura secundaria.

En una realización, el polímero anfipático incluye una o más subunidades que contienen uno o más restos cíclicos (p.ej., un resto cíclico que tiene uno o más grupos hidrófilos y/o uno o más grupos hidrófobos). En una realización, el polímero es un polímero de restos cíclicos de manera que los restos tienen grupos hidrófobos e hidrófilos alternos. Por ejemplo, la subunidad puede contener un esteroide, p.ej., ácido cólico. En otro ejemplo, la subunidad puede contener un resto aromático. El resto aromático puede ser uno que puede mostrar atropisomerismo, p.ej., un 2,2'-bis(sustituido)-1-1'-binaftilo o una 2,2'-bis(sustituido)bifenilo. Una subunidad puede incluir un resto aromático de Fórmula (M):



(M)

En referencia a la Fórmula M, R¹ es alquilo C₁-C₁₀₀ opcionalmente sustituido con arilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi o halo y/u opcionalmente insertado con O, S, alquenilo o alquinilo; perfluoroalquilo C₁-C₁₀₀; u OR₅.

5 R₂ es hidroxilo; nitro; sulfato; fosfato; éster de fosfato; ácido sulfónico; OR₆; o alquilo C₁-C₁₀₀ opcionalmente sustituido con hidroxilo, halo, nitro, arilo o alquilsulfinilo, arilo o alquilsulfonilo, sulfato, ácido sulfónico, fosfato, éster de fosfato, arilo sustituido o no sustituido, carboxilo, carboxilato, aminocarbonilo, o alcóxicarbonilo, y/u opcionalmente insertado con O, NH, S, S(O), SO₂, alquenilo o alquinilo.

R₃ es hidrógeno, o cuando se toman junto con R⁴ forma un anillo fenilo condensado.

R₄ es hidrógeno, o cuando se toman junto con R³ forma un anillo fenilo condensado.

10 R₅ es alquilo C₁-C₁₀₀ opcionalmente sustituido con arilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi o halo y/u opcionalmente insertado con O, S, alquenilo o alquinilo; o perfluoroalquilo C₁-C₁₀₀; y R₆ es alquilo C₁-C₁₀₀ opcionalmente sustituido con hidroxilo, halo, nitro, arilo o alquilsulfinilo, arilo o alquilsulfonilo, sulfato, ácido sulfónico, fosfato, éster de fosfato, arilo sustituido o no sustituido, carboxilo, carboxilato, aminocarbonilo, o alcóxicarbonilo, y/u opcionalmente insertados con O, NH, S, S(O), SO₂, alquenilo o alquinilo.

15 Absorción celular aumentada de ARNbc

Un método descrito en la presente memoria que puede incluir la administración de un agente de ARNi y un fármaco que afecta a la absorción del agente de ARNi en la célula. El fármaco puede administrarse antes, después o al mismo tiempo que se administra el agente de ARNi. El fármaco puede estar unido de forma covalente al agente de ARNi. El fármaco puede ser, por ejemplo, un lipopolisacárido, un activador de p38 MAP quinasa, o un activador de NF-κB. El fármaco puede tener un efecto transitorio en la célula.

20 El fármaco puede aumentar la absorción del agente de ARNi en la célula, por ejemplo, alterando el citoesqueleto de la célula, p.ej., alterando los microtúbulos, microfilamentos y/o filamentos intermedios de la célula. El fármaco puede ser, por ejemplo, taxona, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, japaquinolida, latrunculina A, faloidina, swinholida A, indanocina o mioservina.

25 El fármaco puede aumentar también la absorción del agente de ARNi en la célula activando una respuesta inflamatoria, por ejemplo. Los fármacos ejemplares que tendrían dicho efecto incluyen factor alfa de necrosis tumoral (TNF α), interleuquina-1 beta o gamma interferón.

Conjugados de ARNi

30 Un agente de ARNi puede acoplarse, p.ej., acoplarse de forma covalente, a un segundo agente. Por ejemplo, un agente de ARNi usado para tratar un trastorno particular puede acoplarse a un segundo agente terapéutico, p.ej., un agente distinto del agente de ARNi. El segundo agente terapéutico puede ser uno que está dirigido al tratamiento del mismo trastorno. Por ejemplo, en el caso de un ARNi usado para tratar un trastorno caracterizado por proliferación celular indeseada, p.ej., cáncer, el agente de ARNi puede acoplarse a un segundo agente que tiene un efecto anticancerígeno. Por ejemplo, puede acoplarse a un agente que estimula el sistema inmunitario, p.ej., un motivo CpG, o más generalmente a un agente que activa un receptor tipo toll y/o aumenta la producción de gamma interferón.

35

Producción de ARNi

Un ARNi puede producirse, p.ej., a granel, por una variedad de métodos. Los métodos ejemplares incluyen: síntesis orgánica y escisión de ARN, p.ej., escisión *in vitro*.

Síntesis orgánica

5 Un ARNi puede hacerse sintetizando de forma separada cada respectiva cadena de una molécula de ARN bicatenaria. Las cadenas componentes pueden entonces hibridarse.

10 Un biorreactor grande, p.ej., el OligoPilot II de Pharmacia Biotec AB (Uppsala Suecia), puede usarse para producir una gran cantidad de una cadena de ARN particular para un ARNi dado. El reactor OligoPilotII puede acoplar de forma eficiente un nucleótido usando solo un exceso molar de 1,5 de un nucleótido fosforamidita. Para fabricar la cadena de ARN, se usan ribonucleótidos amiditas. Los ciclos estándar de adición de monómero pueden usarse para sintetizar la cadena de 21 a 23 nucleótidos para la ARNi. Típicamente, las dos cadenas complementarias se producen de forma separada y después se hibridan, p.ej., después de la liberación del soporte sólido y desprotección.

15 La síntesis orgánica puede usarse para producir una especie de ARNi discreta. La complementariedad de la especie a un gen diana particular puede especificarse de forma precisa. Por ejemplo, la especie puede ser complementaria a una región que incluye un polimorfismo, p.ej., un polimorfismo de un único nucleótido. Además la posición del polimorfismo puede definirse de forma precisa. En algunas realizaciones, el polimorfismo está situado en una región interna, p.ej., al menos a 4, 5, 7 o 9 nucleótidos de uno o ambos de los extremos.

Escisión de ARNbc

20 Los ARNi pueden hacerse también escindiendo un ARNbc más largo. La escisión puede medirse *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, para producir ARNi por escisión *in vitro*, puede usarse el siguiente método:

25 Transcripción *in vitro*. Se produce ARNbc transcribiendo un segmento de ácido nucleico (ADN) en ambas direcciones. Por ejemplo, el kit de transcripción de ARNi HiScribe™ (New England Biolabs) proporciona un vector y un método para producir un ARNbc para un segmento de ácido nucleico que se clona en el vector a una posición flanqueada en cada lado por un promotor T7. Se generan moldes separados para la transcripción de T7 de las dos cadenas complementaria para el ARNbc. Los moldes se transcriben *in vitro* por adición de T7 ARN polimerasa y se produce ARNbc. También pueden usarse métodos similares usando PCR y/u otras ARN polimerasas (p.ej., T3 o SP6 polimerasa). En una realización, el ARN generado por este método se purifica cuidadosamente para eliminar las endotoxinas que pueden contaminar los preparados de las enzimas recombinantes.

30 Escisión *in vitro*. El ARNbc se escinde *in vitro* en ARNi, por ejemplo, usando una actividad basada en Dicer o RNAsa III comparable. Por ejemplo, el ARNbc puede incubarse en un extracto *in vitro* de *Drosophila* o usando componentes purificados, p.ej., una RNAsa o complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN) purificados. Véase, p.ej., Ketting *et al.*, *Genes Dev* 2001 15 de octubre de 2001; 15(20):2654-9 y Hammond *Science* 10 de agosto de 2001; 293(5532):1146-50.

35 La escisión de ARNbc generalmente produce una pluralidad de especies de ARNi, siendo cada una un fragmento particular de 21 a 23 nt de una molécula de ARNbc fuente. Por ejemplo, los ARNi que incluyen secuencias complementarias para solapar regiones y regiones adyacentes de una molécula de ARNbc fuente pueden estar presentes.

40 Independientemente del método de síntesis, el preparado de ARNi puede prepararse en una disolución (p.ej., una disolución acuosa y/u orgánica) que es apropiada para la formulación. Por ejemplo, el preparado de ARNi puede precipitarse y redisolverse en agua de doble destilación pura, y liofilizarse. El ARNi seco puede entonces suspenderse de nuevo en una disolución apropiada para el proceso de formulación previsto.

La síntesis de agentes de ARNi modificados y sustitutos de nucleótido se trata a continuación.

Formulación

45 Los agentes de ARNi descritos en la presente memoria pueden formularse para la administración a un sujeto. Para facilitar la exposición las formulaciones, composiciones y métodos en esta sección se tratan principalmente con respecto a agentes de ARNi no modificados. Debería entenderse, sin embargo, que estas formulaciones, composiciones y métodos pueden practicarse con otros agentes de ARNi, p.ej., agentes de ARNi modificados, y dicha práctica está dentro de la presente descripción.

50 Una composición de ARNi formulada puede asumir una variedad de estados. En algunos ejemplos, la composición es al menos parcialmente cristalina, uniformemente cristalina, y/o anhidra (p.ej., menos del 80, 50, 30, 20 o 10% de agua). En otro ejemplo, el ARNi está en una fase acuosa, p.ej., en una disolución que incluye agua.

La fase acuosa o las composiciones cristalinas pueden, p.ej., incorporarse a un vehículo de distribución, p.ej., un liposoma (particularmente para la fase acuosa) o una partícula (p.ej., una micropartícula como puede ser apropiado

para una composición cristalina). Generalmente, la composición de ARNi se formula de una manera que sea compatible con el método previsto de administración (véase, a continuación).

5 En realizaciones particulares, la composición se prepara por al menos uno de los siguientes métodos: secado por pulverización, liofilización, secado al vacío, evaporación, secado en lecho fluido, o una combinación de estas técnicas; o sonicación con un lípido, secado por congelación, condensación y otro auto-montaje.

Un preparado de ARNi puede formularse en combinación con otro agente, p.ej., otro agente terapéutico o un agente que estabiliza un ARNi, p.ej., una proteína que compleja con ARNi para formar una PRNi. Aún otros agentes incluyen quelantes, p.ej., EDTA (p.ej., para eliminar los cationes divalentes tales como Mg^{2+}), sales, inhibidores de RNAsa (p.ej., un inhibidor de RNAsa de amplia especificidad tal como ARNsin) etcétera.

10 En una realización, el preparado de ARNi incluye otro agente de ARNi, p.ej., un segundo ARNi que puede mediar la iARN con respecto a un segundo gen, o con respecto al mismo gen. Aún otro preparado puede incluir al menos 3, 5, diez, veinte, cincuenta, o cien o más especies de ARNi diferentes. Dichos ARNi pueden mediar la iARN con respecto a un número similar de genes diferentes.

15 En una realización, el preparado de ARNi incluye al menos un segundo agente terapéutico (p.ej., un agente distinto de un ARN o un ADN). Por ejemplo, una composición de ARNi para el tratamiento de una enfermedad vírica, p.ej., VIH, incluiría un agente antiviral conocido (p.ej., un inhibidor de proteasa o inhibidor de transcriptasa inversa). En otro ejemplo, una composición de ARNi para el tratamiento de un cáncer comprendería además un agente quimioterapéutico.

Las formulaciones ejemplares se tratan a continuación:

20 Liposomas

Para facilitar la exposición de las formulaciones, las composiciones y los métodos en esta sección se tratan en gran parte con respecto a agentes de ARNi no modificados. Debería entenderse, sin embargo, que estas formulaciones, composiciones y métodos pueden ponerse en práctica con otros agentes de ARNi, p.ej., agentes de ARNi modificados, y dicha práctica está dentro de la presente descripción. Puede formularse un preparado de un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo) para la distribución en un montaje molecular membranoso, p.ej., un liposoma o una micela. Como se usa en la presente memoria, el término "liposoma" se refiere a una vesícula compuesta de lípidos anfifílicos dispuestos en al menos una bicapa, p.ej., una bicapa o una pluralidad de bicapas. Los liposomas incluyen vesículas unilaminares y multilaminares que tienen una membrana formada a partir de un material lipofílico y un interior acuoso. La parte acuosa contiene la composición de ARNi. El material lipófilo aísla el interior acuoso de un exterior acuoso, que típicamente no incluye la composición de ARNi, aunque en algunos ejemplos, puede. Los liposomas son útiles para la transferencia y distribución de ingredientes activos al sitio de acción. Debido a que la membrana liposómica es estructuralmente similar a las membranas biológicas, cuando los liposomas se aplican a un tejido, la bicapa liposómica se funde con la bicapa de las membranas celulares. Mientras progresa la fusión del liposoma y la célula, los contenidos acuosos internos que incluyen el ARNi se distribuyen por la célula donde el ARNi puede unirse específicamente a un ARN diana y puede mediar la iARN. En algunos casos los liposomas también se fijan específicamente como objetivos, p.ej., para dirigir al ARNi a tipos particulares de células, p.ej., a células del riñón, tal como las descritas en la presente memoria.

40 Un liposoma que contiene un ARNi puede prepararse por una variedad de métodos.

En un ejemplo, el componente lipídico de un liposoma se disuelve en un detergente de manera que se forman micelas con el componente lipídico. Por ejemplo, el componente lipídico puede ser un lípido o conjugado lipídico catiónico anfipático. El detergente puede tener una alta concentración micelar crítica y puede ser no iónico. Los detergentes ejemplares incluyen colato, CHAPS, octilglucósido, desoxicolato y lauroilsarcosina. El preparado de ARNi se añade entonces a las micelas que incluyen el componente lipídico. Los grupos catiónicos en el lípido interactúan con el ARNi y condensan alrededor del ARNi para formar un liposoma. Después de la condensación, el detergente se elimina, p.ej., mediante diálisis, para dar un preparado liposómico de ARNi.

Si fuera necesario un compuesto de transporte que ayude en la condensación puede añadirse durante la reacción de condensación, p.ej., por adición controlada. Por ejemplo, el compuesto de transporte puede ser un polímero distinto de un ácido nucleico (p.ej., espermina o espermidina). El pH puede también ajustarse para favorecer la condensación.

Una descripción adicional de métodos para producir vehículos de distribución de polinucleótidos estables, que incorporan un complejo de polinucleótido/lípido catiónico como componentes estructurales del vehículo de distribución, se describen en, p.ej., el documento WO 96/37194. La formación de liposomas puede incluir también uno o más aspectos de métodos ejemplares descritos en Felgner, P.L., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 8:7413-7417, 1987; la Patente de EE.UU. núm. 4.897.355; Patente de EE.UU. núm. 5.171.678; Bangham, *et al.*, *M. Mol. Biol.* 23:238, 1965; Olson, *et al. Biochim. Biophys. Acta* 557:9, 1979; Szoka, *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:4194,

1978; Mayhew, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984; Kim, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 728:339, 1983; y Fukunaga, *et al.* *Endocrinol.* 115:757, 1984. Las técnicas usadas normalmente para preparar agregados lipídicos de tamaño apropiado para usar como vehículos de distribución incluyen la sonicación y la congelación-descongelado más extrusión (véase, p.ej., Mayer, *et al.* *Biochim. Biophys. Acta* 858:161, 1986). La microfluidización puede usarse cuando se desean agregados consistentemente pequeños (50 a 200 nm) y relativamente uniformes (Mayhew, *et al.* *Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984). Estos métodos se adaptan fácilmente para empaquetar preparados de ARNi en liposomas.

Los liposomas que son sensibles al pH o están cargados de forma negativa, atrapan moléculas de ácido nucleico más que complejarse con ellas. Como tanto las moléculas de ácido nucleico como los lípidos están cargados de forma similar, se da repulsión más que formación de complejo. Aún así, algunas moléculas de ácido nucleico se atrapan en el interior acuoso de estos liposomas. Se han usado liposomas sensibles al pH para distribuir ADN que codifica el gen de timidina quinasa a monocapas celulares en cultivo. La expresión del gen exógeno se detectó en las células diana (Zhou *et al.*, *Journal of Controlled Release*, 19 (1992) 269-274).

Un tipo principal de composición liposómica incluye fosfolípidos distintos de la fosfatidilcolina derivada de forma natural. Las composiciones de liposomas neutros, por ejemplo, pueden formarse a partir de dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC) o dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC). Las composiciones de liposomas aniónicos generalmente se forman a partir de dimiristoil-fosfatidilglicerol, mientras que los liposomas fusogénicos aniónicos se forman principalmente a partir de dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE). Otro tipo de composición liposómica se forma a partir de fosfatidilcolina (PC) tal como, por ejemplo, PC de soja, y PC de huevo. Otro tipo se forma a partir de mezclas de fosfolípido y/o fosfatidilcolina y/o colesterol.

Ejemplos de otros métodos para introducir liposomas en células *in vitro* e *in vivo* incluyen la Patente de EE.UU. núm. 5.283.185; Patente de EE.UU. núm. 5.171.678; documentos WO 94/00569; WO 93/24640, WO 91/16024; Felgner, *J. Biol. Chem.* 269:2550, 1994; Nabel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:11307, 1993; Nabel, *Human Gene Ther.* 3:649, 1992; Gershon, *Biochem.* 32:7143, 1993; y Strauss *EMBO J.* 11:417, 1992.

En una realización, se usan liposomas catiónicos. Los liposomas catiónicos poseen la ventaja de ser capaces de fundir con la membrana celular. Los liposomas no catiónicos, aunque no son capaces de fundirse de forma tan eficiente con la membrana plasmática, se absorben por macrófagos *in vivo* y pueden usarse para distribuir ARNi a macrófagos.

Ventajas adicionales de los liposomas incluyen: los liposomas obtenidos a partir de fosfolípidos naturales son biocompatibles y biodegradables; los liposomas pueden incorporar una amplia gama de fármacos solubles en agua y lípidos; los liposomas pueden proteger ARNi encapsulados en sus compartimientos internos del metabolismo y la degradación (Rosoff, en "Pharmaceutical Dosage Forms", Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, volumen 1, pág. 245). Importantes consideraciones en la preparación de formulaciones de liposomas son la carga superficial lipídica, el tamaño de la vesícula y el volumen acuoso de los liposomas.

Un lípido catiónico sintético cargado de forma positiva, cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) puede usarse para formar pequeños liposomas que interactúan de forma espontánea con ácido nucleico para formar complejos de lípido-ácido nucleico que son capaces de fusionar con los lípidos cargados de forma negativa de las membranas celulares de células de cultivo tisular, dando por resultado la distribución de ARNi (véase, p.ej., Felgner, P.L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 8:7413-7417, 1987 y la Patente de EE.UU. núm. 4.897.355 para una descripción de DOTMA y su uso con ADN).

Un análogo de DOTMA, 1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP) puede usarse en combinación con un fosfolípido para formar vesículas que complejan con ADN. La lipofectina™ (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) es un agente efectivo para la distribución de ácidos nucleicos altamente aniónicos en células de cultivo tisular vivo que comprenden liposomas DOTMA cargados de forma positiva que interactúan de forma espontánea con polinucleótidos cargados de forma negativa para formar complejos. Cuando se usan suficientes liposomas cargados de forma positiva, la carga de red en los complejos resultantes es también positiva. Los complejos cargados de forma positiva preparados de esta forma se unen espontáneamente a superficies celulares cargadas de forma negativa, fusionan con la membrana plasmática y distribuyen de forma eficiente ácidos nucleicos funcionales en, por ejemplo, células de cultivo celular. Otro lípido catiónico comercialmente disponible, 1,2-bis(oleoiloxi)-3,3-(trimetilamonio)propano ("DOTAP") (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana) difiere de DOTMA en que los restos oleoiloxi están unidos por éster, más que por uniones éter.

Otros compuestos lipídicos catiónicos presentados incluyen los que se han conjugado a una variedad de restos que incluyen, por ejemplo, carboxiespermina que se ha conjugado a uno de dos tipos de lípidos e incluye compuestos tales como 5-carboxiespermilglicina dioctaoileilamida ("DOGS") (Transfectam™, Promega, Madison, Wisconsin) y dipalmitoilfosfatidiletanolamina 5-carboxiespermilamida ("DPPES") (véase, p.ej., la Patente de EE.UU. núm. 5.171.678).

Otro conjugado lipídico catiónico incluye la derivación del lípido con colesterol ("DC-Col") que se ha formulado en liposomas en combinación con DOPE (véase, Gao, X. y Huang, L., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179:280,

1991). La lipopolilisina, hecha conjugando polilisina con DOPE, se ha presentado que es efectiva para la transfección en presencia de suero (Zhou, X. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1065:8, 1991). Para ciertas líneas celulares, estos liposomas que contienen lípidos catiónicos conjugados, se dice que muestran menor toxicidad y proporcionan una transfección más eficiente que las composiciones que contienen DOTMA. Otros productos lipídicos catiónicos disponibles comercialmente incluyen DMRIE y DMRIE-HP (Vical, La Jolla, California) y Lipofectamine (DOSPA) (Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland). Otros lípidos catiónicos adecuados para la distribución de oligonucleótidos se describen en los documentos WO 98/39359 y WO 96/37194.

Las formulaciones liposómicas se ajustan particularmente para la administración tópica, los liposomas presentan varias ventajas sobre otras formulaciones. Dichas ventajas incluyen efectos secundarios reducidos relacionados con la alta absorción sistémica del fármaco administrado, acumulación aumentada del fármaco administrado a la diana deseada, y la capacidad de administrar ARNi, en la piel. En algunas implementaciones, los liposomas se usan para distribuir ARNi a las células epidérmicas y también para mejorar la penetración del ARNi en tejidos dérmicos, p.ej., en la piel. Por ejemplo, los liposomas pueden aplicarse de forma tópica. La distribución tópica de fármacos formulados como liposomas a la piel se ha documentado (véase, p.ej., Weiner *et al.*, *Journal of Drug Targeting*, 1992, vol. 2, 405-410 y du Plessis *et al.*, *Antiviral Research*, 18, 1992, 259-265; Mannino, R.J. y Fould-Fogerite, S., *Biotechniques* 6:682-690; 1988; Itani, T. *et al.* *Gene* 56:267-276, 1987; Nicolau, C. *et al.* *Meth. Enz.* 149:157-176, 1987; Straubinger, R.M. y Papahadjopoulos, D. *Meth. Enz.* 101:512-527, 1983; Wang, C.Y. y Huang, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855, 1987).

También se han examinado sistemas liposómicos no iónicos para determinar su utilidad en la distribución de fármacos a la piel, en particular sistemas que comprenden tensioactivo no iónico y colesterol. Las formulaciones liposómicas no iónicas que comprenden Novasome I (dilaurato de glicerilo/colesterol/polioxietilen-10-esteariléter) y Novosome II (diestearato de glicerilo/colesterol/polioxietilen-10-esteariléter) se usaron para distribuir un fármaco en la dermis de la piel de ratón. Dichas formulaciones con ARNi son útiles para tratar un trastorno dermatológico.

Los liposomas que incluyen ARNi pueden hacerse altamente deformables. Dicha deformabilidad puede permitir a los liposomas penetrar a través de un poro que es más pequeño que el radio promedio del liposoma. Por ejemplo, los transferosomas son un tipo de liposomas deformables. Los transferosomas puede hacerse añadiendo activadores del borde superficial, normalmente tensioactivos, a una composición liposómica estándar. Los transferosomas que incluyen ARNi pueden distribuirse, por ejemplo, de forma subcutánea por infección para distribuir ARNi a queratinocitos en la piel. Para cruzar intactos la piel de mamífero, las vesículas lipídicas deben atravesar una serie de finos poros, cada uno con un diámetro menor de 50 nm, bajo la influencia de un gradiente transdérmico adecuado. Además, debido a las propiedades lipídicas, estos transferosomas pueden auto-optimizarse (adaptables a la forma de los poros, p.ej., en la piel), auto-repararse, y pueden alcanzar frecuentemente sus dianas sin fragmentación, y a menudo auto-carga. Los agentes de ARNi pueden incluir una SMSR anclada a un resto que mejora la asociación con un liposoma.

Tensioactivos

Para facilitar la exposición las formulaciones, las composiciones y métodos en esta sección se tratan en gran parte con respecto a agentes de ARNi no modificados. Debería entenderse, sin embargo, que estas formulaciones, composiciones y métodos pueden practicarse con otros agente de ARNi, p.ej., agentes de ARNi modificados, y dicha práctica está dentro de la presente descripción. Los tensioactivos encuentran una amplia aplicación en formulaciones tales como emulsiones (que incluyen microemulsiones) y liposomas (véase anteriormente). Las composiciones de ARNi (o un precursor, p.ej., un ARNbc mayor que puede procesarse en un ARNi, o un ADN que codifica un ARNi o precursor) pueden incluir un tensioactivo. En una realización, el ARNi se formula como una emulsión que incluye un tensioactivo. La forma más común de clasificar y organizar las propiedades de los muchos tipos de tensioactivos, tanto naturales como sintéticos, es mediante el uso del equilibrio hidrófilo/hidrófilo (HLB). La naturaleza del grupo hidrófilo proporciona los medios más útiles para categorizar los diferentes tensioactivos en las formulaciones (Rieger, en "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1988, pág. 285).

Si la molécula tensioactiva no está ionizada, se clasifica como un tensioactivo no iónico.

Los tensioactivos no iónicos encuentran una amplia aplicación en productos farmacéuticos y son útiles en un amplio intervalo de valores de pH. En general sus valores de HLB oscilan de 2 a aproximadamente 18 dependiendo de su estructura. Los tensioactivos no iónicos incluyen ésteres no iónicos tales como ésteres de etilenglicol, ésteres de propilenglicol, ésteres de glicerilo, ésteres de poliglicerilo, ésteres de sorbitano, ésteres de sacarosa y ésteres etoxilados. Las alcanolamidas y éteres no iónicos tal como etoxilatos de alcohol graso, alcoholes propoxilados, y polímeros de bloque etoxilados/propoxilados se incluyen también en esta clase. Los tensioactivos de polioxietileno son los miembros más populares de la clase de tensioactivos no iónicos.

Si la molécula tensioactiva porta una carga negativa cuando se disuelve o dispersa en agua, el tensioactivo se clasifica como aniónico. Los tensioactivos aniónicos incluyen carboxilatos tales como jabones, lactilatos de acilo, amidas de acilo de aminoácidos, ésteres de ácido sulfúrico tales como sulfatos de alquilo y alquilsulfatos etoxilados, sulfonatos tales como bencenosulfonatos de alquilo, isetionatos de acilo, tauratos de acilo y sulfosuccinatos, y

fosfatos. Los miembros más importantes de la clase de tensioactivos aniónicos son los sulfatos de alquilo y los jabones.

5 Si la molécula de tensioactivo porta una carga positiva cuando se disuelve o dispersa en agua, el tensioactivo se clasifica como catiónico. Los tensioactivos catiónicos incluyen sales de amonio cuaternario y aminas etoxiladas. Las sales de amonio cuaternarias son los miembros más usados de esta clase.

Si la molécula de tensioactivo tiene la capacidad de portar una carga tanto positiva como negativa, el tensioactivo se clasifica como anfótero. Tensioactivos anfóteros incluyen derivados de ácido acrílico, alquilamidas sustituidas, N-alquilbetaínas y fosfatidas.

10 El uso de tensioactivos en productos farmacológicos, formulaciones y en emulsiones se ha revisado (Rieger, en "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, 1988, pág. 285).

Micelas y otras formulaciones membranosas

15 Por facilitar la exposición las micelas y otras formulaciones, composiciones y métodos en esta sección se tratan en gran parte con respecto a agentes de ARNi no modificados. Debería entenderse, sin embargo, que estas micelas y otras formulaciones, composiciones y métodos pueden practicarse con otros agentes de ARNi, p.ej., agentes de ARNi modificados, y dicha práctica está dentro de la presente descripción. La composición de agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario o un agente de ARNp, o precursor del mismo)) puede proporcionarse como una formulación micelar. "Micelas" se definen en la presente memoria como un tipo particular de montaje molecular en que las moléculas anfipáticas están
20 dispuestas en una estructura esférica de manera que todas las partes hidrófobas de las moléculas se dirigen hacia adentro, dejando las partes hidrófilas en contacto con la fase acuosa circundante. La disposición contraria existe si el medio es hidrófobo.

25 Una formulación micelar mixta adecuada para la distribución a través de las membranas transdérmicas puede prepararse mezclando una disolución acuosa de la composición de ARNi, un alquil C₈ a C₂₂ sulfato de metal alcalino, y unos compuestos formadores de micela. Los compuestos formadores de micelas ejemplares incluyen lecitina, ácido hialurónico, sales farmacéuticamente aceptables de ácido hialurónico, ácido glicólico, ácido láctico, extracto de camomila, extracto de pepino, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, monooleína, monooleatos, monolauratos, aceite de borraja, aceite de onagra, mentol, trihidroxi oxo colanil-glicina y sales farmacéuticamente
30 aceptables de la misma, glicerina, poliglicerina, lisina, polilisina, trioleína, polioxietiléteres y análogos de los mismos, polidocanol-alquiléteres y análogos de los mismos, quenodesoxicolato, desoxicolato y mezclas de los mismos. Los compuestos que forman micelas pueden añadirse al mismo tiempo o después de la adición del alquilsulfato de metal alcalino. Las micelas mixtas se formarán con esencialmente cualquier clase de mezcla de los ingredientes pero se prefiere la mezcla vigorosa para proporcionar micelas de tamaño más pequeño.

35 En un método se prepara una primera composición micelar que contiene la composición de ARNi y al menos el alquilsulfato de metal alcalino. La primera composición micelar se mezcla entonces con al menos tres compuestos formadores de micelas para formar una composición micelar mixta. En otro método, la composición micelar se prepara mezclando una composición de ARNi, el alquilsulfato de metal alcalino y al menos uno de los compuestos formadores de micelas, seguido por adición de los restantes compuestos formadores de micelas, con mezcla vigorosa.

40 Pueden añadirse fenol y/o m-cresol a la composición micelar mixta para estabilizar la formulación y proteger frente al crecimiento bacteriano. De forma alternativa, puede añadirse fenol y/o m-cresol con los ingredientes formadores de micelas. Un agente isotónico tal como glicerina puede también añadirse después de la formación de la composición micelar mixta.

45 Para la distribución de la formulación micelar como una pulverización, la formulación puede ponerse en un dispensador de aerosol y el dispensador se carga con un propelente. El propelente, que está a presión, es una forma líquida en el dispensador. Las relaciones de los ingredientes se ajustan de manera que las fases acuosa y propelente sean una, es decir, hay una fase. Si hay dos fases, es necesario agitar el dispensador antes de dispensar una parte de los contenidos, p.ej., mediante una válvula medida. La dosis de dispensación del agente farmacéutico se propulsa desde la válvula medida en un pulverizado fino.

50 Los propulsores preferidos son clorofluorocarbonos que contienen hidrógeno, fluorocarbonos que contienen hidrógeno, dimetiléter y dietiléter. Es incluso más preferido HFA 134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano).

Las concentraciones específicas de los ingredientes esenciales pueden determinarse mediante experimentación relativamente directa. Para la absorción a través de cavidades orales, es a menudo deseable aumentar, p.ej., al menos el doble o triple, la dosis a través de inyección o la administración a través del tracto gastrointestinal.

55 Los agentes de ARNi pueden incluir una SMSR anclada a un resto que mejora la asociación con una micela u otra formulación membranosas.

Partículas

Para facilitar la exposición las partículas, formulaciones, composiciones y métodos en esta sección se tratan en gran parte con respecto a agentes de ARNi no modificados. Debería entenderse, sin embargo, que estas partículas, formulaciones, composiciones y métodos pueden practicarse con otros agentes de ARNi, p.ej., agentes de ARNi modificados, y dicha práctica está en la presente descripción. En otra realización, preparados de un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo) pueden incorporarse en una partícula, p.ej., una micropartícula. Las micropartículas pueden producirse por secado por pulverización, pero pueden producirse también por otros métodos que incluyen liofilización, evaporación, secado en lecho fluido, secado al vacío o una combinación de estas técnicas. Véase a continuación para una descripción adicional.

Formulaciones de liberación sostenida. Un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o un agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo) descrito en la presente memoria puede formularse para, p.ej., liberación lenta controlada. La liberación controlada puede conseguirse disponiendo el ARNi en una estructura o sustancia que impide su liberación. P.ej., el ARNi puede disponerse en una matriz porosa o en una matriz erosionable, cualquiera de las cuales permite la liberación del ARNi durante un periodo de tiempo.

Las partículas poliméricas, p.ej., pueden usarse micropartículas poliméricas como un depósito de liberación sostenida de ARNi que se absorbe por las células solo se liberan de la micropartícula a través de la biodegradación. Las partículas poliméricas en esta realización deberían ser por lo tanto suficientemente grandes para descartar la fagocitosis (p.ej., mayores que 10 μm y preferiblemente mayores que 20 μm). Dichas partículas pueden producirse por los mismos métodos para hacer partículas más pequeñas, pero con mezcla menos vigorosa de las emulsiones primera y segunda. Es decir, una menor velocidad de homogeneización, velocidad de mezcla con vórtice, o nivel de sonicación puede usarse para obtener partículas que tienen un diámetro de alrededor de 100 μm más que de 10 μm . El tiempo de mezcla también puede alterarse.

Pueden formularse micropartículas más grandes como una suspensión, un polvo, o un sólido implantable, para distribuir por inyección intramuscular, subcutánea, intradérmica, intravenosa o intraperitoneal; por medio de inhalación (intranasal o intrapulmonar); oralmente; o por implantación. Estas partículas son útiles para la distribución de cualquier ARNi cuando se desea la liberación lenta en un plazo relativamente largo. La velocidad de degradación, y por consiguiente de liberación, varía con la formulación polimérica.

Las micropartículas incluyen preferiblemente poros, huecos, agujeros, defectos u otros espacios intersticiales que permitan al medio de suspensión fluido permear libremente o perfundir el límite particulado. Por ejemplo, pueden usarse microestructuras perforadas para formar microesferas secas por pulverizado porosas, huecas.

Las partículas poliméricas que contienen ARNi (p.ej., un ARNp) puede hacerse usando una técnica de doble emulsión, por ejemplo. Primero, el polímero se disuelve en un disolvente orgánico. Un polímero preferido es ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), con una relación en peso de ácido láctico/glicólico de 65:35, 50:50 o 75:25. Después, una muestra de ácido nucleico suspendido en disolución acuosa se añade a la disolución polimérica y las dos disoluciones se mezclan para formar una primera emulsión. Las disoluciones pueden mezclarse formando un vórtice o agitando, en un método preferido, la mezcla puede sonicarse. Lo más preferible es cualquier método por el que el ácido nucleico recibe la menor cantidad de daño en la forma de mella, corte o degradación, aunque permitiendo aún la formación de una emulsión apropiada. Por ejemplo, pueden obtenerse resultados aceptables con un sonicador Vibra-cell modelo VC-250 con una sonda micropunta de 3,175 cm (1/8"), en el ajuste núm. 3.

Secado por pulverización. Un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo) puede prepararse por secado por pulverización. El ARNi seco por pulverización puede administrarse a un sujeto o someterse a formulación adicional. Una composición farmacéutica de ARNi puede prepararse secando por pulverización una mezcla acuosa homogénea que incluye un ARNi en condiciones suficientes para proporcionar una composición en polvo dispersable, p.ej., una composición farmacéutica. El material para secar por pulverización puede incluir también uno o más de: un excipiente farmacéuticamente aceptable, o una cantidad que mejora la dispersabilidad de una proteína soluble en agua, fisiológicamente aceptable. El producto seco por pulverización puede ser un polvo dispersable que incluye el ARNi.

El secado por pulverización es un proceso que convierte un material líquido o en lechada a una forma particulada seca. El secado por pulverización puede usarse para proporcionar material en polvo por varias rutas administrativas que incluyen la inhalación. Véase, por ejemplo, M. Sacchetti y M.M. Van Oort en: *Inhalation Aerosols: Physical and Biological Basis for Therapy*, A.J. Hickey, ed. Marcel Dekkar, Nueva York, 1996.

El secado por pulverización puede incluir atomizar una disolución, emulsión o suspensión para formar una niebla fina de gotitas y secar las gotitas. La niebla puede proyectarse en una cámara de secado (p.ej., un recipiente, tanque, tubo o espiral) donde contacta con un gas de secado. La niebla puede incluir agentes formadores de poros sólidos o líquidos. El disolvente y agentes formadores de poros evaporan desde las gotitas en el gas de secado para solidificar las gotitas, formando de forma simultánea poros por todo el sólido. El sólido (típicamente en una forma particulada en polvo) se separa entonces del gas de secado y se recoge.

El secado por pulverización incluye poner juntos un líquido altamente disperso, y un volumen suficiente de aire (p.ej., aire caliente) para producir la evaporación y el secado de las gotitas líquidas. El preparado para secar por pulverización puede ser cualquier disolución, suspensión de tratamiento, lechada, dispersión coloidal, o pasta que puede atomizarse usando un aparato de secado por pulverización seleccionado. Típicamente, la alimentación se pulveriza en una corriente de aire filtrado caliente que evapora el disolvente y transporta el producto seco a un colector. El aire gastado se expulsa entonces con el disolvente. Pueden usarse varios tipos diferentes de aparatos para proporcionar el producto deseado. Por ejemplo, los secadores por pulverización comerciales fabricados por Buch Ltd. o Niro Corp. pueden producir de forma efectiva partículas de tamaño deseado.

Las partículas en polvo secas por pulverización pueden ser aproximadamente esféricas de forma, casi uniformes en tamaño y frecuentemente huecas. Puede haber algún grado de irregularidad en la forma dependiendo del medicamento incorporado y las condiciones de secado por pulverización. En muchos ejemplos la estabilidad de la dispersión de las microesferas secas por pulverización parece ser más efectiva si se usa un agente de inflado (o agente de soplado) en su producción. Las realizaciones particularmente preferidas pueden comprender una emulsión con un agente de inflado como la fase dispersa o continua (siendo la otra fase de naturaleza acuosa). Un agente de inflado se dispersa preferiblemente con una disolución tensioactiva, usando, por ejemplo, un microfluidizador disponible comercialmente a una presión de aproximadamente 34474 a 103421 kPa (5000 a 15.000 psi). Este proceso forma una emulsión, preferiblemente estabilizada por un tensioactivo incorporado, que comprende típicamente gotitas submicra de agente de soplado inmisible con agua disperso en una fase continua acuosa. La formación de dichas dispersiones que usan esta y otras técnicas son comunes y bien conocidas por aquellos en la técnica. El agente de soplado es preferiblemente un compuesto fluorado (p.ej., perfluorohexano, bromuro de perfluorooctilo, perfluorodecalina, perfluorobutiletano) que vaporiza durante el proceso de secado por pulverización, dejando detrás generalmente microesferas aerodinámicamente ligeras, porosas, huecas. Como se tratará en más detalle a continuación, otros agentes de soplado adecuados incluyen cloroformo, freones e hidrocarburos. El gas nitrógeno y dióxido de carbono también se contemplan como un agente de soplado adecuado.

Aunque las microestructuras perforadas se forman preferiblemente usando un agente de soplado como se describe anteriormente, se apreciará que, en algunos ejemplos, no se requiere agente de soplado y una dispersión acuosa del medicamento y los tensioactivo(s) se secan por pulverización directamente. En dichos casos, la formulación puede ser susceptible a condiciones del proceso (p.ej., temperaturas elevadas) que generalmente llevan a la formación de micropartículas huecas, relativamente porosas. Además, el medicamento puede poseer propiedades fisicoquímicas especiales (p.ej., alta cristalinidad, elevada temperatura de fusión, actividad superficial, etc.) que lo hacen particularmente adecuado para usar en dichas técnicas.

Las microestructuras perforadas pueden asociarse opcionalmente con, o comprender, uno o más tensioactivos. Además, los tensioactivos miscibles pueden combinarse opcionalmente con la fase líquida del medio de suspensión. Se apreciará por los expertos en la técnica que el uso de tensioactivos puede aumentar adicionalmente la estabilidad de la dispersión, simplificar los procedimientos de formulación o aumentar la biodisponibilidad en la administración. Por supuesto las combinaciones de tensioactivos, que incluyen el uso de uno o más en la fase líquida y uno o más asociados con las microestructuras perforadas se contemplan como que están dentro del alcance de la presente descripción. Por "asociado con o que comprende" se entiende que la matriz estructural o microestructura perforada puede incorporar, adsorber, absorber, estar recubierta con o estar formada por el tensioactivo.

Los tensioactivos adecuados para usar incluyen cualquier compuesto o composición que ayude en la formación y mantenimiento de las dispersiones respiratorias estabilizadas formando una capa en la interfase entre la matriz estructural y el medio de suspensión. El tensioactivo puede comprender un único compuesto o cualquier combinación de compuestos, tal como en el caso de co-tensioactivos. Los tensioactivos particularmente preferidos son esencialmente insolubles en el propelente, no fluorados, y se seleccionan del grupo que consiste en lípidos saturados e insaturados, detergentes no iónicos, copolímeros en bloque no iónicos, tensioactivos iónicos, y combinaciones de dichos agentes. Debería ponerse énfasis en que, además de los tensioactivos mencionados anteriormente, los tensioactivos fluorados adecuados (es decir, biocompatibles) son compatibles con las enseñanzas en la presente memoria y pueden usarse para proporcionar los preparados estabilizados deseados.

Los lípidos, incluyendo fosfolípidos, de fuentes tanto naturales como sintéticas, pueden usarse en concentraciones variables para formar una matriz estructural. Generalmente, los lípidos compatibles comprenden aquellos que tienen una transición de gel a fase de cristal líquido mayor que aproximadamente 40°C. Preferiblemente, los lípidos incorporados son lípidos saturados de cadena relativamente larga (es decir, C₆-C₂₂) y más preferiblemente comprenden fosfolípidos. Fosfolípidos ejemplares útiles en los preparados estabilizados descritos comprenden fosfatidilcolina de huevo, dilaurilfosfatidilcolina, dioleilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina,

diesteroilfosfatidilcolina, fosfatidilcolinas de cadena corta, fosfatidiletanolamina, dioleilfosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, glucolípidos, gangliósido GM1, esfingomiélin, ácido fosfatídico, cardiolipina; lípidos que portan cadenas poliméricas tales como, polietilenglicol, quitina, ácido hialurónico, o polivinilpirrolidona; lípidos que portan mono-, di- y polisacáridos sulfonados; ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido oleico; colesterol, ésteres de colesterol y hemisuccinato de colesterol. Debido a sus excelentes características de biocompatibilidad, los fosfolípidos y combinaciones de fosfolípidos y poloxámeros son particularmente adecuados para usar en las dispersiones estabilizadas descritas en la presente memoria.

Los detergentes no iónicos compatibles comprenden: ésteres de sorbitano que incluyen trioleato de sorbitano (SpansTM 85), sesquioleato de sorbitano, monooleato de sorbitano, monolaurato de sorbitano, monolaurato de polioxietilén (20) sorbitano, y monooleato de polioxietilén (20) sorbitano, oleil polioxietilén (2) éter, estearil polioxietilén (2) éter, lauril polioxietilén (4) éter, ésteres de glicerol, y ésteres de sacarosa. Otros detergentes no iónicos adecuados pueden identificarse fácilmente usando McCutcheon's Emulsifiers and Detergents (McPublishing Co., Glen Rock, N.J.). Los copolímeros en bloque preferidos incluyen copolímeros dibloque o tribloque de polioxietileno y polioxipropileno, que incluyen poloxámero 188 (Pluronic.RTM.F68), poloxámero 407 (Pluronic.RTM.F-127) y poloxámero 338. Los tensioactivos iónicos tales como sulfosuccinato sódico, y jabones de ácidos grasos pueden utilizarse también. En realizaciones preferidas, las microestructuras pueden comprender ácido oleico o sus sales alcalinas.

Además de los tensioactivos mencionados anteriormente, los tensioactivos catiónicos o lípidos se prefieren especialmente en el caso de distribución de un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp o precursor del mismo). Ejemplos de lípidos catiónicos adecuados incluyen: DOTMA, cloruro de N-[-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio, DOTAP, 1,2-dioleiloxi-3-(trimetilamonio)propano; y DOTB, 1,2-dioleil-3-(4'-trimetilamonio)butanoil-sn-glicerol. Los aminoácidos policatiónicos tales como polilisina, y poliarginina se contemplan también.

Para el proceso de pulverización, pueden usarse métodos de pulverización tales como atomización giratoria, atomización por presión y atomización de dos fluidos. Ejemplos de los dispositivos usados en estos procesos incluyen "Mini-pulverizador Parabisu [representación fonética] GA-32" y "Secador por pulverización Parabisu DL-41", fabricado por Yamato Chemical Co., o "Secador por pulverización CL-8", "Secador por pulverización L-8", "Secador por pulverización FL-12", "Secador por pulverización FL-16" o "Secador por pulverización FL-20", fabricados por Okawara Kakoki Co., pueden usarse para el método de pulverización usando atomizador de disco giratorio.

Aunque no se ponen restricciones particulares al gas usado para secar el material pulverizado, se recomienda usar aire, gas nitrógeno o un gas inerte. La temperatura de la entrada del gas usado para secar los materiales pulverizados de manera que no provoque la desactivación por calor del material pulverizado. El intervalo de temperaturas puede variar entre aproximadamente 50°C a aproximadamente 200°C, preferiblemente entre aproximadamente 50°C y 100°C. La temperatura del gas de salida usado para secar el material pulverizado, puede variar entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 150°C, preferiblemente entre 0°C y 90°C, e incluso más preferiblemente entre 0°C y 60°C.

El secado por pulverización se hace bajo condiciones que dan por resultado polvo esencialmente amorfo de constitución homogénea que tiene un tamaño de partícula que es respirable, un bajo contenido en humedad y características de flujo que permiten la fácil aerosolización. Preferiblemente el tamaño de partícula del polvo resultante es tal que más del aproximadamente 98% de la masa está en partículas que tienen un diámetro de aproximadamente 10 µm o menos con aproximadamente el 90% de la masa estando en partículas que tienen un diámetro menor que 5 µm. De forma alternativa, aproximadamente el 95% de la masa tendrá partículas con un diámetro de menos de 10 µm con aproximadamente el 80% de la masa de las partículas que tienen un diámetro de menos de 5 µm.

Los polvos secos con base farmacéutica dispersables que incluyen el preparado de ARNi pueden combinarse opcionalmente con vehículos o excipientes farmacéuticos que son adecuados para la administración respiratoria y pulmonar. Dichos vehículos pueden servir sencillamente como agentes volumétricos cuando se desea reducir la concentración de ARNi en el polvo que se está distribuyendo a un paciente, pero pueden servir además para mejorar la estabilidad de las composiciones de ARNi y para mejorar la capacidad de dispersión del polvo en un dispositivo de dispersión de polvo para proporcionar una distribución más eficiente y reproducible del ARNi y para mejorar las características de manejo del ARNi tales como capacidad de flujo y consistencia para facilitar la fabricación y relleno de polvo.

Dichos materiales de transporte pueden combinarse con el fármaco antes del secado por pulverización, es decir, añadiendo el material de transporte a la disolución a granel purificada. De esta forma, las partículas de transporte se formarán de forma simultánea con las partículas de fármaco para producir un polvo homogéneo. De forma alternativa, los vehículos pueden prepararse de forma separada en una forma de polvo seco y combinarse con el fármaco en polvo seco mediante mezcla. Los vehículos en polvo serán normalmente cristalinos (para evitar la absorción de agua), pero en algunos casos podrían ser amorfos o mezclas de compuestos cristalinos y amorfos. El tamaño de las partículas de transporte puede seleccionarse para mejorar la capacidad de flujo del polvo de fármaco,

estando típicamente en el intervalo de 25 µm a 100 µm. Un material de transporte preferido es lactosa cristalina que tiene un tamaño en el intervalo indicado anteriormente.

Los polvos preparados mediante cualquiera de los métodos anteriores se recogerán del secador por pulverización de una manera convencional para el uso posterior. Para el uso como compuestos farmacéuticos y otros propósitos, será deseable frecuentemente alterar cualquier aglomerado que puede haberse formado por cribado u otras técnicas convencionales. Para usos farmacéuticos, las formulaciones en polvo secas normalmente se medirán en una dosis unitaria, y la dosis unitaria se sellará en un envase. Dichos envases son particularmente útiles para la dispersión en inhaladores de polvo seco, como se describe en detalle a continuación. De forma alternativa, los polvos pueden envasarse en recipientes de múltiples dosis.

Los métodos para el secado por pulverización fármacos y componentes hidrófobos y de otro tipo se describen en las Patentes de EE.UU. núms. 5.000.888; 5.026.550; 4.670.419, 4.540.602 y 4.486.435. Bloch y Speison (1983) Pharm. Acta Helv 58:14-22 enseña el secado por pulverización de hidrocortizida y clortalidona (fármacos lipofílicos) y un adyuvante hidrófilo (pentaeritritol) en disolventes azeotrópicos de dioxano-agua y 2-etoxietanol-agua. Un número de Resúmenes de solicitud de Patente Japonesa se refieren al secado por pulverización de combinaciones de producto hidrófilo-hidrófobo, que incluyen los documentos JP 806766; JP 7242568; JP 7101884; JP 7101883; JP 71018982; JP 7101881 y JP 4036233. Otras publicaciones de patente extranjeras pertinentes para el secado por pulverización de combinaciones de producto hidrófilo-hidrófobo incluyen los documentos FR 2594693; DE 2209477 y WO 88/07870.

Liofilización

La preparación de un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o un precursor del mismo) puede hacerse por liofilización. La liofilización es un proceso de secado por congelación en que el agua sublima desde la composición después de congelarse. La ventaja particular asociada con el proceso de liofilización es que los compuestos biológicos y los compuestos farmacéuticos que son relativamente inestables en una disolución acuosa pueden secarse sin temperaturas elevadas (eliminando así los efectos térmicos adversos), y después almacenarse en un estado seco donde hay pocos problemas de estabilidad. Con respecto a la actual descripción dichas técnicas son particularmente compatibles con la incorporación de ácidos nucleicos en microestructuras perforadas sin comprometer la actividad fisiológica. Los métodos para proporcionar particulados liofilizados se conocen por los expertos en la técnica y no requerirían claramente experimentación indebida para proporcionar microestructuras compatibles con la dispersión de acuerdo con las enseñanzas en la presente memoria. Por consiguiente, puesto que los procesos de liofilización pueden usarse para proporcionar microestructuras que tienen la porosidad y tamaño deseado, hay conformidad con las enseñanzas en la presente memoria y se contemplan expresamente como que están en el alcance la de actual descripción.

Direccionamiento

Para facilitar la exposición las formulaciones, composiciones y métodos en esta sección se tratan en gran parte con respecto a ARNi no modificados. Debería entenderse, sin embargo, que estas formulaciones, composiciones y métodos pueden practicarse con otros agentes de ARNi, p.ej., agentes de ARNi modificados, y dicha está dentro de la presente descripción.

En algunas realizaciones, un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo) tiene como objetivo una célula particular. Por ejemplo, un liposoma o partícula u otra estructura que incluye un ARNi puede incluir también un resto de direccionamiento que reconoce una molécula específica en una célula diana. El resto de direccionamiento puede ser una molécula con una afinidad específica por una célula diana. Los restos de direccionamiento pueden incluir anticuerpos dirigidos contra una proteína encontrada en la superficie de una célula diana, o el ligando o una parte de unión al receptor de un ligando para una molécula encontrada en la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el resto de direccionamiento puede reconocer un antígeno específico de cáncer del riñón (p.ej., G250, CA15-3, CA19-9, CEA o HER2/neu) o un antígeno vírico, distribuyendo por consiguiente el ARNi a una célula cancerígena o una célula infectada con un virus. Restos de direccionamiento ejemplares incluyen anticuerpos (tales como IgM, IgG, IgA, IgD y similares, o una parte funcional de los mismos), ligandos para receptores de la superficie celular (p.ej., ectodominios de los mismos).

La Tabla 3 proporciona un número de antígenos que pueden usarse para dirigir un ARNi a una célula seleccionada, como cuando se desea el direccionamiento del agente de ARNi a un tejido diferente del riñón.

Tabla 3. Antígenos de direccionamiento

ANTÍGENO	Tejido tumoral ejemplar
----------	-------------------------

CEA (antígeno carcinoembrionario)	Colon, mama, pulmón
PSA (antígeno específico de la próstata)	Cáncer de próstata
CA-125	Cáncer de ovario
CA 15-3	Cáncer de mama
CA 19-9	Cáncer de mama
HER2/neu	Cáncer de mama
α -feto proteína	Cáncer de testículo, cáncer hepático
β -HCG (gonadotropina coriónica humana)	Cáncer de testículo, coriocarcinoma
MUC-1	Cáncer de mama
Receptor de estrógeno	Cáncer de mama, cáncer de útero
Receptor de progesterona	Cáncer de mama, cáncer de útero
EGFr (receptor del factor de crecimiento epidérmico)	Cáncer de vejiga

5 En una realización, el resto de direccionamiento se une a un liposoma. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. 6.245.427 describe un método para dirigir un liposoma usando una proteína o péptido. En otro ejemplo, un componente lipídico catiónico del liposoma se deriva con un resto de direccionamiento. Por ejemplo, el documento WO 96/37194 describe la conversión de N-glutarildioleoilfosfatidiletanolamina a un éster activado de N-hidroxisuccinimida. El producto se acopló entonces a un péptido RGD.

Genes y enfermedades

10 En un aspecto, se describe en la presente memoria un método para tratar a un sujeto en riesgo de tener o aquejado de una proliferación celular indeseada, p.ej., proliferación celular maligna o no maligna. Los métodos incluyen: proporcionar un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNp o ARNi descrito en la presente memoria, p.ej., un ARNi que tiene una estructura descrita en la presente memoria, donde el ARNi es homólogo a y puede silenciar, p.ej., por escisión, un gen que promueve la proliferación celular indeseada;

15 administrar un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNp o ARNi descrito en la presente memoria a un sujeto, preferiblemente un sujeto humano, tratando así al sujeto.

En una realización preferida el gen es un factor de crecimiento o gen receptor del factor de crecimiento, una quinasa, p.ej., un gen de proteína tirosina, serina o treonina quinasa, un gen de proteína adaptadora, un gen que codifica una molécula de la superfamilia de la proteína G, o un gen que codifica un factor de transcripción.

20 En una realización preferida el agente de ARNi silencia el gen PDGF beta, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por expresión de PDGF beta indeseada, p.ej., cánceres de testículos y pulmón.

En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen Erb-B, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por expresión de Erb-B indeseada, p.ej., cáncer de mama.

25 En una realización preferida el agente de ARNi silencia el gen Src, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por expresión de Src indeseada, p.ej., cánceres de colon.

30 En una realización preferida el agente de ARNi silencia el gen CRK, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por expresión de CRK indeseada, p.ej., cánceres de colon y pulmón.

En una realización preferida el agente de ARNi silencia el gen GRB2, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o están en riesgo de tener un trastorno caracterizado por expresión de GRB2 indeseada, p.ej., carcinoma de células escamosas.

- En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen RAS, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por expresión de RAS indeseada, p.ej., cánceres de páncreas, colon y pulmón, y leucemia crónica.
- 5 En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen MEKK, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por expresión de MEKK indeseada, p.ej., carcinoma de células escamosas, melanoma o leucemia.
- En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen JNK, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de JNK indeseada, p.ej., cánceres de páncreas o mama.
- 10 En una realización preferida el agente de ARNi silencia el gen RAF, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de RAF indeseada, p.ej., cáncer de pulmón o leucemia.
- En una realización preferida el agente de ARNi silencia el gen Erk1/2, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de Erk1/2 indeseada, p.ej.,
- 15 cáncer de pulmón.
- En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen PCNA(p21), y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de PCNA indeseada, p.ej., cáncer de pulmón.
- 20 En una realización preferida el agente de ARNi silencia el gen MYB, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de MYB indeseada, p.ej., cáncer de colon o leucemia mielógena crónica.
- En una realización preferida el agente de ARNi silencia el gen c-MYC, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de c-MYC indeseada, p.ej., linfoma de Burkitt o neuroblastoma.
- 25 En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen JUN, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de JUN indeseada, p.ej., cánceres de ovario, próstata o mama.
- En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen FOS, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de FOS indeseada, p.ej.,
- 30 cánceres de piel o próstata.
- En una realización preferida el agente de ARNi silencia el gen BCL-2, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de BCL-2 indeseada, p.ej., cánceres de pulmón o próstata o linfoma no de Hodgkin.
- 35 En una realización preferida el agente de ARNi silencia el gen Ciclina D, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de Ciclina D indeseada, p.ej., cánceres de esófago y colon.
- En una realización preferida el agente de ARNi silencia el gen VEGF, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de VEGF indeseada, p.ej., cánceres de esófago y colon.
- 40 En una realización preferida el agente de ARNi silencia el gen EGFR, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de EGFR indeseada, p.ej., cáncer de mama.
- En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen Ciclina A, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de Ciclina A indeseada, p.ej., cánceres de pulmón y cuello de útero.
- 45 En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen Ciclina E, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de Ciclina E indeseada, p.ej., cánceres de pulmón y mama.
- 50 En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen WNT-1, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de WNT-1 indeseada, p.ej., carcinoma de células basales.

- En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen beta-catenina, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de beta-catenina indeseada, p.ej., adenocarcinoma o carcinoma hepatocelular.
- 5 En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen c-MET, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de c-MET indeseada, p.ej., carcinoma hepatocelular.
- En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen PKC, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de PKC indeseada, p.ej., cáncer de mama.
- 10 En una realización preferida el agente de ARNi silencia el gen NFkB, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de NFkB indeseada, p.ej., cáncer de mama.
- En una realización preferida el agente de ARNi silencia el gen STAT3, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de STAT3 indeseada, p.ej.,
- 15 cáncer de próstata.
- En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen survivina, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de survivina indeseada, p.ej., cánceres de cuello de útero o páncreas.
- 20 En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen Her2/Neu, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de Her2/Neu indeseada, p.ej., cáncer de mama.
- En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen topoisomerasa I, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de topoisomerasa I indeseada, p.ej., cánceres de ovarios y colon.
- 25 En una realización preferida el agente de ARNi silencia el gen topoisomerasa II alfa, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de topoisomerasa II indeseada, p.ej., cánceres de mama y colon.
- En una realización preferida el agente de ARNi silencia las mutaciones en el gen p73, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizados por la expresión de p73
- 30 indeseada, p.ej., adenocarcinoma colorrectal.
- En una realización preferida el agente de ARNi silencia las mutaciones en el gen p21(WAF1/CIP1), y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de p21(WAF1/CIP1) indeseada, p.ej., cáncer de hígado.
- 35 En una realización preferida el agente de ARNi silencia las mutaciones en el gen p27(KIP1), y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de p27(KIP1) indeseada, p.ej., cáncer de hígado.
- En una realización preferida el agente de ARNi silencia las mutaciones en el gen PPM1D, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de PPM1D indeseada, p.ej., cáncer de mama.
- 40 En una realización preferida el agente de ARNi silencia las mutaciones en el gen RAS, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de RAS indeseada, p.ej., cáncer de mama.
- En otra realización preferida el agente de ARNi silencia las mutaciones en el gen caveolina I, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de caveolina I indeseada, p.ej., carcinoma de células escamosas esofágico.
- 45 En otra realización preferida el agente de ARNi silencia las mutaciones en el gen MIB I, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de MIB i indeseada, p.ej., carcinoma de mama masculina (MBC).
- 50 En otra realización preferida el agente de ARNi silencia las mutaciones en el gen MTAI, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de MTAI indeseada, p.ej., carcinoma de ovario.

- En otra realización preferida el agente de ARNi silencia las mutaciones en el gen M68, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de M68 indeseada, p.ej., adenocarcinomas humanos del esófago, estómago, colon y recto.
- 5 En realizaciones preferidas el agente de ARNi silencia las mutaciones en los genes supresores tumorales, y por consiguiente puede usarse para promover la actividad apoptótica en combinación con compuestos quimioterapéuticos.
- En una realización preferida el agente de ARNi silencia las mutaciones en el gen supresor tumoral p53, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de p53 indeseada, p.ej., cánceres de vesícula biliar, páncreas y pulmón.
- 10 En una realización preferida el agente de ARNi silencia las mutaciones en el miembro de la familia p53 DN-p63, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de DN-p63 indeseada, p.ej., carcinoma de células escamosas.
- En una realización preferida el agente de ARNi silencia las mutaciones en el gen supresor tumoral pRb, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de pRb indeseada, p.ej., carcinoma de células escamosas orales.
- 15 En una realización preferida el agente de ARNi silencia las mutaciones en el gen supresor tumoral APC1, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de APC1 indeseada, p.ej., cáncer de colon.
- En una realización preferida el agente de ARNi silencia las mutaciones en el gen supresor tumoral BRCA1, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de BRCA1 indeseada, p.ej., cáncer de mama.
- 20 En una realización preferida el agente de ARNi silencia las mutaciones en el gen supresor tumoral PTEN, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión de PTEN indeseada, p.ej., hamartomas, gliomas y cánceres de próstata y endometrio.
- 25 En una realización preferida el agente de ARNi silencia los genes de fusión MLL, p.ej., MLL-AF9, y por consiguiente pueden usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión del gen de fusión MLL indeseada, p.ej., leucemias agudas.
- En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen de fusión BCR/ABL, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión del gen de fusión BCR/ABL indeseada, p.ej., leucemias crónicas y agudas.
- 30 En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen de fusión TEL/AML1, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión del gen de fusión TEL/AML1 indeseada, p.ej., leucemia aguda infantil.
- En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen de fusión EWS/FLI1, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión del gen de fusión EWS/FLI1 indeseado, p.ej., sarcoma de Ewing.
- 35 En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen de fusión TLS/FUS1, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión del gen de fusión TLS/FUS1 indeseado, p.ej., liposarcoma mixoide.
- 40 En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen de fusión PAX3/FKHR, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión del gen de fusión PAX3/FKHR indeseado, p.ej., liposarcoma mixoide.
- En otra realización preferida el agente de ARNi silencia el gen de fusión AML1/ETO, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión del gen de fusión AML1/ETO indeseado, p.ej., leucemia aguda.
- 45 En otro aspecto, se describe en la presente memoria un método para tratar a un sujeto, p.ej., un humano, en riesgo de tener o estar aquejado de una enfermedad o trastorno que puede beneficiar la inhibición de la angiogénesis, p.ej., cáncer. El método incluye:
- 50 Proporcionar un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi que tiene una estructura descrita en la presente memoria, cuyo agente de ARNi es homólogo a y puede silenciar, p.ej., por escisión, un gen que media la angiogénesis;
- Administrar el agente de ARNi a un sujeto,

Tratando por tanto al sujeto.

En una realización preferida el agente de ARNi silencia el gen alfa v-integrina, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la alfa V integrina, p.ej., tumores cerebrales o tumores de origen epitelial.

- 5 En una realización preferida el agente de ARNi silencia el gen receptor de Flt-1, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por los receptores de Flt-1 indeseados, p.ej., cáncer y artritis reumática.

10 En una realización preferida el agente de ARNi silencia el gen tubulina, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la tubulina indeseada, p.ej., cáncer y neovascularización retiniana.

En una realización preferida el agente de ARNi silencia el gen tubulina, y por consiguiente puede usarse para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por la tubulina indeseada, p.ej., cáncer y neovascularización retiniana.

- 15 En otro aspecto, se describe en la presente memoria un método para tratar a un sujeto infectado con un virus o en riesgo de o aquejado con un trastorno o enfermedad asociada con una infección vírica. El método incluye:

Proporcionar un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi que tiene una estructura descrita en la presente memoria, cuyo agente de ARNi es homólogo a y puede silenciar, p.ej., por escisión, un gen vírico de un gen celular que media la función vírica, p.ej., entrada o crecimiento;

Administrar el agente de ARNi a un sujeto, preferiblemente un sujeto humano,

- 20 Tratando por tanto al sujeto.

Por consiguiente, se describe en la presente memoria un método para tratar pacientes infectados por el virus de papiloma humano (VPH) o en riesgo de o aquejado con un trastorno mediado por VPH, p.ej., cáncer de cuello de útero. El VPH está ligado al 95% de los carcinomas del cuello de útero y por consiguiente una terapia antiviral es un método atractivo de tratar estos cánceres y otros síntomas de infección vírica.

- 25 En una realización preferida, la expresión de un gen de VPH se reduce. En otra realización preferida, el gen de VPH se uno del grupo de E2, E6 o E7.

En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación del VPH se reduce.

- 30 También se describe en la presente memoria un método para tratar pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) o en riesgo de o aquejado con un trastorno mediado por VIH, p.ej., Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

En una realización preferida, la expresión de un gen VIH se reduce. En otra realización preferida, el gen VIH es CCR5, Gag o Rev.

En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación del VIH se reduce. En otra realización preferida, el gen es CD4 o Tsg101.

- 35 También se describe en la presente memoria un método para tratar pacientes infectados por el virus de la hepatitis B (VHB) o en riesgo de o aquejado con un trastorno mediado por VHB, p.ej., cinhosis y carcinoma hepatocelular.

40 En una realización preferida, la expresión del VHB se reduce. En otra realización preferida, el gen VHB que es objetivo codifica uno del grupo de la región de la cola de la proteína central de VHB, la región pre-cregious (pre-c), o la región cregious (c). En otra realización preferida, una secuencia de VHB-ARN que es objetivo está comprendida por la cola poli(A).

En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación del VHB se reduce.

También se describe en la presente memoria un método para tratar pacientes infectados por el virus de la hepatitis A (VHA), o en riesgo de o aquejado con un trastorno mediado por el VHA.

En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación de VHA se reduce.

- 45 Se describe en la presente memoria un método para tratar pacientes infectados por el virus de la hepatitis C (VHC), o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por VHC, p.ej., cirrosis.

En una realización preferida, la expresión de un gen de VHC se reduce.

En otra realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación de VHC se reduce.

También se describe en la presente memoria un método para tratar pacientes infectados por cualquiera del grupo de cepas víricas de la hepatitis que comprenden la hepatitis D, E, F, G o H, o pacientes en riesgo de o aquejados con un trastorno mediado por cualquiera de estas cepas de hepatitis.

En una realización preferida, la expresión de un gen de hepatitis D, E, F, G o H se reduce.

- 5 En otra realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación de hepatitis D, E, F, G o H se reduce.

Los métodos descritos en la presente memoria para tratar pacientes infectados por el virus sincitial respiratorio (VSR) o en riesgo de o aquejados con un trastorno mediado por VSR, p.ej., infección del tracto respiratorio inferior en bebés y asma infantil, neumonía y otras complicaciones, p.ej., en los mayores.

- 10 En una realización preferida, la expresión de un gen VSR se reduce. En otra realización preferida, el gen de VHB que es objetivo codifica uno del grupo de genes N, L o P.

En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación de VSR se reduce.

- 15 Los métodos descritos en la presente memoria se proporcionan para tratar pacientes infectados por el Virus del herpes simple (VHS) o en riesgo de o aquejado con un trastorno mediado por VHS, p.ej., herpes genital y herpes labial además de enfermedad que amenaza la vida o déficit visual principalmente en pacientes inmunocomprometidos.

En una realización preferida, la expresión de un gen de VHS se reduce, en otra realización preferida, el gen de VHS que es objetivo codifica la ADN polimerasa o la helicasa-primasa.

En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación de VHS se reduce.

- 20 También se describe en la presente memoria un método para tratar pacientes infectados por el herpes Citomegalovirus (CMV) o en riesgo de o aquejado con un trastorno mediado por CMV, p.ej., infecciones víricas congénitas y morbilidad en pacientes inmunocomprometidos.

En una realización preferida, la expresión de un gen CMV se reduce.

En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación de CMV se reduce.

- 25 Los métodos descritos en la presente memoria también proporcionan un método para tratar pacientes infectados por el herpes virus de Epstein Ban (VEB) o en riesgo de o aquejado con un trastorno mediado por VEB, p.ej., linfoma de células NK/T, linfoma no de Hodgkin y enfermedad de Hodgkin.

En una realización preferida, la expresión del gen VEB se reduce.

En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación de VEB se reduce.

- 30 Los métodos descritos en la presente memoria proporcionados para tratar pacientes infectados por el virus de herpes asociado con sarcoma de Kaposi (VHSK), también denominado herpesvirus 8, o pacientes que están en riesgo de o aquejados por un trastorno mediado por VHSK, p.ej., sarcoma de Kaposi, enfermedad de Castleman multicéntrica y linfoma de efusión primaria asociado con SIDA.

En una realización, la expresión de un gen VHSK se reduce.

- 35 En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación de VHSK se reduce.

También se describe en al presente memoria un método para tratar pacientes infectados por el virus JC (VJC) o una enfermedad o trastorno asociado con este virus, p.ej., leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP).

En una realización preferida, la expresión de un gen VJC se reduce.

En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación de VJC se reduce.

- 40 Los métodos descritos en la presente memoria proporcionan también para el tratamiento de pacientes infectados por el mixovirus o en riesgo de o aquejados con un trastorno mediado por mixovirus, p.ej., gripe.

En una realización preferida, la expresión de un gen mixovirus se reduce.

En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación del mixovirus se reduce.

- 45 Los métodos descritos en la presente memoria también proporcionan para el tratamiento de pacientes infectados por rinovirus o en riesgo de o aquejados con un trastorno mediado por el rinovirus, p.ej., el resfriado común.

- En una realización preferida, la expresión de un gen rinovirus se reduce.
- En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación del rinovirus se reduce.
- 5 Los métodos descritos en la presente memoria también proporcionan tratamiento a pacientes infectados por el coronavirus o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por coronavirus, p.ej., el resfriado común.
- En una realización preferida, la expresión de un gen de coronavirus se reduce.
- En la realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación del coronavirus se reduce.
- 10 Los métodos descritos en la presente memoria también proporcionan tratamiento a pacientes infectados por el flavivirus del Nilo occidental o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por el virus del Nilo occidental.
- En una realización preferida, la expresión de un gen del virus del Nilo occidental se reduce. En otra realización preferida, el gen del virus del Nilo occidental es uno del grupo que comprende E, NS3 o NS5.
- En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación del virus del Nilo occidental se reduce.
- 15 Los métodos descritos en la presente memoria también proporcionan tratamiento a pacientes infectados por el flavivirus de encefalitis de San Luis, o en riesgo o aquejados de una enfermedad o trastorno asociado con este virus, p.ej., fiebre hemorrágica vírica o enfermedad neurológica.
- En una realización preferida, la expresión de un gen de encefalitis de San Luis se reduce.
- 20 En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación del virus de la encefalitis de San Luis se reduce.
- Los métodos descritos en la presente memoria también proporcionan tratamiento a pacientes infectados por el flavivirus de la encefalitis de Tick-borne, o en riesgo de o aquejados con un trastorno mediado por el virus de la encefalitis de Tick-borne, p.ej., fiebre hemorrágica vírica y enfermedad neurológica.
- En una realización preferida, la expresión de un gen de virus de encefalitis de Tick-borne se reduce.
- 25 En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación del virus de encefalitis de Tick-borne se reduce.
- Los métodos descritos en la presente memoria también proporcionan tratamiento a pacientes infectados por el flavivirus de la encefalitis del Valle de Murray, que normalmente da por resultado fiebre hemorrágica vírica y enfermedad neurológica.
- 30 En una realización preferida, la expresión de un gen del virus de encefalitis del valle de Murray se reduce.
- En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación del virus de la encefalitis del valle de Murray se reduce.
- También se describe en la presente memoria métodos para tratar pacientes infectados por el flavivirus del dengue, o una enfermedad o trastorno asociado con este virus, p.ej., la fiebre hemorrágica del dengue.
- 35 En una realización preferida, la expresión de un gen del virus del dengue se reduce.
- En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación del virus del dengue se reduce.
- Los métodos descritos en la presente memoria proporcionan también tratamiento a pacientes infectados por el virus del simio 40 (SV40) o en riesgo o aquejados con un trastorno mediado por el SV40, p.ej., tumorigénesis.
- 40 En una realización preferida, la expresión de un gen de SV40 se reduce.
- En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación de SV40 se reduce.
- También se describen en la presente memoria métodos para tratar pacientes infectados por el virus linfotrópico humano de células T (HTLV), o una enfermedad o trastorno asociado con este virus, p.ej., leucemia y mielopatía.
- 45 En una realización preferida, la expresión de un gen HTLV se reduce. En otra realización preferida el gen HTLV1 es el activador transcripcional Tax.

En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación del HTLV se reduce.

Los métodos descritos en la presente memoria también proporcionan tratamiento a pacientes infectados por el virus de la leucemia murina de Moloney (Mo-MuLV) o en riesgo o aquejado con un trastorno mediado por Mo-MuLV, p.ej., leucemia de células T.

5 En una realización preferida, la expresión de un gen Mo-MuLV se reduce.

En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación de Mo-MuLV se reduce.

10 Los métodos descritos en la presente memoria proporcionan también tratamiento a pacientes infectados por el virus de encefalomiocarditis (EMCV) o un riesgo de o aquejado con un trastorno mediado por EMCV, p.ej., miocarditis. EMCV lleva a la miocarditis en ratones y cerdos y es capaz de infectar las células del miocardio humano. Este virus se por lo tanto una preocupación para pacientes que se someten a xenotrasplante.

En una realización preferida, la expresión de un gen EMCV se reduce.

En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación de EMCV se reduce.

15 También se describe en la presente memoria un método para tratar pacientes infectados por el virus del sarampión (VS) o en riesgo de o aquejado con un trastorno mediado por VS, p.ej., sarampión.

En una realización preferida, la expresión de un gen de VS se reduce.

En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación del VS se reduce.

20 También se describe en la presente memoria un método para tratar pacientes infectados por el virus de la varicela zoster (VVZ) o en riesgo de o aquejado con un trastorno mediado por VVZ, p.ej., varicela o herpes (también llamado zoster).

En una realización preferida, la expresión de un gen de VVZ se reduce.

En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación de VVZ se reduce.

También se describe en la presente memoria un método para tratar pacientes infectados por un adenovirus o en riesgo o aquejado con un trastorno mediado por un adenovirus, p.ej., infección del tracto respiratorio.

25 En una realización preferida, la expresión de un gen de adenovirus se reduce.

En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación de adenovirus se reduce.

Se describe en la presente memoria un método para tratar pacientes infectados por un virus de la fiebre amarilla (VFA) o en riesgo de o aquejado con un trastorno mediado por un VFA, p.ej., infección del tracto respiratorio.

30 En una realización preferida, la expresión de un gen de VFA se reduce. En otra realización preferida, el gen preferido es uno de un grupo que incluye los genes E, NS2A o NS3.

En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación del VFA se reduce.

Los métodos descritos en la presente memoria proporcionan también tratamiento a pacientes infectados por el poliovirus o en riesgo de o aquejados con un trastorno mediado por poliovirus, p.ej., polio.

35 En una realización preferida, la expresión de un gen de poliovirus se reduce.

En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación del poliovirus se reduce.

Los métodos descritos en la presente memoria también proporcionan tratamiento a pacientes infectados por un virus de viruela o en riesgo de o aquejado con un trastorno mediado por un virus de viruela, p.ej., viruela.

40 En una realización preferida, la expresión de un gen de virus de viruela se reduce.

En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación del virus de la viruela se reduce.

En otro aspecto, se describen en la presente memoria métodos para tratar a un sujeto infectado con un patógeno, p.ej., un patógeno bacteriano, amebiano, parasitario o fúngico. El método incluye:

Proporcionar un agente de ARNi, p.ej., un ARNip que tiene la estructura descrita en la presente memoria, donde el ARNip es homólogo a y puede silenciar, p.ej., por escisión de un gen patógeno;

Administrar el agente de ARNi a un sujeto, preferiblemente un sujeto humano,

Tratando así al sujeto.

- 5 El gen diana puede ser uno implicado en el crecimiento, síntesis de la pared celular, síntesis de proteínas, transcripción, metabolismo de la energía, p.ej., el ciclo de Krebs, o la producción de toxinas.
- Por consiguiente, se describe en la presente memoria un método para tratar pacientes infectados por un plasmodio que provoca malaria.
- 10 En una realización preferida, la expresión de un gen plasmodio se reduce. En otra realización preferida, el gen es antígeno de la membrana apical 1 (AMA1).
- En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación del plasmodio se reduce.
- También se describen en la presente memoria métodos para tratar pacientes infectados por la *Mycobacterium ulcerans*, o una enfermedad o trastorno asociado con este patógeno, p.ej., úlceras de Buruli.
- 15 En una realización preferida, la expresión de un gen de *Mycobacterium ulcerans* se reduce.
- En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación de *Mycobacterium ulcerans* se reduce.
- También se describen en la presente memoria métodos para tratar pacientes infectados por el *Mycobacterium tuberculosis*, o una enfermedad o trastorno asociado con este patógeno, p.ej., tuberculosis.
- 20 En una realización preferida, la expresión de un gen de *Mycobacterium tuberculosis* se reduce.
- En una realización preferida, la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación de *Mycobacterium tuberculosis* se reduce.
- También se describen en la presente memoria métodos para tratar pacientes infectados por el *Mycobacterium leprae*, o una enfermedad o trastorno asociado con este patógeno, p.ej., lepra.
- 25 En una realización preferida, la expresión de un gen de *Mycobacterium leprae* se reduce.
- En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación del *Mycobacterium leprae* se reduce.
- También se describen en la presente memoria métodos para tratar pacientes infectados por la bacteria *Staphylococcus aureus*, o una enfermedad o trastorno asociado con este patógeno, p.ej., infecciones de la piel y membranas mucosas.
- 30 En una realización preferida, la expresión de un gen de *Staphylococcus aureus* se reduce.
- En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación de *Staphylococcus aureus* se reduce.
- También se describen en la presente memoria métodos para tratar pacientes infectados por la bacteria *Streptococcus pneumoniae*, o una enfermedad o trastorno asociado con este patógeno, p.ej., neumonía o infección del tracto respiratorio inferior en la infancia.
- 35 En una realización preferida, la expresión de un gen de *Streptococcus pneumoniae* se reduce.
- En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación de *Streptococcus pneumoniae* se reduce.
- 40 También se describen en la presente memoria métodos para tratar pacientes infectados por la bacteria *Streptococcus pyogenes*, o una enfermedad o trastorno asociado con este patógeno, p.ej., amigdalitis por estreptococos o escarlatina.
- En una realización preferida, la expresión de un gen de *Streptococcus pyogenes* se reduce.
- 45 En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación del *Streptococcus pyogenes* se reduce.

También se describen en la presente memoria métodos para tratar paciente infectados por la bacteria *Chlamydia pneumoniae*, o una enfermedad o trastorno asociado con este patógeno, p.ej., neumonía o infección del tracto respiratorio inferior infantil.

En una realización preferida, la expresión de un gen de *Chlamydia pneumoniae* se reduce.

- 5 En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación de *Chlamydia pneumoniae* se reduce.

También se describen en la presente memoria métodos para tratar pacientes infectados por la bacteria *Mycoplasma pneumoniae*, o una enfermedad o trastorno asociado con este patógeno, p.ej., neumonía o infección del tracto respiratorio inferior infantil.

- 10 En una realización preferida, la expresión de un gen de *Mycoplasma pneumoniae* se reduce.

En una realización preferida la expresión de un gen humano que se necesita para la replicación de *Mycoplasma pneumoniae* se reduce.

- 15 En un aspecto, se describe en la presente memoria un método para tratar a un sujeto, p.ej., un humano, en riesgo de o aquejado con una enfermedad o trastorno caracterizado por una respuesta inmune indeseada, p.ej., una enfermedad o trastorno inflamatorio, o una enfermedad o trastorno autoinmune. El método incluye: proporcionar un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi que tiene una estructura descrita en la presente memoria, cuyo agente de ARNi es homólogo a y puede silenciar, p.ej., por escisión, un gen que media una respuesta inmune indeseada;

Administrar el agente de ARNi a un sujeto,

Tratando por consiguiente al sujeto.

- 20 En una realización preferida la enfermedad o trastorno es una lesión por isquemia o reperfusión, p.ej., lesión por isquemia o reperfusión asociada con infarto agudo de miocardio, angina inestable, bypass cardiopulmonar, intervención quirúrgica, p.ej., angioplastia, p.ej., angioplastia coronaria transluminal percutánea, la respuesta a un órgano o tejido trasplantado, p.ej., tejido cardíaco o vascular trasplantado; o trombosis.

- 25 En una realización preferida la enfermedad o trastorno es restenosis, p.ej., restenosis asociada con intervención quirúrgica, p.ej., angioplastia, p.ej., angioplastia coronaria transluminal percutánea.

En una realización preferida la enfermedad o trastorno es Enfermedad intestinal inflamatoria, p.ej., enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

En una realización preferida la enfermedad o trastorno es la inflamación asociada con una infección o lesión.

- 30 En una realización preferida la enfermedad o trastorno se asma, lupus, esclerosis múltiple, diabetes, p.ej., diabetes tipo II, artritis, p.ej., reumatoide o soriática.

En realizaciones particularmente preferidas el agente de ARNi silencia una integrina o co-ligando de la misma, p.ej., VLA4, VACM, ICAM.

En realizaciones particularmente preferidas el agente de ARNi silencia una selectina o co-ligando de la misma, p.ej., P-selectina, E-selectina (ELAM), I-selectina, P-selectina glucoproteína-1 (PSGL-1).

- 35 En realizaciones particularmente preferidas el agente de ARNi silencia un componente del sistema complementario, p.ej., C3, C5, C3aR, C5aR, C3 convertasa, C5 convertasa.

En realizaciones particularmente preferidas el agente de ARNi silencia una quimioquina o receptor de la misma, p.ej., TNFI, TNFJ, IL-II, IL-1 J, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-6, IL-8, TNFRI, TNFRII, IgE, SCYA11, CCR3.

- 40 En otras realizaciones el agente de ARNi silencia GCSF, Gro1, Gro2, Gro3, PF4, MIG, Proteína básica pro-plaqueta (PPBP), MIP-1I, MIP-1J, RANTES, MCP-1, MCP-2, MCP-3, CMBKR1, CMBKR2, CMBKR3, CMBKR5, AIF-1, I-309.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un método para tratar a un sujeto, p.ej., un humano, en riesgo de o aquejado con dolor agudo o dolor crónico. El método incluye:

Proporcionar un agente de ARNi, cuyo ARNi es homólogo a y puede silenciar, p.ej., por escisión, un gen que media el proceso del dolor;

- 45 Administrar el ARNi a un sujeto,

Tratando así al sujeto.

En realizaciones particularmente preferidas el agente de ARNi silencia un componente de un canal de iones.

En realizaciones particularmente preferidas el agente de ARNi silencia un receptor o ligando de neurotransmisor.

En un aspecto, la invención caracteriza un método para tratar a un sujeto, p.ej., un humano, en riesgo de o aquejado por una enfermedad o trastorno neurológico. El método incluye:

5 Proporcionar un agente de ARNi cuyo ARNi es homólogo a y puede silenciar, p.ej., por escisión, un gen que media una enfermedad o trastorno neurológico;

Administrar el agente de ARNi a un sujeto,

Tratando así al sujeto.

En una realización preferida la enfermedad o trastorno es enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson.

10 En realizaciones particularmente preferidas el agente de ARNi silencia un gen de la familia amiloide, p.ej., APP; un gen de presenilina, p.ej., PSEN1 y PSEN2, o I-sinucleína.

En una realización preferida la enfermedad o trastorno es un trastorno de repetición del trinucleótido neurodegenerativo, p.ej., enfermedad de Huntington, atrofia dentatorubro palidoluisiana o una ataxia espinocerebelar, SCA1, SCA2, SCA3 (enfermedad de Machado-Joseph), SCA7 o SCA8.

15 En realizaciones particularmente preferidas el agente de ARNi silencia HD, DRPLA, SCA1, SCA2, MJD1, CACNL1A4, SCA7, SCA8.

La pérdida de heterocigosidad (LOH) puede dar por resultado la hemicigosidad para la secuencia, p.ej., genes, en el área de LOH. Esto puede dar por resultado una significativa diferencia genética entre las células normales y en estado enfermo, p.ej., células cancerígenas, y proporciona una diferencia útil entre las células normales y en estado enfermo, p.ej., células cancerígenas. Esta diferencia puede surgir porque un gen u otra secuencia es heterocigosa en células euploides pero es hemicigosa en células que tienen LOH. Las regiones de LOH incluirán normalmente un gen, cuya pérdida promueve la proliferación indeseada, p.ej., un gen supresor tumoral, y otras secuencias que incluyen, p.ej., otros genes, en algunos casos un gen que es esencial para la función normal, p.ej., crecimiento. Los métodos descritos en la presente memoria, dependen, en parte, de la escisión específica o silenciamiento de un alelo de un gen esencial con un agente de ARNi descrito en la presente memoria. El agente de ARNi se selecciona de manera que tenga como objetivo el alelo simple del gen esencial encontrado en las células que tienen LOH, pero no silencian el otro alelo, que está presente en células que no muestran LOH. En esencia, discrimina entre los dos alelos, silenciando preferentemente el alelo seleccionado. En esencia los polimorfismos, p.ej., SNPs de genes esenciales que están afectados por LOH, se usan como una diana para un trastorno caracterizado por células que tienen LOH, p.ej., células cancerígenas que tienen LOH.

30 P.ej., un experto en la técnica puede identificar genes esenciales que están en la proximidad de genes supresores tumorales, y que están en una región LOH que incluye el gen supresor tumoral. El gen que codifica la subunidad grande de la ARN polimerasa II humana POLR2A, un gen localizado muy cerca del gen supresor tumoral p53, es dicho gen. Se da frecuentemente en una región de LOH en células cancerígenas. Otros genes que se dan en las regiones LOH y se pierden en muchos tipos de células cancerígenas incluyen el grupo que comprende la subunidad de 70 kDa de la proteína de replicación A, proteína de replicación A de 32 kD, ribonucleótido reductasa, timidilato sintasa, factor 2H asociado a TATA, proteína ribosómica S1 4, factor de iniciación eucariótico 5 A, alanil ARNt sintetasa, cisteinil ARNt sintetasa, NaK ATPasa, subunidad alfa-1, y receptor de transferrina.

Por consiguiente, se describe en la presente memoria un método para tratar un trastorno caracterizado por LOH, p.ej., cáncer. El método incluye:

40 Opcionalmente, determinar el genotipo del alelo de un gen en la región de LOH y preferiblemente determinar el genotipo de ambos alelos del gen en una célula normal;

Proporcionar un agente de ARNi que preferentemente escinde o silencia el alelo encontrado en las células LOH;

Administrar el ARNi al sujeto,

Tratando así el trastorno.

45 También se describe en la presente memoria un agente de ARNi descrito en la presente memoria, p.ej., un agente de ARNi que puede silenciar preferentemente, p.ej., escindir, un alelo de un gen polimórfico.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un método de escisión o silenciamiento de más de un gen con un agente de ARNi. En estas realizaciones el agente de ARNi se selecciona de manera que tiene suficiente homología con una secuencia encontrada en más de un gen. Por ejemplo, la secuencia AAGCTGGCCCTGGACATGGAGAT (SEQ ID NO:28) se conserva entre lamina B1 de ratón, lamina B2, complejo de queratina 2 del gen 1 y lamina A/C. Por consiguiente el agente de ARNi que tiene como objetivo esta secuencia silenciaría de forma efectiva la colección completa de genes.

También se describe en la presente memoria un agente de ARNi descrito en la presente memoria, que puede silenciar más de un gen.

Ruta de distribución

5 Para facilitar la exposición las formulaciones, composiciones y métodos en esta sección se tratan en gran parte con respecto a agentes de ARNi no modificados. Debería entenderse, sin embargo, que estas formulaciones, composiciones y métodos pueden practicarse con otros agentes de ARNi, p.ej., agentes de ARNi modificados, y dicha práctica está dentro de la presente descripción. Una composición que incluye un ARNi puede distribuirse a un sujeto mediante una variedad de rutas. Las rutas ejemplares incluyen: intravenosa, tópica, rectal, anal, vaginal, nasal, pulmonar, ocular.

10 Las moléculas de ARNi descritas en la presente memoria pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración. Dichas composiciones incluyen típicamente una o más especies de ARNi y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente memoria el lenguaje "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Salvo en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en la composición. También pueden incorporarse compuestos activos suplementarios en las composiciones.

20 Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden administrarse en un número de formas que dependen de si se desea tratamiento local o sistémico y del área a tratar. La administración puede ser tópica (que incluye oftálmica, vaginal, rectal, intranasal, transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye goteo intravenoso, inyección subcutánea, intraperitoneal o intramuscular, o administración intratecal o intraventricular.

25 La ruta y el sitio de administración puede elegirse para mejorar el direccionamiento. Por ejemplo, para fijar como objetivo células musculares, la inyección intramuscular en los músculos de interés sería una elección lógica. Las células pulmonares se fijarían como objetivo administrando el ARNi en forma de aerosol. Las células endoteliales vasculares podrían fijarse como objetivo recubriendo un catéter de balón con el ARNi e introduciendo mecánicamente el ADN.

30 La formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Los vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o deseables. Los condones, guantes y similares recubiertos pueden también ser útiles.

35 Las composiciones para la administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o disoluciones en agua, jarabes, elixires o medios no acuosos, comprimidos, cápsulas, pastillas para chupar o tabletas. En el caso de comprimidos, los vehículos que pueden usarse incluyen lactosa, citrato sódico y sales de ácido fosfórico. Varios disgregantes tales como almidón, y agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, laurilsulfato sódico y talco, se usan normalmente en comprimidos. Para la administración oral en forma de cápsulas, son diluyentes útiles la lactosa y polietilenglicoles de alto peso molecular. Cuando se necesitan suspensiones acuosas para uso oral, pueden combinarse composiciones de ácido nucleico con agentes emulgentes y de suspensión. Si se desea, pueden añadirse ciertos agentes edulcorantes y/o aromatizantes.

40 Las composiciones para la administración intratecal o intraventricular pueden incluir disoluciones acuosas estériles que pueden contener también tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados.

45 Las formulaciones para la administración parenteral pueden incluir disoluciones acuosas estériles que pueden contener también tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. La inyección intraventricular puede facilitarse por un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito. Para el uso intravenoso, la concentración total de solutos debería controlarse para dar el preparado isotónico.

50 Para la administración ocular, pueden distribuirse pomadas o líquidos para gotas mediante sistemas de distribución ocular conocidos en la técnica tal como aplicadores o cuentagotas oculares. Dichas composiciones pueden incluir mucomiméticos tales como ácido hialurónico, sulfato de condroitina, hidroxipropilmetilcelulosa o poli(alcohol de vinilo), conservantes tales como ácido sórbico, EDTA o cloruro de bencilcronio, y las cantidades normales de diluyentes y/o vehículos.

Distribución tópica

55 Para facilitar la exposición las formulaciones, composiciones y métodos en esta sección se tratan en gran parte con respecto a agentes de ARNi no modificados. Debería entenderse, sin embargo, que estas formulaciones, composiciones y métodos pueden practicarse con otros agentes de ARNi, p.ej., agentes de ARNi modificados, y dicha práctica está en la presente descripción. En una realización preferida, un agente de ARNi, p.ej., un agente de

- ARNi bicatenario, o agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo) se distribuye a un sujeto por medio de administración tópica. "Administración tópica" se refiere a la distribución a un sujeto poniendo en contacto la formulación directamente con una superficie del sujeto. La forma más común de distribución tópica es a la piel, pero una composición descrita en la presente memoria pueden también aplicarse de forma directa a otras superficies del cuerpo, p.ej., al ojo, una membrana mucosa, a superficies de una cavidad corporal o a una superficie interna. Como se menciona anteriormente, la distribución tópica más común es a la piel. El término abarca varias rutas de administración que incluyen, aunque no están limitadas a, tópica y transdérmica. Estos modos de administración incluyen típicamente la penetración de la barrera de permeabilidad de la piel y la distribución eficiente al tejido o estrato diana. La administración tópica puede usarse como un medio para penetrar la epidermis y la dermis y en última instancia conseguir la distribución sistémica de la composición. La administración tópica puede usarse también como un medio para distribuir de forma selectiva oligonucleótidos a la epidermis o dermis de un sujeto, o a estratos específicos de los mismos, o a un tejido subyacente.
- El término "piel", como se usa en la presente memoria, se refiere a la epidermis y/o dermis de un animal. La piel de mamífero consiste en dos capas principales, distintas. La capa externa de la piel se llama epidermis. La epidermis está comprendida por el estrato córneo, el estrato granuloso, el estrato espinoso y el estrato basal, estando el estrato córneo en la superficie de la piel y siendo el estrato basal la parte más profunda de la epidermis. La epidermis es de entre 50 μm y 0,2 mm de espesor, dependiendo de su localización en el cuerpo.
- Debajo de la epidermis está la dermis, que es significativamente más gruesa que la epidermis. La dermis está compuesta principalmente por colágeno en forma de haces de fibras. Los haces de colágeno proporcionan soporte para, entre otros, vasos sanguíneos, capilares linfáticos, glándulas, terminaciones nerviosas y células inmunológicamente activas.
- Una de las funciones principales de la piel como un órgano es regular la entrada de sustancias al cuerpo. La principal barrera de permeabilidad de la piel está proporcionada por el estrato córneo, que está formado por muchas capas de células en varios estados de diferenciación. Los espacios entre células en el estrato córneo están rellenos con diferentes lípidos dispuestos en formaciones tipo red que proporcionan sellos para mejorar adicionalmente la barrera de permeabilidad de la piel.
- La barrera de permeabilidad proporcionada por la piel es tal que es esencialmente impermeable a moléculas que tienen un peso molecular mayor que aproximadamente 750 Da. Para que moléculas mayores crucen la barrera de permeabilidad de la piel, deben usarse mecanismos distintos de la ósmosis normal.
- Varios factores determinan la permeabilidad de la piel para agentes administrados. Estos factores incluyen las características de la piel tratada, las características del agente de distribución, interacciones tanto entre el fármaco y el agente de distribución como del fármaco y la piel, la dosis del fármaco aplicado, la forma de tratamiento, y el régimen posterior al tratamiento. Para fijar como objetivo de forma selectiva la epidermis y la dermis, a veces es posible formular una composición que comprende uno o más potenciadores de la penetración que permitirán la penetración del fármaco a un estrato preseleccionado.
- La distribución transdérmica es una ruta valiosa para la administración de compuestos terapéuticos solubles en lípidos. La dermis es más permeable que la epidermis y por lo tanto la absorción es mucho más rápida a través de la piel raspada, quemada o denudada. La inflamación y otras afecciones fisiológicas que aumentan el flujo sanguíneo a la piel también aumentan la adsorción transdérmica. La absorción por medio de esta ruta puede potenciarse mediante el uso de un vehículo oleoso (untura) o a través del uso de uno o más potenciadores de la penetración. Otras formas efectivas de distribuir una composición descrita en la presente memoria por medio de la ruta transdérmica incluyen hidratación de la piel y el uso de parches tópicos de liberación controlada. La ruta transdérmica proporciona unos medios potencialmente efectivos para distribuir una composición descrita en la presente memoria para la terapia sistémica y/o local.
- Además, la iontoforesis (transferencia de solutos iónicos a través de membranas biológicas bajo la influencia de un campo eléctrico) (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, pág. 163), fonoforesis y sonoforesis (uso de ultrasonidos para potenciar la absorción de diversos agentes terapéuticos a través de membranas biológicas, de forma notable la piel y la córnea) (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, pág. 166), y optimización de características de vehículo respecto a la posición y retención de dosis en el sitio de administración (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, pág. 168) pueden ser métodos útiles para potenciar el transporte de composiciones aplicadas de forma tópica a través de sitios de la piel y la mucosa.
- Las composiciones y métodos proporcionados pueden usarse también para examinar la función de varias proteínas y genes *in vitro* en tejidos dérmicos cultivados o conservados y en animales. La presente descripción puede aplicarse por consiguiente para examinar la función de cualquier gen. Los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse también de forma terapéutica o profiláctica. Por ejemplo, para el tratamiento de animales que se sabe o se sospecha que experimentan enfermedades tales como soriasis, líquen plano, necrólisis epidérmica tóxica,

eritema multiforme, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, enfermedad de Paget, sarcoma de Kaposi, fibrosis pulmonar, enfermedad de Lyme e infecciones víricas, fúngicas y bacterianas de la piel.

Distribución pulmonar

5 Para facilitar la exposición las formulaciones, composiciones y métodos en esta sección se tratan en gran parte con respecto a agentes de ARNi no modificados. Debería entenderse, sin embargo, que estas formulaciones, composiciones y métodos pueden practicarse con otros agentes de ARNi, p.ej., agentes de ARNi modificados, y dicha práctica está dentro de la presente descripción. Una composición que incluye un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, un agente de ARNp, (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo) puede administrarse a un sujeto por distribución pulmonar. Las composiciones de distribución pulmonar pueden distribuirse por inhalación por el paciente de una dispersión de manera que la composición, preferiblemente ARNi, en la dispersión pueda alcanzar el pulmón donde puede absorberse fácilmente a través de la región alveolar directamente a la circulación sanguínea. La distribución pulmonar puede ser efectiva tanto para distribución sistémica como para distribución localizada para tratar enfermedades de los pulmones.

La distribución pulmonar puede alcanzarse por diferentes enfoques, que incluyen el uso de formulaciones con base nebulizada, aerosolizada, micelular y de polvo seco. La distribución puede alcanzarse con nebulizadores líquidos, inhaladores con base de aerosol, y dispositivos de dispersión en polvo seco. Se prefieren los dispositivos de dosis medida. Uno de los beneficios de usar un atomizador o inhalador es que el potencial para la contaminación se minimiza porque los dispositivos son estancos. Los dispositivos de dispersión de polvo seco, por ejemplo, distribuyen fármacos que pueden formularse fácilmente como polvos secos. Una composición de ARNi puede almacenarse de forma estable como polvos liofilizados o secos por pulverización por si mismos o en combinación con vehículos en polvo adecuados. La distribución de una composición para la inhalación puede medirse por un elemento que mide el tiempo de dosificación que puede incluir un temporizador, un contador de dosis, un dispositivo que mide el tiempo, o un indicador del tiempo que cuando se incorpora al dispositivo permite la localización de la dosis, monitorización de cumplimiento y/o desencadenante de dosis a un paciente durante la administración del medicamento en aerosol.

El término “polvo” significa una composición que consiste en partículas sólidas finamente dispersas que están libres flotando y son capaces de dispersarse fácilmente en un dispositivo de inhalación y posteriormente inhalarse por un sujeto de manera que las partículas alcancen los pulmones para permitir la penetración en los alveolos. Por consiguiente, el polvo se dice que es “respirable”. Preferiblemente el tamaño de partícula promedio es menor que aproximadamente 10 μm en diámetro preferiblemente con una distribución de forma esferoidal relativamente uniforme. Más preferiblemente el diámetro es menor que aproximadamente 7,5 μm y lo más preferiblemente menor que aproximadamente 5,0 μm . Normalmente la distribución de tamaño de partícula está entre aproximadamente 0,1 μm y aproximadamente 5 μm de diámetro, particularmente aproximadamente 0,3 μm a aproximadamente 5 μm .

El término “seco” significa que la composición tiene un contenido en humedad por debajo de aproximadamente 10% en peso (% en peso) en agua, normalmente por debajo de aproximadamente 5% y preferiblemente menor que aproximadamente 3% en peso. Una composición en seco puede ser tal que las partículas sean fácilmente dispersables en un dispositivo de inhalación para formar un aerosol.

El término “cantidad terapéuticamente efectiva” es la cantidad presente en la composición que se necesita para proporcionar el nivel deseado de fármaco en el sujeto a tratar para dar la respuesta fisiológica anticipada.

El término “cantidad fisiológicamente efectiva” es la cantidad distribuida a un sujeto para dar el efecto paliativo o curativo deseado.

45 El término “vehículo farmacéuticamente aceptable” significa que el vehículo puede llevarse a los pulmones sin efectos toxicológicos adversos significativos en los pulmones.

Los tipos de excipientes farmacéuticos que son útiles como vehículo incluyen estabilizadores tales como albúmina sérica humana (HSA), agentes volumétricos como carbohidratos, aminoácidos y polipéptidos; ajustadores de pH o tampones; sales tales como cloruro sódico; y similares. Estos vehículos pueden estar en una forma cristalina o amorfa o puede ser una mezcla de los dos.

Los agente volumétricos que son particularmente valiosos incluyen carbohidratos, polipéptidos, aminoácidos o combinaciones de los mismos compatibles. Carbohidratos adecuados incluyen monosacáridos tales como galactosa, D-manosa, sorbosa, y similares; disacáridos tales como lactosa, trehalosa, y similares; ciclodextrinas, tal como 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina; y polisacáridos, tal como rafinosa, maltodextrinas, dextranos y similares; alditoles, tales como manitol, xilitol y similares. Un grupo preferido de carbohidratos incluye lactosa, trehalosa, rafinosa, maltodextrinas y manitol. Los polipéptidos adecuados incluyen aspartama. Los aminoácidos incluyen alanina y glicina, prefiriéndose la glicina.

Los aditivos, que son componentes minoritarios de la composición descrita en la presente memoria, pueden incluirse para la estabilidad conformacional durante el secado por pulverización y para mejorar la capacidad de dispersión del polvo. Estos aditivos incluyen aminoácidos hidrófobos tales como triptófano, tirosina, leucina, fenilalanina y similares.

- 5 Ajustadores de pH o tampones adecuados incluyen sales orgánicas preparadas a partir de ácidos y bases orgánicas, tales como citrato sódico, ascorbato sódico, y similares; se prefiere el citrato sódico.

La administración pulmonar de una formulación de ARNi micelar puede alcanzarse a través de dispositivos de pulverización de dosis medida con propulsores tales como tetrafluoroetano, heptafluoroetano, dimetilfluoropropano, tetrafluoropropano, butano, isobutano, dimetiléter y otros propelentes de CFC o no CFC.

Distribución oral o nasal

- 10 Para facilitar la exposición las formulaciones, composiciones y métodos en esta sección se tratan en gran parte con respecto a agentes de ARNi no modificados. Debería entenderse, sin embargo, que estas formulaciones, composiciones y métodos pueden practicarse con otros agentes de ARNi, p.ej., agentes de ARNi modificados, y dicha práctica está dentro de la presente descripción. Tanto las membranas orales como nasales ofrecen ventajas sobre otras rutas de administración. Por ejemplo, los fármacos administrados a través de estas membranas tienen un rápido comienzo de acción, proporcionan niveles terapéuticos en plasma, evitan el efecto del primer paso de metabolismo hepático, y evitan la exposición del fármaco al medio gastrointestinal (GI) hostil. Las ventajas adicionales incluyen el fácil acceso a los sitios de membrana de manera que el fármaco puede aplicarse, localizarse y eliminarse fácilmente.

- 20 En la distribución oral, las composiciones pueden dirigirse a una superficie a la cavidad oral, p.ej., a la mucosa sublingual que incluye la membrana de la superficie ventral de la lengua y el suelo de la boca o la mucosa bucal que constituye el revestimiento de la mejilla. La mucosa sublingual es relativamente permeable dando por consiguiente una rápida absorción y una aceptable biodisponibilidad de muchos fármacos. Además, la mucosa sublingual es conveniente, aceptable y fácilmente accesible.

- 25 La capacidad de las moléculas para permear a través de la mucosa oral parece que está relacionada con el tamaño molecular, solubilidad lipídica e ionización de proteína peptídica. Las moléculas pequeñas, menores de 1000 daltons parecen cruzar la mucosa rápidamente. Cuando el tamaño molecular aumenta, la permeabilidad disminuye rápidamente. Los compuestos solubles en lípidos son más permeables que las moléculas solubles no lipídicas. La máxima absorción se da cuando las moléculas no están ionizadas o son neutras en cargas eléctricas. Por lo tanto las moléculas cargadas presentan los mayores desafíos a la absorción a través de las mucosas orales.

- 30 Una composición farmacéutica de ARNi puede administrarse también a la cavidad bucal de un ser humano por pulverización en la cavidad, sin inhalación, desde un dispensador de pulverización de dosis medida, una formulación farmacéutica micelar mixta como se describe anteriormente y un propelente. En una realización, el dispensador se agita primero antes de la pulverización de la formulación farmacéutica y propelente en la cavidad bucal.

Dispositivos

- 35 Para facilitar la exposición los dispositivos, las formulaciones, composiciones y métodos en esta sección se tratan en gran parte con respecto a agentes de ARNi no modificados. Debería entenderse, sin embargo, que estos dispositivos, formulaciones, composiciones y métodos pueden practicarse con otros agentes de ARNi, p.ej., agentes de ARNi modificados, y dicha práctica está dentro de la presente descripción. Un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp o precursor del mismo) puede disponerse sobre o en un dispositivo, p.ej., un dispositivo que se implanta o se coloca en otra parte en un sujeto. Los dispositivos ejemplares incluyen dispositivos que se introducen en la vasculatura, p.ej., dispositivos insertados en el lumen de un tejido vascular, o que los propios dispositivos forman parte de la vasculatura, incluyendo stents, catéteres, válvulas cardíacas, y otros dispositivos vasculares. Estos dispositivos, p.ej., catéteres o stents, pueden colocarse en la vasculatura del pulmón, corazón o pierna.

Otros dispositivos incluyen dispositivos que no son vasculares, p.ej., dispositivos implantados en el peritoneo, o en tejido orgánico o glandular, p.ej., órganos artificiales. El dispositivo puede liberar una sustancia terapéutica además de un ARNi, p.ej., un dispositivo puede liberar insulina.

Otros dispositivos incluyen articulaciones artificiales, p.ej., articulaciones de cadera, y otros implantes ortopédicos.

- 50 En una realización, las dosis unitarias o dosis medidas de una composición que incluye ARNi se dispensan mediante un dispositivo implantado. El dispositivo puede incluir un sensor que monitoriza un parámetro en un sujeto. Por ejemplo, el dispositivo puede incluir una bomba, p.ej., y, opcionalmente, componentes electrónicos asociados.

El tejido, p.ej., células u órganos, tal como el riñón, puede tratarse con un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en

un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo) ex vivo y después administrarse o implantarse en un sujeto.

5 El tejido puede ser tejido autólogo, alogénico o xenogénico. Por ejemplo, el tejido (p.ej., riñón) puede tratarse para reducir la enfermedad de injerto contra huésped. En otras realizaciones, el tejido es alogénico y el tejido se trata para tratar un trastorno caracterizado por la expresión génica indeseada en ese tejido, tal como en el riñón. En otro ejemplo, el tejido que contiene células hematopoyéticas, p.ej., células hematopoyéticas de médula ósea, pueden tratarse para inhibir la proliferación celular no deseada.

La introducción de tejido tratado, o autólogo o de trasplante, puede combinarse con otras terapias.

10 En algunas implementaciones, las células tratadas con ARNi se aíslan de otras células, p.ej., mediante una barrera porosa semipermeable que evita que las células abandonen el implante, pero permite que las moléculas del cuerpo alcancen las células y las moléculas producidas por las células entren en el cuerpo. En una realización, la barrera porosa se forma a partir de alginato.

15 En una realización, un dispositivo contraceptivo se recubre con o contiene un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo). Los dispositivos ejemplares incluyen condones, diafragmas, DIU (dispositivos uterinos implantables), esponjas, preservativos vaginales y dispositivos de control de la natalidad. En una realización, el ARNi se elige para inactivar el espermatozoide o el óvulo. En otra realización, el ARNi se elige para ser complementario a un ARN vírico o patógeno, p.ej., un ARN de una ETS. En algunos ejemplos, la composición de ARNi puede incluir un espermicida.

Dosis

25 En un aspecto, se describe en la presente memoria un método de administración de un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, a un sujeto (p.ej., un sujeto humano). El método incluye administrar una dosis unitaria del agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNp, p.ej., un agente de ARNp bicatenario que (a) la parte bicatenaria es de 19-25 nucleótidos (nt) de largo, preferiblemente 21-23 nt, (b) es complementario a un ARN diana (p.ej., un ARN diana endógeno o patógeno), y, opcionalmente, (c) incluye al menos un saliente 3' de 1-5 nucleótidos de largo. En una realización, la dosis unitaria es menor que 1,4 mg por kg de peso corporal o menor que 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005 o 0,00001 mg por kg de peso corporal, y menos de 200 nmoles de agente de ARN (p.ej., aproximadamente $4,4 \times 10^{16}$ copias) por kg de peso corporal, o menos de 1500, 750, 300, 150, 75, 15, 7,5, 1,5, 0,75, 0,15, 0,075, 0,015, 0,0075, 0,0015, 0,00075, 0,00015 nmoles de agente de ARN por kg de peso corporal.

30 La cantidad definida puede ser una cantidad efectiva para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno, p.ej., una enfermedad o trastorno asociado con el ARN diana, tal como un ARN presente en el riñón. La dosis unitaria, por ejemplo, puede administrarse por inyección (p.ej., intravenosa o intramuscular), una dosis inhalada o una aplicación tópica. Las dosis particularmente preferidas son menores de 2, 1, o 0,1 mg/kg de peso corporal.

En una realización preferida, la dosis unitaria se administra menos frecuentemente que una vez al día, p.ej., menos que cada 2, 4, 8 o 30 días. En otra realización, la dosis unitaria no se administra con una frecuencia (p.ej., no una frecuencia regular). Por ejemplo, la dosis unitaria puede administrarse una única vez.

40 En una realización, la dosis efectiva se administra con otras modalidades terapéuticas tradicionales. En una realización, el sujeto tiene una infección vírica y la modalidad es un agente antiviral distinto de un agente de ARNi, p.ej., distinto de un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp. En otra realización, el sujeto tiene aterosclerosis y la dosis efectiva de un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, se administra en combinación con, p.ej., después de intervención quirúrgica, p.ej., angioplastia.

45 En una realización, un sujeto se administra una dosis inicial y una o más dosis de mantenimiento de un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo). La dosis o las dosis de mantenimiento son generalmente menores que la dosis inicial, p.ej., una mitad de la dosis inicial. Un régimen de mantenimiento puede incluir tratar al sujeto con una dosis o dosis que oscilan de 0,01 μ g a 1,4 mg/kg de peso corporal por día, p.ej., 10, 1, 50 0,1, 0,01, 0,001 o 0,00001 mg por kg de peso corporal por día. Las dosis de mantenimiento se administran preferiblemente no más de una vez cada 5, 10 o 30 días. Además, el régimen de tratamiento puede durar durante un periodo de tiempo que variará dependiendo de la naturaleza de la enfermedad particular, su gravedad y la condición total del paciente. En realizaciones preferidas la dosis puede distribuirse no más de una vez al día, p.ej., no más de una vez por 24, 36, 48 o más horas, p.ej., no más de una vez cada 5 u 8 días. Después del tratamiento, el paciente puede monitorizarse por cambios en su afección y por el alivio de los síntomas del estado de la enfermedad. La dosis del compuesto puede o bien aumentarse en el caso de que el paciente no responda significativamente a los niveles de dosis actuales, o la dosis puede disminuirse si se observa un alivio de los síntomas del estado de la enfermedad, si el estado de la enfermedad se ha extirpado, o si se observan efectos secundarios indeseados.

La dosis efectiva puede administrarse en una única dosis o en dos o más dosis, como se desee o considere apropiado bajo las circunstancias específicas. Si se desea facilitar infusiones repetidas o frecuentes, el implante de un dispositivo de distribución, p.ej., una bomba, stent semi-permanente (p.ej., intravenoso, intraperitoneal, intracisterna o intracapsular), o depósito puede ser recomendable.

5 En una realización, la composición farmacéutica de agente de ARNi incluye una pluralidad de especies de agente de ARNi. En otra realización, la especie de agente de ARNi tiene secuencias que no se solapan y no son adyacentes a otras especies con respecto a una secuencia diana que se da de forma natural. En otra realización, la pluralidad de especies de agente de ARNi es específica para diferentes genes diana que se dan de forma natural. En otra realización, el agente de ARNi es específico del alelo.

10 En algunos casos, un paciente se trata con un agente de ARNi en conjunto con otras modalidades terapéuticas. Por ejemplo, a un paciente que se trata para una enfermedad renal, p.ej., enfermedad renal en la etapa temprana, puede administrarse un agente de ARNi específico para un gen diana conocido por mejorar la progresión de la enfermedad en conjunto con un fármaco conocido por inhibir la actividad del producto génico diana. Por ejemplo, un paciente que tiene enfermedad renal en la etapa temprana puede tratarse con un agente de ARNi que tiene como objetivo un ARN SGLT2, en conjunto con la pequeña molécula de florizina, que se conoce por bloquear el cotransporte de sodio-glucosa y posteriormente reducir la velocidad de filtración glomerular de la nefrona sencilla. En otro ejemplo, un paciente que se trata para un cáncer de riñón puede administrarse con un agente de ARNi específico para una diana esencial para la proliferación celular tumoral en conjunto con una quimioterapia.

20 Después del tratamiento exitoso, puede ser deseable tener al paciente sometido a terapia de mantenimiento para evitar la recurrencia del estado de enfermedad, en el que el compuesto descrito en la presente memoria se administra en dosis de mantenimiento, que oscilan de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal (véase el documento US 6.107.094).

25 La concentración de la composición del agente de ARNi es una cantidad suficiente para ser efectiva en el tratamiento o prevención de un trastorno o para regular una condición fisiológica en humanos. La concentración o cantidad del agente de ARNi administrado dependerá de los parámetros determinados para el agente y el método de administración, p.ej., nasal, bucal, pulmonar. Por ejemplo, las formulaciones nasales tienden a necesitar concentraciones mucho menores de algunos ingredientes para evitar la irritación o quemado de los pasajes nasales. A veces es deseable diluir una formulación oral hasta 10-100 veces para proporcionar una formulación nasal adecuada.

30 Ciertos factores pueden influir en la dosis necesaria para tratar de forma efectiva a un sujeto, incluyendo aunque no limitado a la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo) puede incluir un único tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. Se apreciará además que la dosis efectiva de un agente de ARNi tal como un agente de ARNp usado para el tratamiento puede aumentar o disminuir durante el curso de un tratamiento particular. Los cambios en la dosis pueden resultar y ser evidentes a partir de los resultados de los ensayos diagnósticos como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, el sujeto puede monitorizarse después de administrar una composición de agente de ARNi. En base a la información procedente de la monitorización, una cantidad adicional de la composición del agente de ARNi puede administrarse.

45 La dosificación es dependiente de la gravedad y la capacidad de respuesta de la enfermedad a tratar, con el tratamiento durando de varios días a varios meses, o hasta que la cura se efectúa o se alcance una disminución del estado de enfermedad. Los programas de dosificación óptima pueden calcularse a partir de medidas de acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Los expertos pueden determinar fácilmente las dosis óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. Las dosis óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de compuestos individuales, y pueden generalmente estimarse en las CE50 que se han encontrado que son efectivos en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En algunas realizaciones, los modelos animales incluyen animales transgénicos que expresan un gen humano, p.ej., un gen que produce un ARN diana. El animal transgénico puede ser deficiente para el correspondiente ARN endógeno. En otra realización, la composición para la prueba incluye un agente de ARNi que es complementario, al menos en una región interna, a una secuencia que se conserva entre el ARN diana en el modelo animal y el ARN diana en un humano.

55 Los inventores han descubierto que los agentes de ARNi descritos en la presente memoria pueden administrarse a mamíferos, particularmente mamíferos grandes tales como primates no humanos o humanos en un número de formas.

En una realización, la administración de la composición de agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, es parenteral, p.ej., intravenosa (p.ej., como un bolo o como una infusión difundible), intradérmica, intraperitoneal, intramuscular, intratecal, intraventricular, intracraneal, subcutánea, transmucosa, bucal, sublingual, endoscópica, rectal, oral, vaginal, tópica, pulmonar, intranasal, uretral u ocular. La administración puede

proporcionarse por el sujeto o por otra persona, p.ej., un proveedor de cuidado de la salud. La medicación puede proporcionarse en dosis medidas o en un dispensador que distribuye una dosis medida. Los modos seleccionados de distribución se tratan en más detalle a continuación.

5 Se describen en la presente memoria métodos, composiciones y kits, para administración o distribución rectal de agentes de ARNi descritos en la presente memoria.

10 Por consiguiente, un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo) descrito en la presente memoria, p.ej., una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de ARNi descrito en la presente memoria, p.ej., un agente de ARNi que tiene una región bicatenaria de menos de 40, y preferiblemente menos de 30 nucleótidos y que tiene uno o dos salientes 3' monocatenarios de 1-3 nucleótidos puede administrarse de forma rectal, p.ej., introducido a través del recto en el colon inferior o superior. Este enfoque es particularmente útil en el tratamiento de, trastornos inflamatorios, trastornos caracterizados por la proliferación celular indeseada, p.ej., pólipos o cáncer de colon.

15 La medicación puede distribuirse a un sitio en el colon introduciendo un dispositivo de dispensación, p.ej., un dispositivo flexible, guiado por una cámara, similar al usado para la inspección del colon o eliminación de pólipos, que incluye medios para la distribución de la medicación.

20 La administración rectal del agente de ARNi es por medio de un enema. El agente de ARNi del enema puede disolverse en una solución salina o tamponada. La administración rectal puede ser también por medio de un supositorio, que puede incluir otros ingredientes, p.ej., un excipiente, p.ej., manteca de cacao o hidropropilmetilcelulosa.

Cualquiera de los agente de ARNi descritos en la presente memoria pueden administrarse de forma oral, p.ej., en forma de comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, pastillas para chupar, tabletas o jarabes líquidos. Además, la composición puede aplicarse tópicamente a una superficie de la cavidad oral.

25 Cualquiera de los agentes de ARNi descritos en la presente memoria pueden administrarse bucalmente. Por ejemplo, la medicación puede pulverizarse en la cavidad bucal o aplicarse directamente, p.ej., en una forma líquida, sólida o gel a una superficie en la cavidad bucal. Esta administración es particularmente deseable para el tratamiento de inflamaciones de la cavidad bucal, p.ej., las encías o lengua, p.ej., en una realización, la administración bucal es pulverizando en la cavidad, p.ej., sin inhalación, a partir de un dispensador, p.ej., un dispensador de pulverización de dosis medida que dispensa la composición farmacéutica y un propelente.

30 Cualquiera de los agentes de ARNi descritos en la presente memoria puede administrarse al tejido ocular. Por ejemplo, las medicaciones pueden aplicarse a la superficie del ojo o tejido cercano, p.ej., el interior del párpado. Pueden aplicarse de forma tópica, p.ej., pulverizando, en gotas, como un lavado ocular, o una pomada. La administración puede proporcionarse por el sujeto o por otra persona, p.ej., un proveedor del cuidado de la salud. La medicación puede proporcionarse en dosis medidas o en un dispensador que distribuye una dosis medida. La medicación puede también administrarse al interior del ojo, y puede introducirse mediante una aguja u otro dispositivo de distribución que pueden introducirla en un área o estructura seleccionada. El tratamiento ocular es particularmente deseable para tratar la inflamación del ojo o tejido cercano.

35 Cualquiera de los agentes de ARNi descritos en la presente memoria puede administrarse directamente a la piel. Por ejemplo, la medicación puede aplicarse tópicamente o distribuirse a una capa de la piel, p.ej., mediante el uso de una microaguja o una batería de microagujas que penetran en la piel, pero preferiblemente en el tejido muscular subyacente. La administración de la composición del agente de ARNi puede ser tópica. Las aplicaciones tópicas pueden, por ejemplo, distribuir la composición a la dermis o epidermis de un sujeto. La administración tópica puede ser en forma de parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos o polvos. Una composición para la administración tópica puede formularse como un liposoma, micela, emulsión u otro montaje molecular lipófilo. La administración transdérmica puede aplicarse con al menos un potenciador de penetración, tal como iontoforesis, fonoforesis y sonoforesis.

40 Cualquiera de los agentes de ARNi descritos en la presente memoria pueden administrarse al sistema pulmonar. La administración pulmonar puede conseguirse por inhalación o por la introducción de un dispositivo de distribución en el sistema pulmonar, p.ej., introduciendo un dispositivo de distribución que puede dispensar la medicación. Un método preferido de distribución pulmonar es por inhalación. La medicación puede proporcionarse en un dispensador que distribuye la medicación, p.ej., húmeda o seca, en una forma suficientemente pequeña de manera que puede inhalarse. El dispositivo puede distribuir una dosis medida de medicación. El sujeto, u otra persona, puede administrar la medicación.

55 La distribución pulmonar es efectiva no solo para trastornos que afectan directamente al tejido pulmonar, sino también para trastornos que afectan a otro tejido.

Los agentes de ARNi pueden formularse como un líquido o no líquido, p.ej., un polvo, cristal o aerosol para la distribución pulmonar.

5 Cualquiera de los agentes de ARNi descritos en la presente memoria pueden administrarse de forma nasal. La administración nasal puede conseguirse por introducción de un dispositivo de distribución en la nariz, p.ej., introduciendo un dispositivo de distribución que puede dispensar la medicación. Los métodos de distribución nasal incluyen pulverización, aerosol, líquido, p.ej., mediante gotas, o por administración tópica a una superficie de la cavidad nasal. La medicación puede proporcionarse en un dispensador con distribución de la medicación, p.ej., húmeda o seca, en una forma suficientemente pequeña de manera que pueda inhalarse. El dispositivo puede distribuir una dosis medida de medicación. El sujeto, u otra persona, puede administrar la medicación.

10 La distribución nasal es efectiva no solo para trastornos que afectan directamente al tejido nasal, sino también para trastornos que afectan a otro tejido.

Los agentes de ARNi pueden formularse como un líquido o no líquido, p.ej., un polvo, cristal o para distribución nasal.

15 Un agente de ARNi puede empaquetarse en una cápside natural vírica o en una cápside o estructura artificial producida químicamente o enzimáticamente derivada de ella.

La dosis de una composición farmacéutica que incluye un agente de ARNi puede administrarse para aliviar los síntomas de un estado de enfermedad, p.ej., cáncer o enfermedad cardiovascular. Un sujeto puede tratarse con la composición farmacéutica mediante cualquiera de los métodos mencionados anteriormente.

20 La expresión génica en un sujeto puede modularse administrando una composición farmacéutica que incluye un agente de ARNi.

Un sujeto puede tratarse administrando una cantidad definida de una composición de agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp) que está en forma de polvo, p.ej., una colección de micropartículas, tal como partículas cristalinas. La composición puede incluir una pluralidad de agentes de ARNi, p.ej., específicos para uno o más ARN diana endógenos diferentes. El método puede incluir otras características descritas en la presente memoria.

25

Un sujeto puede tratarse administrando una cantidad definida de una composición de agente de ARNi que se prepara por un método que incluye secar por pulverización, es decir, atomizar una disolución, emulsión o suspensión líquidas, exponer inmediatamente las gotas a un gas de secado, y recoger las partículas en polvo porosas resultantes. La composición puede incluir una pluralidad de agentes de ARNi, p.ej., específicos para uno o más ARN diana endógenos diferentes. El método puede incluir otras características descritas en la presente memoria.

30

El agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario o agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo) pueden proporcionarse en una forma en polvo, cristalizada u otra forma finamente dividida, con o sin un vehículo, p.ej., una micro- o nano-partícula adecuada para la inhalación o distribución pulmonar distinta. Esto puede incluir proporcionar un preparado en aerosol, p.ej., una composición seca por pulverización aerosolizada. La composición en aerosol puede proporcionarse en y/o dispensarse mediante un dispositivo de distribución de dosis medida.

35

El sujeto puede tratarse para una afección tratable por inhalación, p.ej., aerosolizando una composición de agente de ARNi seco por pulverización, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo) e inhalando la composición aerosolizada. El agente de ARNi puede ser un ARNp. La composición puede incluir una pluralidad de agentes de ARNi, p.ej., específicos para uno o más ARN diana endógenos diferentes. El método puede incluir otras características descritas en la presente memoria.

40

45

Un sujeto puede tratarse, por ejemplo, administrando una composición que incluye una cantidad efectiva/definida de un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo), en el que la composición se prepara mediante un método que incluye secado por pulverización, liofilización, secado al vacío, evaporación, secado en lecho fluido, o una combinación de estas técnicas.

50

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un método que incluye: evaluar un parámetro relacionado con la abundancia de un transcrito en una célula de un sujeto; comparar el parámetro evaluado con un valor de referencia, y si el parámetro evaluado tiene una relación preseleccionada al valor de referencia (p.ej., es mayor), administrar un agente de ARNi (o un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi o precursor del mismo) al sujeto. En una realización, el

55

agente de ARNi incluye una secuencia que es complementaria al transcrito evaluado. Por ejemplo, el parámetro puede ser una medida directa de los niveles de transcrito, una medida de un nivel de proteína, un síntoma o caracterización de una enfermedad o trastorno (p.ej., velocidad de proliferación celular y/o masa del tumor, carga vírica).

5 En otro aspecto, se describe en la presente memoria un método que incluye: administrar una primera cantidad de una composición que comprende un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo) a un sujeto, en el que el agente de ARNi incluye una cadena esencialmente complementaria a un ácido nucleico diana; evaluar una actividad asociada con una proteína codificada por el ácido nucleico diana; en el que la evaluación se usa para determinar si una segunda cantidad debería administrarse. En una realización preferida el método incluye administrar una segunda cantidad de la composición, en la que el tiempo de administración o dosis de la segunda cantidad es una función de la evaluación. El método puede incluir otras características descritas en la presente memoria.

15 En otro aspecto, se describe en la presente memoria un método de administración de una fuente de un agente de ARNi bicatenario (agente de ARNi bc) a un sujeto. El método incluye administrar o implantar una fuente de un agente de ARNi bc, p.ej., un agente de ARNp, que (a) incluye una región bicatenaria que tiene 19-25 nucleótidos de largo, preferiblemente 21-23 nucleótidos, (b) es complementaria a un ARN diana (p.ej., un ARN endógeno o un ARN patógeno), y, opcionalmente, (c) incluye al menos un saliente 3' de 1-5 nt de largo. En una realización, la fuente libera agente de ARNi bc en el tiempo, p.ej., la fuente es una fuente controlada o de liberación lenta, p.ej., una micropartícula que gradualmente libera el agente de ARNi bc. En otra realización, la fuente es una bomba, p.ej., una bomba que incluye un sensor o una bomba que puede liberar una o más dosis unitarias.

25 En un aspecto, se describe en la presente memoria una composición farmacéutica que incluye un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo) que incluye una secuencia de nucleótidos complementaria a un ARN diana, p.ej., esencialmente y/o exactamente complementaria. El ARN diana puede ser un transcrito de un gen humano endógeno. En una realización, el agente de ARNi (a) tiene de 19-25 nucleótidos de largo, preferiblemente 21-23 nucleótidos, (b) es complementario a un ARN diana endógeno, y, opcionalmente, (c) incluye al menos un saliente 3' de 1-5 nt de largo. En una realización, la composición farmacéutica puede ser una emulsión, microemulsión, crema, gelatina o liposoma.

En un ejemplo la composición farmacéutica incluye un agente de ARNi mezclado con un agente de distribución tópica. El agente de distribución tópica puede ser una pluralidad de vesículas microscópicas. Las vesículas microscópicas pueden ser liposomas. En una realización preferida los liposomas son liposomas catiónicos.

35 En otro aspecto, la composición farmacéutica incluye un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo) mezclado con un potenciador de penetración tópico. En una realización, el potenciador de penetración tópico es un ácido graso. El ácido graso puede ser ácido araquidónico, ácido oleico, ácido laurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linoléico, dicaprato, tricaprato, monoleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un alquil C₁₋₁₀ éster, monoglicérido, diglicérido o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

40 En otra realización, el potenciador de penetración tópico es una sal biliar. La sal biliar puede ser ácido cólico, ácido deshídrocólico, ácido desoxicólico, ácido glucólico, ácido glicólico, ácido glucodesoxicólico, ácido taurocólico, ácido taurodesoxicólico, ácido quenodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico, tauro-24,25-dihidro-fusidato sódico, glucodihidrofusidato sódico, polioxietileno-9-lauriléter o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En otra realización, el potenciador de penetración es un agente quelante. El agente quelante puede ser EDTA, ácido cítrico, un salicilato, un N-acil derivado de colágeno, laureth-9, un N-aminoacil derivado de una beta-dicetona o una mezcla de los mismos.

50 En otra realización, el potenciador de penetración es un tensioactivo, p.ej., un tensioactivo iónico o no iónico. El tensioactivo puede ser laurilsulfato sódico, polioxietileno-9-lauriléter, polioxietileno-20-cetiléter, una emulsión perfluoroquímica o mezcla de los mismos.

En otra realización, el potenciador de penetración puede seleccionarse de un grupo que consiste en ureas cíclicas insaturadas, 1-alquil-alconas, 1-alquenilazaciclo-alcanonas, agentes anti-inflamatorios esteroideos y mezclas de los mismos. En aún otra realización el potenciador de penetración puede ser un glicol, un pinol, una azona o unos terpenos.

En un aspecto, se describe en la presente memoria una composición farmacéutica que incluye un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande

que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo) en una forma adecuada para la distribución oral. En una realización, la distribución oral puede usarse para distribuir una composición de agente de ARNi a una célula o una región del tracto gastrointestinal, p.ej., intestino delgado, colon (p.ej., para tratar un cáncer de colon), etcétera. La forma de distribución oral puede ser comprimidos, cápsulas o cápsulas de gel. En una realización, el agente de ARNi de la composición farmacéutica modula la expresión de una proteína de adhesión celular, modula una velocidad de proliferación celular, o tiene actividad biológica contra los patógenos eucariotas o retrovirus. En otra realización, la composición farmacéutica incluye un material entérico que previene esencialmente la disolución de los comprimidos, cápsulas o cápsulas de gel en el estómago de un mamífero. En una realización preferida el material entérico es un recubrimiento. El recubrimiento puede ser acetato ftalato, propilenglicol, monooleato de sorbitano, trimelitato acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa o ftalato acetato de celulosa.

En otra realización, la forma de dosis oral de la composición farmacéutica incluye un potenciador de penetración. El potenciador de penetración puede ser una sal biliar o un ácido graso. La sal biliar puede ser ácido ursodesoxicólico, ácido quenodesoxicólico, y sales de los mismos. El ácido graso puede ser ácido cáprico, ácido laurico y sales de los mismos.

En otra realización, la forma de dosis oral de la composición farmacéutica incluye un excipiente. En un ejemplo el excipiente es polietilenglicol. En otro ejemplo el excipiente es precirol.

En otra realización, la forma de dosis oral de la composición farmacéutica incluye un plastificador. El plastificador puede ser ftalato de dietilo, sebacato de triacetina-dibutilo, ftalato de dibutilo o citrato de trietilo.

En un aspecto, se describe en la presente memoria una composición farmacéutica que incluye un agente de ARNi y un vehículo de distribución. En una realización, el agente de ARNi es (a) tiene de 19-25 nucleótidos de largo, preferiblemente 21-23 nucleótidos, (b) es complementario a un ARN diana endógeno, y, opcionalmente, (c) incluye al menos un saliente 3' de 1-5 nucleótidos de largo.

En una realización, el vehículo de distribución puede distribuir un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario o un agente de ARNp, (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp o precursor del mismo) a una célula mediante una ruta de administración. El vehículo de distribución puede ser vesículas microscópicas. En un ejemplo las vesículas microscópicas son liposomas. En una realización preferida los liposomas son liposomas catiónicos. En otro ejemplo las vesículas microscópicas son micelas. En un aspecto, se describe en la presente memoria una composición farmacéutica que incluye un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp o precursor del mismo) en una forma de dosificación inyectable. En una realización, la forma de dosificación inyectable de la composición farmacéutica incluye disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles. En una realización preferida la disolución estéril puede incluir un diluyente tal como agua; solución salina; aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina o propilenglicol.

En un aspecto, se describe en la presente memoria una composición farmacéutica que incluye un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo) en una forma de dosificación oral. En una realización, la forma de dosificación oral se selecciona del grupo que consiste en comprimidos, cápsulas y cápsulas de gel. En otra realización, la composición farmacéutica incluye un material entérico que esencialmente previene la disolución de los comprimidos, cápsulas o cápsulas de gel en el estómago de un mamífero. En una realización preferida el material entérico es un recubrimiento. El recubrimiento puede ser ftalato acetato, propilenglicol, monooleato de sorbitano, trimelitato acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa o ftalato acetato de celulosa. En una realización, la forma de dosificación oral de la composición farmacéutica incluye un potenciador de penetración, p.ej., un potenciador de penetración descrito en la presente memoria.

En un aspecto, se describe en la presente memoria es una composición farmacéutica que incluye un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp o precursor del mismo) en una forma de dosificación rectal. En una realización, la forma de dosificación rectal es un enema. En otra realización, la forma de dosificación rectal es un supositorio.

En un aspecto, se describe en la presente memoria una composición farmacéutica que incluye un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo) en una forma de dosificación vaginal. En una realización, la forma de dosificación vaginal es un supositorio. En otra realización, la forma de dosificación vaginal es una espuma, crema o gel.

5 En un aspecto, se describe en la presente memoria una composición farmacéutica que incluye un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo) en una forma de dosificación pulmonar o nasal. En una realización, el agente de ARNi se incorpora en una partícula, p.ej., una macropartícula, p.ej., una microesfera. La partícula puede producirse por secado por pulverización, liofilización, evaporación, secado en lecho fluido, secado al vacío, o una combinación de los mismos. La microesfera puede formularse como una suspensión, un polvo o un sólido implantable.

10 En un aspecto, se describe en la presente memoria una composición de agente de ARNi seco por pulverización, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo) adecuada para la inhalación por un sujeto, que incluye: (a) una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de ARNi adecuada para tratar una afección en el sujeto por inhalación; (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste en carbohidratos y aminoácidos; y (c) opcionalmente, una cantidad que mejora la capacidad de dispersión de un polipéptido soluble en agua, fisiológicamente aceptable.

15 En una realización, el excipiente es un carbohidrato. El carbohidrato puede seleccionarse del grupo que consiste en monosacáridos, disacáridos, trisacáridos y polisacáridos. En una realización preferida el carbohidrato es un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en dextrosa, galactosa, manitol, D-manosa, sorbitol y sorbosa.

20 En una realización preferida el carbohidrato es un disacárido seleccionado del grupo que consiste en lactosa, maltosa, sacarosa y trehalosa.

25 En otra realización, el excipiente es un aminoácido. En una realización, el aminoácido es un aminoácido hidrófobo. En una realización preferida el aminoácido hidrófobo se selecciona del grupo que consiste en alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano y valina. En aún otra realización el aminoácido es un aminoácido polar. En una realización preferida el aminoácido se selecciona del grupo que consiste en arginina, histidina, lisina, cisteína, glicina, glutamina, serina, treonina, tirosina, ácido aspártico y ácido glutámico.

En una realización, el polipéptido que mejora la capacidad de dispersión se selecciona del grupo que consiste en albúmina sérica humana, α -lactoalbúmina, tripsinógeno y polialanina.

30 En una realización, la composición de agente de ARNi seco por pulverización incluye partículas que tienen un diámetro medio de masa (DMM) de menos de 10 micras. En otra realización, la composición de agente de ARNi seco por pulverización incluye partículas que tienen un diámetro medio de masa de menos de 5 micras. En aún otra realización la composición de agente de ARNi seco por pulverización incluye partículas que tienen un diámetro aerodinámico medio de masa (DAMM) de menos de 5 micras.

35 En ciertos aspectos diferentes, se describen en la presente memoria kits que incluyen un recipiente adecuado que contiene una formulación farmacéutica de un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp o precursor del mismo). En ciertas realizaciones los componentes individuales de la formulación farmacéutica pueden proporcionarse en un recipiente. De forma alternativa, puede ser deseable proporcionar los componentes de la formulación farmacéutica de forma separada en dos o más recipientes, p.ej., un recipiente para un preparado de agente de ARNi, y al menos otro para el compuesto de transporte. El kit puede empaquetarse en un número de configuraciones diferentes tales como uno o más recipientes en una única caja. Los diferentes componentes pueden combinarse, p.ej., según las instrucciones proporcionadas con el kit. Los componentes pueden combinarse según un método descrito en la presente memoria, p.ej., para preparar y administrar una composición farmacéutica. El kit puede incluir también un dispositivo de distribución.

45 En otro aspecto, se describe en la presente memoria un dispositivo, p.ej., un dispositivo implantable, en el que el dispositivo puede dispensar o administrar una composición que incluye un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario o agente de ARNp (p.ej., un precursor, p.ej., un agente de ARNi más grande que puede procesarse en un agente de ARNp, o un ADN que codifica un agente de ARNi, p.ej., un agente de ARNi bicatenario, o agente de ARNp, o precursor del mismo), p.ej., un agente de ARNi que silencia un transcrito endógeno. En una realización, el dispositivo está recubierto con la composición. En otra realización el agente de ARNi se dispone dentro del dispositivo. En otra realización, el dispositivo incluye un mecanismo que dispensa una dosis unitaria de la composición. En otras realizaciones el dispositivo libera la composición de forma continua, p.ej., por difusión. Los dispositivos ejemplares incluyen stents, catéteres, bombas, órganos o componentes de órganos artificiales (p.ej., corazón artificial, una válvula cardíaca, etc.) y suturas.

55 Como se usa en la presente memoria, el término "cristalino" describe un sólido que tiene la estructura o características de un cristal, es decir, partículas de estructura tridimensional en que las caras planas se cruzan en ángulos definidos y en que hay una estructura interna regular. Las composiciones descritas en la presente memoria

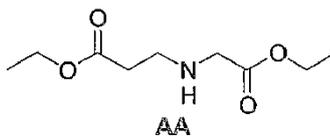
pueden tener diferentes formas cristalinas. Las formas cristalinas pueden prepararse por una variedad de métodos, que incluyen, por ejemplo, secado por pulverización.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deberían construirse como más limitantes.

5 Ejemplos

Ejemplo 1:

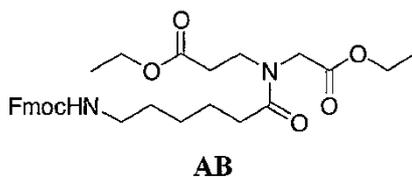
2-Azabutano-1,4-dicarboxilato de dietilo AA



- 10 Se añadió una disolución acuosa 4,7M de hidróxido sódico (50 mL) en una disolución enfriada con hielo, agitada, de hidrocloreuro de glicinato de etilo (32,19 g, 0,23 moles) en agua (50 mL). Después, se añadió acrilato de etilo (23,1 g, 0,23 moles) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que se verificó la terminación de la reacción por TLC (19 h). Después de 19 h se repartió con diclorometano (3x100 mL). La fase orgánica se secó con sulfato sódico anhidro, se filtró y se evaporó. El residuo se destiló para proporcionar AA (28,8 g, 61%).

Ejemplo 2:

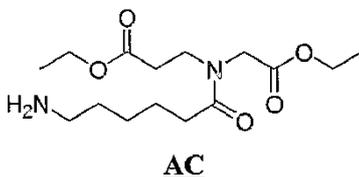
- 15 Etiléster de ácido 3-{etoxicarbonilmetil-[6-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonil-amino)-hexanoil]-amino}-propionico AB



- 20 Se disolvió ácido Fmoc-6-amino-hexanoico (9,12 g, 25,83 mmoles) en diclorometano (50 mL) y se enfrió con hielo. Se añadió diisopropilcarbodiimida (3,25 g, 3,99 mL, 25,83 mmoles) a la disolución a 0°C. Se siguió entonces con la adición de 2-azabutano-1,4-dicarboxilato de dietilo (5 g, 24,6 mmoles) y dimetilaminopiridina (0,305 g, 2,5 mmoles). La disolución se llevó a temperatura ambiente y se agitó adicionalmente durante 6 h. La terminación de la reacción se verificó por TLC. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se añadió al acetato de etilo para precipitar diisopropilurea. La suspensión se filtró. El filtrado se lavó con ácido clorhídrico acuoso al 5%, bicarbonato sódico al 5% y agua. La fase orgánica combinada se secó sobre sulfato sódico y se concentró para dar el producto en bruto que se purificó por cromatografía en columna (EtOAc al 50%/Hexanos) para proporcionar 11,87 g (88%) de AB.

25 Ejemplo 3:

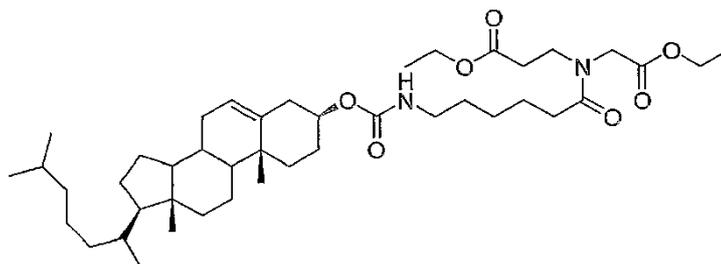
Etiléster de ácido 3-[(6-amino-hexanoil)-etoxicarbonilmetil-amino]-propiónico AC



- 30 Se disolvió etiléster de ácido 3-{etoxicarbonilmetil-[6-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonil-amino)-hexanoil]-amino}-propionico AB (11,5 g, 21,3 mmoles) en piperidina al 20% en dimetilformamida a 0°C. La disolución se continuó agitando durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se añadió agua al residuo y el producto se extrajo con acetato de etilo. El producto en bruto se purificó convirtiéndolo en sal de hidrocloreuro.

Ejemplo 4:

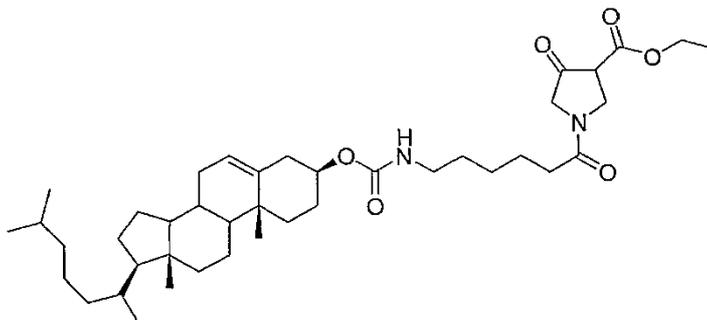
Etiléster de ácido 3-({6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxicarbonil-amino]-hexanoil}etoxicarbonilmetil-amino)-propionico AD

**AD**

5 La sal de hidrocloreto del etiléster de ácido 3-[(6-amino-hexanoil)-etoxicarbonilmetil-amino]-propionico **AC** (4,7 g, 14,8 mmoles) se tomó en diclorometano. La suspensión se enfrió a 0°C con hielo. Se añadió diisopropiletilamina (3,87 g, 5,2 mL, 30 mmoles) a la suspensión. A la disolución resultante se añadió cloroformato de colesterilo (6,675 g, 14,8 mmoles). La mezcla de reacción se agitó toda la noche. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y se lavó con ácido clorhídrico al 10%. El producto se purificó por cromatografía rápida (10,3 g, 92%).

Ejemplo 5:

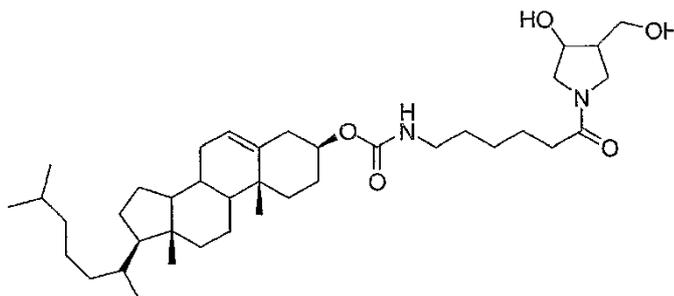
Etiléster de ácido 1-[6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxicarbonilamino]-hexanoil]-4-oxo-pirrolidina-3-carboxílico **AE**

**AE**

10 Se hizo una lechada de t-butoxido de potasio (1,1 g, 9,8 mmoles) en 30 mL de tolueno seco. La mezcla se enfrió a 0°C y se añadieron 5 g (6,6 mmoles) de diéster lentamente con agitación en 20 mins. La temperatura se mantuvo por debajo de 5°C durante la adición. La agitación se continuó durante 30 mins a 0°C y se añadió 1 mL de ácido acético glacial, seguido inmediatamente por 4 g de NaH₂PO₄·H₂O en 40 mL de agua. La mezcla resultante se extrajo con 100 mL dos veces de diclorometano y los extractos orgánicos combinados se lavaron dos veces con 10 mL de tampón fosfato, se secaron y se evaporaron hasta sequedad. El residuo se disolvió en 60 mL de tolueno, se enfrió a 0°C y se extrajo con tres porciones de 50 mL de tampón carbonato frío a pH 9,5. Los extractos acuosos se convirtieron a pH 3 con ácido fosfórico, y se extrajeron con cinco porciones de 40 mL de cloroformo que se combinaron, se secaron y se evaporaron a un residuo. El residuo se purificó por cromatografía de columna usando acetato de etilo al 25%/hexanos para proporcionar 1,9 g de β-cetoéster que se obtuvo (39%).

Ejemplo 6

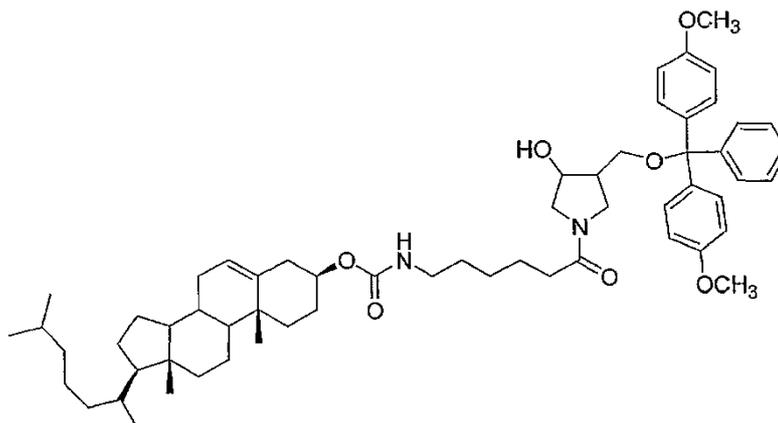
17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iléster de ácido [6-(3-hidroxi-4-hidroximetil-pirrolidin-1-il)-6-oxo-hexil]-carbámico **AF**

**AF**

Se añadió metanol (2 mL) en gotas durante un periodo de 1 h a una mezcla a reflujo de cetoéster AE (1,5 g, 2,2 mmoles) y borohidruro sódico (0,226 g, 6 mmoles) en tetrahidrofurano (10 mL). La agitación se continúa a temperatura de reflujo durante 1 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió HCl 1N (12,5 mL), la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3x40 mL). La fase de acetato de etilo combinada se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró al vacío para dar el producto que se purificó por cromatografía en columna (MeOH al 10%/CHCl₃). (89%).

Ejemplo 7:

17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iléster de ácido (6-{3-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetil]-4-hidroxi-pirrolidin-1-il}-6-oxo-hexil)-carbámico AG

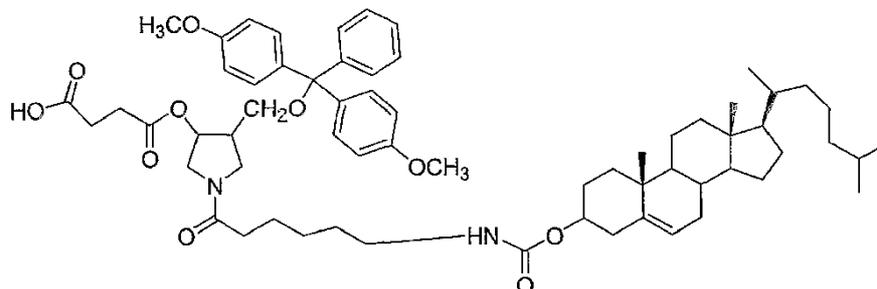


AG

El diol AF (1,25 g, 1,994 mmoles) se secó evaporando con piridina (2x5 mL) al vacío. Se añadieron piridina anhidra (10 mL) y cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (0,724 g, 2,13 mmoles) con agitación. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante toda la noche. La reacción se desactivó mediante la adición de metanol. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se añadió diclorometano (50 mL) al residuo. La fase orgánica se lavó con bicarbonato sódico acuoso 1M. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y se concentró. La piridina residual se eliminó evaporando con tolueno. El producto en bruto se purificó por cromatografía de columna (MeOH al 2%/cloroforno, R_f = 0,5 en MeOH al 5%/CHCl₃). (1,75 g, 95%).

Ejemplo 8

Mono-(4-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetil]-1-{6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxicarbonilamino]-hexanoil}-pirrolidin-3-il)éster de ácido succínico AH

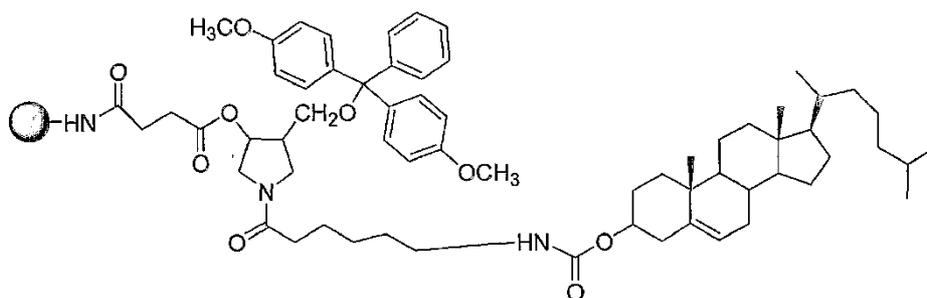


AH

El compuesto AG (1,0 g, 1,05 mmoles) se mezcló con anhídrido succínico (0,150 g, 1,5 mmoles) y DMAP (0,073 g, 0,6 mmoles) y se secó en un vacío a 40°C toda la noche. La mezcla se disolvió en dicloroetano anhidro (3 mL), se añadió trietilamina (0,318 g, 0,440 mL, 3,15 mmoles) y la disolución se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de argón durante 16 h. Se diluyó entonces con diclorometano (40 mL) y se lavó con ácido cítrico acuoso frío con hielo (5% en peso, 30 mL) y agua (2x20 mL). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró hasta sequedad. El residuo se usó como tal para la siguiente etapa.

Ejemplo 9

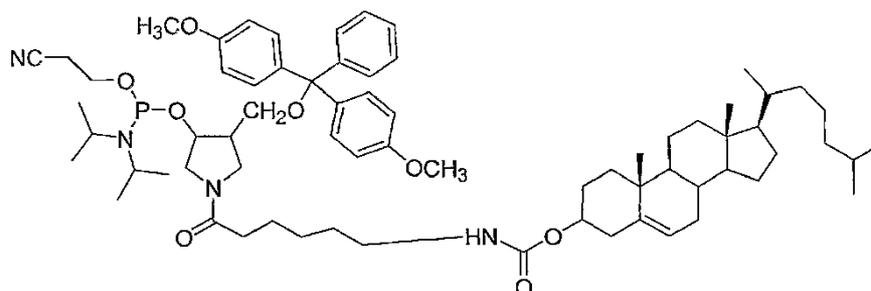
Colesterol derivado de CPG AI

**AI**

Se disolvió succinato **AH** (0,254 g, 0,242 mmoles) en mezcla de diclorometano/acetonitrilo (3:2, 3 mL). A esa disolución se añadieron sucesivamente DMAP (0,0296, 0,242 mmoles) en acetonitrilo (1,25 mL), 2,2'-ditio-bis(5-nitropiridina) (0,075 g, 0,242 mmoles) en acetonitrilo/dicloroetano (3:1, 1,25 mL). A la disolución resultante se añadió trifetilfosfina (0,064 g, 0,242 mmoles) en acetonitrilo (0,6 ml). La mezcla de reacción se volvió naranja brillante en color. La disolución se agitó brevemente usando agitador accionado con la muñeca (5 mins). Se añadió alquilamina de cadena larga-CPG (LCAA-CPG) (1,5 g, 61 μ m/g). La suspensión se agitó durante 2 h. El CPG se filtró a través de un embudo sinterizado y se lavó con acetonitrilo, diclorometano y éter sucesivamente. Los grupos amino sin reaccionar se enmascararon usando anhídrido acético/piridina. La capacidad de carga del CPG se midió tomando medidas UV (37 μ M/g).

Ejemplo 10

(4-[Bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetil]-1-[6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxicarbonilamino]-hexanoil]-pirrolidin-3-il)fosforamidita **AJ**

**AJ**

El compuesto **AG** (0,15 g, 0,158 mmoles) se coevaporó con tolueno (5 mL). Al residuo se añadió tetrazolida de N,N-tetraisopropilamonio (0,0089 g, 0,079 mmoles) y la mezcla se secó sobre P₂O₅ en un horno de vacío durante toda la noche a 40°C. La mezcla de reacción se disolvió en la mezcla de acetonitrilo anhidro/diclorometano (2:1, 1 mL) y se añadió 2-cianoetil-N,N,N',N'-tetraisopropilfosforamidita (0,0714 g, 0,0781 mL, 0,237 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La terminación de la reacción se verificó por TLC (1:1 acetato de etilo:hexano). El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se disolvió en acetato de etilo (10 mL) y se lavó con NaHCO₃ al 5% (4 mL) y salmuera (4 mL). La fase de acetato de etilo se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. La mezcla resultante se cromatografió (50:49:1, EtOAc:Hexano:trietilamina) para proporcionar **AJ** como espuma blanca (0,152 g, 84%).

Ejemplo 11

Protocolo de síntesis de ARN, desprotección y purificación

1. Síntesis:

Las moléculas de ARN se sintetizaron en una máquina 394 ABI que usa el ciclo de 93 etapas estándar escrito por los fabricantes con modificaciones en unas pocas etapas de espera como se describe posteriormente. El soporte sólido era vidrio de poro controlado (CPG, 1 μ mol, 500 Å, Glen Research, Sterling, VA) y los monómeros eran ARN fosforamiditas con grupos protectores estándar (N⁶-benzoi-5'-O-dimetoxitritiladenosina-2'- β butildimetilsilil-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita, N²-isobutil-5'-O-dimetoxitritilguanosina-2'- β butildimetilsilil,3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita y N⁴-benzoi-5'-O-dimetoxitritilcitidina-2'- β butildimetilsilil-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita de Chemgenes Corp MA) usados a una concentración de 0,15M en acetonitrilo (CH₃CN) y un tiempo de acoplamiento de 7,5 min. El activador fue tiotetrazol (0,25M). Para la oxidación PO se usó

yodo/agua/piridina y se usó disolución 0,5M de reactivo Beaucage de oxidación PS en acetonitrilo. Todos los reactivos para la síntesis eran también de Glen Research.

2. Desprotección-I (escisión de oligómero, desprotección de base y fosfato)

5 Después de la terminación de la síntesis el vidrio de poro controlado (CPG) se transfirió a un vial de tapón de rosca (Fisher, número de catálogo 03-340-5N) o un tubo de microcentrífuga libre de RNasa con tapón de rosca. El oligonucleótido se escindió del CPG con desprotección simultánea de la base y los grupos fosfato con 1,0 mL de una mezcla de amoniaco etanólico [amonio:etanol (3:1)] durante 6 horas a toda la noche a 55°C. El vial se enfrió brevemente en hielo y después la mezcla de amonio etanólico se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga. El CPG se lavó con 3x0,25 mL porciones de acetonitrilo al 50% (CH₃CN al 70% para el colesterol y dichos oligómeros conjugados hidrófobos). Los aproximadamente 1,75 mL de disolución se divide lo más equitativamente en dos tubos de microcentrífuga, se tapan fuertemente y después se enfrían a -80°C durante 15 min, antes de secar en un concentrador speed vac/liofilizador durante aproximadamente 90 min.

3. Desprotección-II (Eliminación del grupo 2' TBDMS)

15 El residuo blanco obtenido se suspendió de nuevo en 200 µL de trihidrofluoruro de trietilamina (TEA.3HF, Aldrich) y se calentó a 65°C durante 1,5 h para eliminar los grupos tercbutildimetilsililo (TBDMS) en la posición 2'. La reacción se desactivó entonces con 400 µL de isopropoxitrimetilsilano (iPrOMe₃Si Aldrich) y se incubó adicionalmente en el bloque de calentamiento dejando los tapones abiertos durante 15 min; (Esto provoca que el aducto volátil de fluoruro de isopropoxitrimetilsililo vaporice). El reactivo de desactivación residual se eliminó secando en un concentrador speed vac. El oligómero se precipitó entonces en metanol anhidro (MeOH, 800 µL). El líquido se eliminó con mucho cuidado después de girar en una centrífuga durante 5 minutos a la mayor velocidad disponible. El metanol residual se eliminó por secado brevemente en un concentrador speed vac después de congelar a -80°C. El ARN en bruto se obtuvo como un material esponjoso blanco en el tubo de microcentrífuga.

4. Cuantificación del oligómero en bruto o análisis en bruto

25 Las muestras se disolvieron en acetonitrilo acuoso al 50% (0,5 mL) y se cuantificaron como sigue: primero se realizó una disolución blanco con acetonitrilo acuoso al 50% solo (1 mL).

Se mezclaron bien 5 µL de muestra y 995 µL de acetonitrilo al 50%, en un tubo de microcentrífuga, se transfirieron a una cubeta y se obtuvo una lectura de absorbancia a 260 nm. El material en bruto se seca y se almacena a -20°C.

5. Purificación de oligómeros

30 Los oligómeros en bruto se analizaron y purificaron por HPLC (Mono Q Pharmacia Biotech 5/50). El sistema tampón es A = Tris HCl 100 mM en acetonitrilo en grado HPLC al 10% pH = 8, B = Tris-HCl 100 mM pH 8, acetonitrilo grado HPLC al 10% NaCl 1M, caudal 1,0 mL/min, longitud de onda 260 nm. Para el ARN 21 mer no modificado es normalmente adecuado un gradiente de NaCl de 0-0,6M. Se puede purificar una pequeña cantidad de material (~5 DO) y analizar por CGE o MS. Una vez que la identidad de este material se confirma el oligómero en bruto puede entonces purificarse usando una mayor cantidad de material, es decir 40 DO por marcha, caudal de 1 mL/min y una longitud de onda menos sensible de 280 nm para evitar la saturación del detector. La fracciones que contienen los oligonucleótidos de longitud total se acumulan entonces, se evaporan y finalmente se desalan como se describe a continuación.

6. Desalado del oligómero purificado

40 El oligómero seco purificado se desaló entonces usando o cartuchos C-18 Sepak (Waters) o Sephadex G-25M (Amersham Biosciences). El cartucho se acondicionó con 10 mL de cada de acetonitrilo, seguido por acetonitrilo al 50%, tampón 100 mM (este puede ser acetato de trietilamonio, acetato sódico o acetato de amonio). Finalmente el oligómero purificado disuelto completamente en 10 mL de agua libre de RNasa se aplicó al cartucho con elución en gotas muy lenta. El cartucho se lavó con agua (10 mL) para eliminar las sales. Y finalmente el oligómero libre de sal se eluyó con acetonitrilo al 50% o metanol al 50% directamente en un vial de tapón de rosca.

45 7. Electroforesis capilar en gel (CGE) y electropulverizado LC/MS

1 µL de oligómero aproximadamente a 0,04 DO se seca primero, se disuelve de nuevo en agua (2 µL) y después se pipetea en viales especiales para CGE y análisis de LC/MS. En general, el desalado debería realizarse antes del análisis.

Tabla 4: Lista de oligonucleótidos de ARN sintetizados

ARNip	Secuencia
1S	5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3' (SEQ ID NO:29)

ES 2 702 942 T3

1AS	5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdT-3' (SEQ ID NO:30)
2S	5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAUU-3' (ARN total) (SEQ ID NO:31)
2AS	5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGUU-3' (ARN total) (SEQ ID NO:32)
3S	5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdT-3' * = PS (SEQ ID NO:33)
3AS	5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdT-3' * = PS (SEQ ID NO:34)
4S	5'-C*UUACGCUGAGUACUUCGAdT-3' * = PS (SEQ ID NO:35)
4AS	5'-U*CGAAGUACUCAGCGUAAGdT-3' * = PS (SEQ ID NO:36)
5S	5'-C*UUACGCUGAGUACUUCGA*dT-3' * = PS (SEQ ID NO:37)
5AS	5'-U*CGAAGUACUCAGCGUAAGdT-3' * = PS (SEQ ID NO:38)
6S	5'CUUACGCUGAGUACUUCGAU _{2'OMe} U _{2'OMe} 3' (SEQ ID NO:39)
6AS	5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGU _{2'OMe} U _{2'OMe} -3' (SEQ ID NO:40)
7S	5'CUUACGCUGAGUACUUCGAU* _{2'OMe} U _{2'OMe} 3' * = PS (SEQ ID NO:41)
7AS	5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGU* _{2'OMe} U _{2'OMe} -3' * = PS (SEQ ID NO:42)
8S	5' C*UUACGCUGAGUACUUCGAU* _{2'OMe} U _{2'OMe} 3' * = PS (SEQ ID NO:43)
8AS	5'-U*CGAAGUACUCAGCGUAAGU* _{2'OMe} U _{2'OMe} -3' * = PS (SEQ ID NO:44)
9S	5'-M1CUUACGCUGAGUACUUCGAdT _{TM2} -3' (SEQ ID NO:45)
9AS	5'-M1UCGAAGUACUCAGCGUAAGdT _{TM2} -3' (SEQ ID NO:46)
10S	5'-M1*CUUACGCUGAGUACUUCGAdT*M ₂ -3' (SEQ ID NO:47)
10AS	5'-M1*UCGAAGUACUCAGCGUAAGdT*M ₂ -3' (SEQ ID NO:48)
11S	5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdT _{TM3} -3' (SEQ ID NO:49)
11AS	5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdT _{TM3} -3' (SEQ ID NO:50)
12S	5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdT*M ₃ -3' * = PS (SEQ ID NO:51)
12AS	5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdT*M ₃ -3' * = PS (SEQ ID NO:52)

M1 = 3'-OMe-U, en que el sustituyente 3' del azúcar (U) es -OCH₃.

M2 = 3'-OMe-U, en que el sustituyente 3' del azúcar (U) es -OCH₃.

M3 = 3'pirrolidina colesterol

* = PS = unión fosforotioato

U_{2'OMe} significa que el sustituyente 2' del azúcar (U) es -OCH₃.

dT =desoxitimidina

Tabla 5. Datos de masas para los oligonucleótidos en la Tabla 4

ARNip	Masa esperada (amu)	LC/MS (amu)
1S	6606,09	6606,67
1AS	6693,06	6692,93
2S	6610,91	6610,68
2AS	6697,01	6696,782
3S	6623,03	6622,76
3AS	6709,13	6708,71

ARNip	Masa esperada (amu)	LC/MS (amu)
4S	6639,09	
4AS	6725,2	6724
5S	6655,16	
5AS	6741,26	6740,56
6S	6638,96	6638,66
6AS	6725,06	6724,67
7S	6655,02	6654,57
7AS	6741,13	
8S	6671,09	6670,79
8AS	6757,19	6756,84
9S	7247,29	7246,67
9AS	7333,4	7333,11
10S	7263,36	
10AS	7349,46	
11S	7312,41	7313,06
11AS	7398,51	7397
12S	7328,48	7329
12AS	7414,58	7415,39

Ejemplo 12: Actividad *in vitro* y citotoxicidad de ARNip químicamente modificados

ARNip sintéticos

- 5 Se sintetizaron oligorribonucleótidos que tienen como objetivo la luciferasa de luciérnaga (antisentido 5'-UCGAAGUACUCUAGCGUAAGNN-3') (SEQ ID NO:54) y se caracterizaron como se describe anteriormente. Doce cadenas solo homosenido y doce solo antisentido se mezclaron en todas las posibles combinaciones para dar 144 fragmentos dobles de ARNip distintos. Las cadenas homosenido y antisentido se desplegaron en platos PCR de 96 pocillos (VWR, West Chester, PA) en tampón de hibridación (KOAc 10 mM, HEPES 30 mM, MgOAc 2 mM, pH 7,4) para dar una concentración final de fragmento doble 10 μ M. La hibridación se realizó empleando un ciclador térmico
- 10 (ABI PRISM 7000, Applied Biosystems, Foster City, CA) capaz de acomodar los platos de PCR. Los platos se mantuvieron a 90°C durante un minuto y 37°C durante una hora. La formación del fragmento doble se verificó por electroforesis en gel de agarosa nativa de una muestra aleatoria de las 144 combinaciones homosenido y antisentido.

Cultivo celular

- 15 Se cultivaron células HeLa SS6 a 37°C en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10% (SBF), 100 unidades/mL de penicilina, y 100 μ g/mL de estreptomocina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se transfirieron de forma regular para mantener el crecimiento exponencial. Veinticuatro horas antes de la transfección de ARNip, las células se sembraron en platos blancos, opacos, de 96 pocillos (Costar, Corning, NY) a una concentración de 15.000 células/pocillo en 150 μ L de DMEM libre de rojo fenol, libre de antibiótico (Invitrogen).

- 20 Ensayos de silenciamiento génico de luciferasa duales

- La actividad *in vitro* de ARNip se determinó usando un ensayo de silenciamiento de luciferasa en formato de plato de 96 pocillos de alto rendimiento. Las células se transfectaron primero temporalmente con plásmidos que codifican la luciferasa de luciérnaga (diana) y de *renilla* (control). Las transfecciones de ADN se realizaron usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) (0,5 μ L/ μ g de ADN total) y los plásmidos gWiz-Luc (Aldevron, Fargo, ND) (200 ng/pocillo) y pRL-CMV (Promega, Madison, WI) (200 ng/pocillo). Después de 2 h, se eliminó el medio de transfección de plásmidos, y se añadieron ARNip que tienen como objetivo la luciferasa de luciérnaga a las células a concentración 100 nM. Las
- 25

transfecciones de ARNip se realizaron usando TransIT-TKO (Mirus, Madison, WI) (0,3 μ L/pocillo). Después de 24 h, se analizaron las células para expresión de luciferasa tanto de luciérnaga como de *renilla* usando un luminómetro de plato (VICTOR², PerkinElmer, Boston, MA) y el kit de ensayo de luciferasa Dual-Glo (Promega). Las relaciones de expresión de luciferasa de luciérnaga/*renilla* se usaron para determinar el porcentaje de silenciamiento génico respecto a controles tratados por simulación (sin ARNip).

Ensayos de citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron en paralelo con los ensayos de silenciamiento génico. Estos ensayo se llevaron a cabo de manera exacta a los ensayos de silenciamiento génico (véase arriba) con la excepción de que 24 h después de la transfección de ARNip, las células se analizaron por citotoxicidad en vez de silenciamiento génico. La viabilidad celular relativa se determinó por cuantificación del contenido de ATP celular usando el kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega).

Unos agentes de ARNi de control y candidato se delinean en la FIG. 15.

Los resultados de viabilidad celular relativa y los resultados de actividad se representan gráficamente en las FIGs. 16 y 17, respectivamente. Esencialmente no se observó actividad con fragmentos dobles con AS 12; aproximadamente se observó actividad del 50% con AS 9-11; y se observó actividad completa con AS 1-8.

Los monómeros de SMSR anclados a colesterol representativos se muestran en la FIG. 18. Un monómero de SMSR que tiene un soporte sólido unido (inferior izquierda) puede incorporarse en el extremo 3' de un ARN, p.ej., un agente de ARNi. Un monómero de SMSR que tiene una amidita (inferior izquierda) puede incorporarse en el extremo 5' o posición interna de un ARN, p.ej., un agente de ARNi.

Los datos de LCMS para un conjugado de 3' colesterol después de purificación PAGE se muestra en la FIG. 19.

Ejemplo 13:

Para evaluar las propiedades de permeación celular de los ARNip conjugados con colesterol 11 cadenas homocadentes que contienen conjugado de 3' colesterol se hibridaron con 1 cadena antisentido y se aplicó al cultivo celular sin ningún agente de transfección. El fragmento doble 1S-1AS se usó como un control no modificado. La expresión de luciferasa se silenció mediante el fragmento doble 11S-1AS con una respuesta a la dosis sin el agente de transfección, mientras que el fragmento doble 1S-1AS no modificado no mostró ningún silenciamiento génico (véase la FIG. 20).

Ejemplo 14

5'-Colesterol-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3' (SEQ ID NO:55)

El compuesto 14-a (descrito p.ej., en la página 67) se usó para sintetizar los conjugados de ARNip donde el colesterol se conjugó en el extremo 5' de las moléculas de ARN.

La fosforamidita 14-a se disolvió en disolución de acetonitrilo/cloruro de metileno 1:1 para dar una disolución 0,2M. Esta se usó para el acoplamiento terminal durante la síntesis de oligonucleótidos. Para la oxidación PO se usó yodo/agua/piridina y para la oxidación PS se usó disolución de reactivo Beaucage 0,5M en acetonitrilo. El grupo diamatoxitriolito se eliminó en el sintetizador y la purificación y caracterización se realizaron como se describe en el ejemplo 11.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Alnylam Pharmaceuticals Inc.
- <120> AGENTES DE ARNi MODIFICADOS
- <130> 14174-079WO1
- 5 <150> US 60/465.665
- <151> 2003-04-25
- <150> US60/463.772
- <151> 2003-04-17
- <150> US 60/469.612
- 10 <151> 2003-05-09
- <150> US 60/465.802
- <151> 2003-04-25
- <150> US 60/493.986
- <151> 2003-08-08
- 15 <150> US 60/494.597
- <151> 2003-08-11
- <150> US 60/503.414
- <151> 2003-09-15
- <150> US 60/506.341
- 20 <151> 2003-09-26
- <150> US 60/510.246
- <151> 2003-10-09
- <150> US 60/510.318
- <151> 2003-10-10
- 25 <150> US 60/518.453
- <151> 2003-11-07
- <150> PCT/US04/07070
- <151> 2004-03-08
- <160> 60
- 30 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
- <223> Péptido de permeación celular ejemplar
- <400> 1

ES 2 702 942 T3

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Lys Ile Asn Leu Lys
1 5 10 15
Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
20 25

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de modelo anfifílico

<400> 6

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
1 5 10 15
Leu Ala

10 <210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido de permeación celular ejemplar

<400> 7

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 8

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de permeación celular ejemplar

<400> 8

25 Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys
1 5 10

<210> 9

<211> 37

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Péptidos de permeación celular ejemplares

<400> 9

ES 2 702 942 T3

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
 1 5 10 15
 Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val
 20 25 30
 Pro Arg Thr Glu Ser
 35

<210> 10

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos de permeación celular ejemplares

<400> 10

Ser Trp Leu Ser Lys Thr Ala Lys Lys Leu Glu Asn Ser Ala Lys Lys
 1 5 10 15
 Arg Ile Ser Glu Gly Ile Ala Ile Ala Ile Gln Gly Gly Pro Arg
 20 25 30

10

<210> 11

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Péptidos de permeación celular ejemplares

<400> 11

Ala Cys Tyr Cys Arg Ile Pro Ala Cys Ile Ala Gly Glu Arg Arg Tyr
 1 5 10 15
 Gly Thr Cys Ile Tyr Gln Gly Arg Leu Trp Ala Phe Cys Cys
 20 25 30

<210> 12

20

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos de permeación celular ejemplares

25

<400> 12

Asp His Tyr Asn Cys Val Ser Ser Gly Gly Gln Cys Leu Tyr Ser Ala
 1 5 10 15
 Cys Pro Ile Phe Thr Lys Ile Gln Gly Thr Cys Tyr Arg Gly Lys Ala
 20 25 30
 Lys Cys Cys Lys
 35

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos de permeación celular ejemplares

<400> 13

5 Arg Lys Cys Arg Ile Val Val Ile Arg Val Cys Arg
 1 5 10

<210> 14

<211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Péptidos de permeación celular ejemplares

<400> 14

Arg Arg Arg Pro Arg Pro Pro Tyr Leu Pro Arg Pro Arg Pro Pro Pro
 1 5 10 15
 Phe Phe Pro Pro Arg Leu Pro Pro Arg Ile Pro Pro Gly Phe Pro Pro
 20 25 30
 Arg Phe Pro Pro Arg Phe Pro Gly Lys Arg
 35 40

<210> 15

15 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptidos de permeación celular ejemplares

20 <400> 15

Ile Leu Pro Trp Lys Trp Pro Trp Trp Pro Trp Arg Arg
 1 5 10

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido generado de forma sintética

<400> 16

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
 1 5 10 15

30 <210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido generado de forma sintética
 <400> 17
 Ala Ala Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro
 1 5 10

5 <210> 18
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Virus de inmunodeficiencia humana
 <400> 18
 Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
 10 1 5 10

<210> 19
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Drosophila Antennapedia

15 <400> 19
 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

<210> 20
 <211> 21
 <212> ADN

20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ARNip de "direccionamiento dual"
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21

25 <223> n = dT= desoxitimidina
 <400> 20
 uaccagcacc caggugcugn n 21

<210> 21
 <211> 21

30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ARNip de "direccionamiento dual"
 <221> misc_feature

35 <222> 20, 21

<223> n = dT= desoxitimidina
 <400> 21
 ccgggcaucc ggacgaguun n 21
 <210> 22
 5 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ARNip de direccionamiento dual
 10 <221> misc_feature
 <222> 1, 2
 <223> n = dT= desoxitimidina
 <400> 22
 nnaugguagu gggucgacga c 21
 15 <210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> ARNip de "direccionamiento dual"
 <221> misc_feature
 <222> 1, 2
 <223> n = dT= desoxitimidina
 <400> 23
 25 nnggcccguc gccagcuca a 21
 <210> 24
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> ARNip bifuncional, pseudocomplementario
 <221> misc_feature
 <222> 5
 <223> n = A* = 2-aminoadenina
 35 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = dT= desoxitimidina

<400> 24
 uaccngcacc caggugcugn n 21
 <210> 25
 <211> 21
 5 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ARNip bifuncional, pseudocomplementario
 <221> misc_feature
 10 <222> 16
 <223> n = A* = 2-aminoadenina
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = dT= desoxitimidina
 15 <400> 25
 ccgggcaucc ggacngguun n 21
 <210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ARNip bifuncional, pseudocomplementario
 <221> misc_feature
 <222> 1, 2
 25 <223> n = dT= desoxitimidina
 <221> misc_feature
 <222> 7
 <223> n = U* = 2-tiouracilo
 <400> 26
 30 nnauggnagu gggucgacga c 21
 <210> 27
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> ARNip bifuncional, pseudocomplementario
 <221> misc_feature

<222> 1, 2
 <223> n = dT= desoxitimidina
 <221> misc_feature
 <222> 18
 5 <223> n = U* 2-tiouracilo
 <400> 27
 nnggcccguc gccagcnca a 21
 <210> 28
 <211> 23
 10 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 28
 aagctggccc tggacatgga gat 23
 <210> 29
 15 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
 20 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = dT= desoxitimidina
 <400> 29
 cuuacgcuga guacuucgan n 21
 25 <210> 30
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = dT= desoxitimidina
 <400> 30
 35 ucgaaguacu cagcguaagn n 21
 <210> 31
 <211> 21

<212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
 5 <400> 31
 cuuacgcuga guacuucgau u 21
 <210> 32
 <211> 21
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
 <400> 32
 ucgaaguacu cagcguaagu u 21
 15 <210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
 <221> misc_feature
 <222> 20
 <223> n = dT* =desoxitimidina, unión fosforotioato
 <221> misc_feature
 25 <222> 21
 <223> n = dT =desoxitimidina
 <400> 33
 cuuacgcuga guacuucgan n 21
 <210> 34
 30 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
 35 <221> misc_feature
 <222> 20
 <223> n = dT* =desoxitimidina, unión fosforotioato

<221> misc_RNA
 <222> 21
 <223> n = dT =desoxitimidina
 <400> 34
 5 ucgaaguacu cagcguaagn n 21
 <210> 35
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
 <221> misc_feature
 <222> 1
 <223> n = C* = Cys unión fosforotioato
 15 <221> misc_feature
 <222> 20
 <223> n = dT* =desoxitimidina, unión fosforotioato
 <221> misc_feature
 <222> 21
 20 <223> n =dT =desoxitimidina
 <400> 35
 nuuacgcuga guacuucgan n 21
 <210> 36
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado de forma artificial
 <221> misc_feature
 30 <222> 1
 <223> n = U* = unión fosforotioato
 <221> misc_feature
 <222> 20
 <223> n = dT* =desoxitimidina, unión fosforotioato
 35 <221> misc_feature
 <222> 21
 <223> n = dT=desoxitimidina

<400> 36
ncgaaguacu cagcguaagn n 21
<210> 37
<211> 21
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Oligonucleótido generado de forma sintética
<221> misc_feature
10 <222> 1
<223> n = C* = Cys unión fosforotioato
<221> misc_feature
<222> 19
<223> n = Ala* = Ala unión fosforotioato
15 <221> misc_feature
<222> 20
<223> n = dT* = desoxitimidina, unión fosforotioato
<221> misc_feature
<222> 21
20 <223> n = dT = desoxitimidina
<400> 37
nuuacgcuga guacuucggn n 21
<210> 38
<211> 21
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Oligonucleótido generado de forma sintética
<221> misc_feature
30 <222> 1
<223> n =U* = U unión fosforotioato
<221> misc_feature
<222> 20
<223> n = dT* =desoxitimidina, unión fosforotioato
35 <221> misc_feature
<222> 21
<223> n = dT =desoxitimidina

<400> 38
 ncgaaguacu cagcguaagn n 21
 <210> 39
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
 <400> 39
 10 cuuacgcuga guacuucgau 20
 <210> 40
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
 <400> 40
 ucgaaguacu cagcguaagu 20
 <210> 41
 20 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
 25 <221> misc_feature
 <222> 20
 <223> n = U* = unión fosforotioato
 <400> 41
 cuuacgcuga guacuucgan 20
 30 <210> 42
 <211> 20'
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
 <221> misc_feature
 <222> 20

- <223> n = U* = unión fosforotioato
 <400> 42
 ucgaaguacu cagcguaagn 20
 <210> 43
- 5 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
- 10 <221> misc_feature
 <222> 1
 <223> n = C* = Cys unión fosforotioato
 <221> misc_feature
 <222> 20
- 15 <223> n = U* = unión fosforotioato
 <400> 43
 nuuacgcuga guacuucgan 20
 <210> 44
 <211> 20
- 20 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
 <221> misc_feature
- 25 <222> 1, 20
 <223> n = U* = unión fosforotioato
 <400> 44
 ncgaaguacu cagcguaagn 20
 <210> 45
- 30 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
- 35 <221> misc_feature
 <222> 1
 <223> n = 3'-OMe-U, en que el sustituyente 3' del azúcar (U) es -OCH₃

- <221> misc_feature
 <222> 21, 22
 <223> n = dT =desoxitimidina,
 <221> misc_feature
- 5 <222> 23
 <223> n = M2 = 3'-OMe-U, en que el sustituyente 3' del azúcar (U) es -OCH3
 <400> 45
 ncuuacgcug aguacuucga nnn 23
 <210> 46
- 10 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
- 15 <221> misc_feature
 <222> 1
 <223> n = M1 = 3'-OMe-U, en que el sustituyente 3' del azúcar (U) es -OCH3
 <221> misc_feature
 <222> 21, 22
- 20 <223> n = dT =desoxitimidina
 <221> misc_feature
 <222> 23
 <223> n = M2 = 3'-OMe-U, en que el sustituyente 3' del azúcar (U) es -OCH3
 <400> 46
- 25 nucgaaguac ucagcguaag nnn 23
 <210> 47
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
 <221> misc_feature
 <222> 1
 <223> n = 3'-OMe-U, unión fosforotioato
- 35 <221> misc_feature
 <222> 21
 <223> n = dT = desoxitimidina

- <221> misc_feature
 <222> 22
 <223> n = dT* =desoxitimidina, unión fosforotioato
 <221> misc_feature
- 5 <222> 23
 <223> n = M2 = 3'-OMe-U, en que el sustituyente 3' del azúcar (U) es -OCH3
 <400> 47
 ncuuacgcug aguacuucga nnn 23
 <210> 48
- 10 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
- 15 <221> misc_feature
 <222> 1
 <223> n = 3'-OMe-U, unión fosforotioato
 <221> misc_feature
 <222> 21
- 20 <223> n = dT = desoxitimidina
 <221> misc feature
 <222> 22
 <223> n = dT* = desoxitimidina, unión fosforotioato
 <221> misc_feature
- 25 <222> 23
 <223> n = M2 = 3'-OMe-U, en que el sustituyente 3' del azúcar (U) es -OCH3
 <400> 48
 nucgaaguac ucagcguaag nnn 23
 <210> 49
- 30 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
- 35 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = dT = desoxitimidina

- <221> misc_feature
 <222> 22
 <223> n = M3 = 3' pirrolidina colesterol
 <400> 49
- 5 cuuacgcuga guacuucgan nn 22
 <210> 50
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
 <221> misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = dT = desoxitimidina
- 15 <221> misc_feature
 <222> 22
 <223> n = M3 = 3' pirrolidina colesterol
 <400> 50
 ucgaaguacu cagcguaagn nn 22
- 20 <210> 51
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
- 25 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
 <221> misc_feature
 <222> 20
 <223> n = dT = desoxitimidina
 <221> misc_feature
- 30 <222> 21
 <223> n = dT* = desoxitimidina, unión fosforotioato
 <221> misc_feature
 <222> 22
 <223> n = M3 = 3' pirrolidina colesterol
- 35 <400> 51
 cuuacgcuga guacuucgan nn 22
 <210> 52

- <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
- 5 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
 <221> misc_feature
 <222> 20
 <223> n = dT = desoxitimidina
 <221> misc_feature
- 10 <222> 21
 <223> n = dT* = desoxitimidina, unión fosforotioato
 <221> misc_feature
 <222> 22
 <223> n = M3 = 3' pirrolidina colesterol
- 15 <400> 52
 ucgaaguacu cagcguaagn nn 22
 <210> 53
 <211> 22
 <212> ADN
- 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
 <221> misc_feature
 <222> 21, 22
- 25 <223> n = A, C, G, U, T, dT, U2'OMe, o 3'OMe-U
 <400> 53
 ucgaaguacu cuagcguaag nn 22
 <210> 54
 <211> 21
- 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido generado de forma sintética
 <221> misc_feature
- 35 <222> 20, 21
 <223> n = dT = desoxitimidina
 <400> 54

- cuuacgcuga guacuucgan n 21
 <210> 55
 <211> 19
 <212> ARN
- 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ARNip generado de forma sintética
 <400> 55
- cuuacgcuga guacuucga 19
- 10 <210> 56
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
- 15 <223> ARNip generado de forma sintética
 <400> 56
- ucgaaguacu cagcguaag 19
- <210> 57
 <211> 19
- 20 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ARNip generado de forma sintética
 <400> 57
- 25 cuuacgcuga guacuucga 19
 <210> 58
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
 <223> ARNip generado de forma sintética
 <400> 58
- ucgaaguacu cagcguaag 19
- <210> 59
- 35 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ARNip generado de forma sintética

<221> misc_difference

<222> 1

5 <223> n = C* = Cys unión fosforotioato

<400> 59

nuuacgcuga guacuucga 19

<210> 60

<211> 19

10 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ARNip generado de forma artificial

<221> misc_feature

15 <222> 2

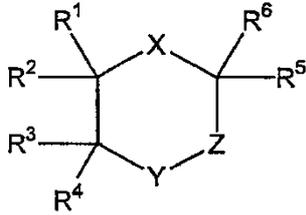
<223> n = C* = Cys unión fosforotioato

<400> 60

ungaaguacu cagcguaag 1

REIVINDICACIONES

1. Un agente de ARNi que comprende una primera cadena y una segunda cadena, en el que al menos una subunidad que tiene una fórmula (I) se incorpora en al menos una de dichas cadenas:



(I)

5 En la que:

X es N(CO)R⁷ o NR⁷;

Y es CR⁹R¹⁰;

Z está ausente;

Uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁹ y R¹⁰ es OR^a y uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁹ y R¹⁰ es (CH₂)_nOR^b, o

10 Uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁹ y R¹⁰ es (CH₂)_nOR^a y uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁹ y R¹⁰ es OR^b,

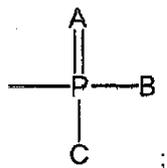
En el que el resto de R¹, R², R³, R⁴, R⁹ y R¹⁰ son H;

Cada uno de R⁵ y R⁶ es, independientemente, H, o alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con 1-3 R¹³;

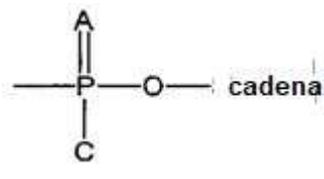
R⁷ es R^d; o alquilo C₁-C₂₀ sustituido con NR^cR^d o NHC(O)R^d;

R¹³ es hidroxilo, alcoxi C₁-C₄ o halo;

15 R^a es:

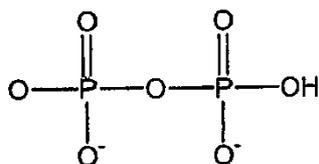


R^b es



Cada uno de A y C es, independientemente, O o S;

20 B es OH, O⁻, o



R^c es H o alquilo C₁-C₆;

R^d es un ligando elegido de un radical de colesterol; un radical de carbohidrato; y colesterol;

y

n es 1-4;

en el que la subunidad se sitúa en el extremo 3' o 5' de la primera cadena o la segunda cadena.

2. El compuesto según la reivindicación 1, en el que R¹ es (CH₂)_nOR^b y R³ es OR^a.
- 5 3. El compuesto según la reivindicación 2, en el que R¹ y R³ son *cis*.
4. El compuesto según la reivindicación 2, en el que R¹ y R³ son *trans*.
5. El compuesto según la reivindicación 2, en el que n es 1.
6. El compuesto según la reivindicación 2, en el que A es O.
7. El compuesto según la reivindicación 2, en el que A es S.
- 10 8. El compuesto según la reivindicación 1, en el que R¹ es (CH₂)_nOR^a y R³ es OR^b.
9. El compuesto según la reivindicación 2, en el que R⁷ es (CH₂)₅NHR^d o (CH₂)₅NHC(O)R^d.
10. El compuesto según la reivindicación 1, en el que R¹ es OR^b y R³ es (CH₂)_nOR^a.
11. El compuesto según la reivindicación 1, en el que R¹ es OR^a y R³ es (CH₂)_nOR^b.
12. El compuesto según la reivindicación 11, en el que R¹ y R³ son *cis*.
- 15 13. El compuesto según la reivindicación 11, en el que R¹ y R³ son *trans*.
14. El compuesto según la reivindicación 11, en el que n es 1.
15. El compuesto según la reivindicación 1, en el que R¹ es (CH₂)_nOR^b y R⁹ es OR^a.
16. El compuesto según la reivindicación 15, en el que R¹ y R⁹ son *cis*.
17. El compuesto según la reivindicación 15, en el que R¹ y R⁹ son *trans*.
- 20 18. El compuesto según la reivindicación 15, en el que n es 1.
19. El compuesto según la reivindicación 1, en el que R¹ es OR^a y R⁹ es (CH₂)_nOR^b.
20. El compuesto según la reivindicación 19, en el que R¹ y R⁹ son *cis*.
21. El compuesto según la reivindicación 19, en el que R¹ y R⁹ son *trans*.
22. El compuesto según la reivindicación 19, en el que n es 1.
- 25 23. El compuesto según la reivindicación 1, en el que R¹ es (CH₂)_nOR^a y R⁹ es OR^b.
24. El compuesto según la reivindicación 1, en el que R¹ es OR^b y R⁹ es (CH₂)_nOR^a.
25. El compuesto según la reivindicación 1, en el que R³ es (CH₂)_nOR^b y R⁹ es OR^a.
26. El compuesto según la reivindicación 1, en el que R³ es (CH₂)_nOR^a y R⁹ es OR^b.
27. El compuesto según la reivindicación 1, en el que R³ es OR^a y R⁹ es (CH₂)_nOR^b.
- 30 28. El compuesto según la reivindicación 1, en el que R³ es OR^b y R⁹ es (CH₂)_nOR^a.
29. Una composición farmacéutica que comprende un agente de ARNi según la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
30. Un kit que comprende un agente de ARNi según la reivindicación 1, un recipiente estéril en que el agente de ARNi se describe, e instrucciones de uso.

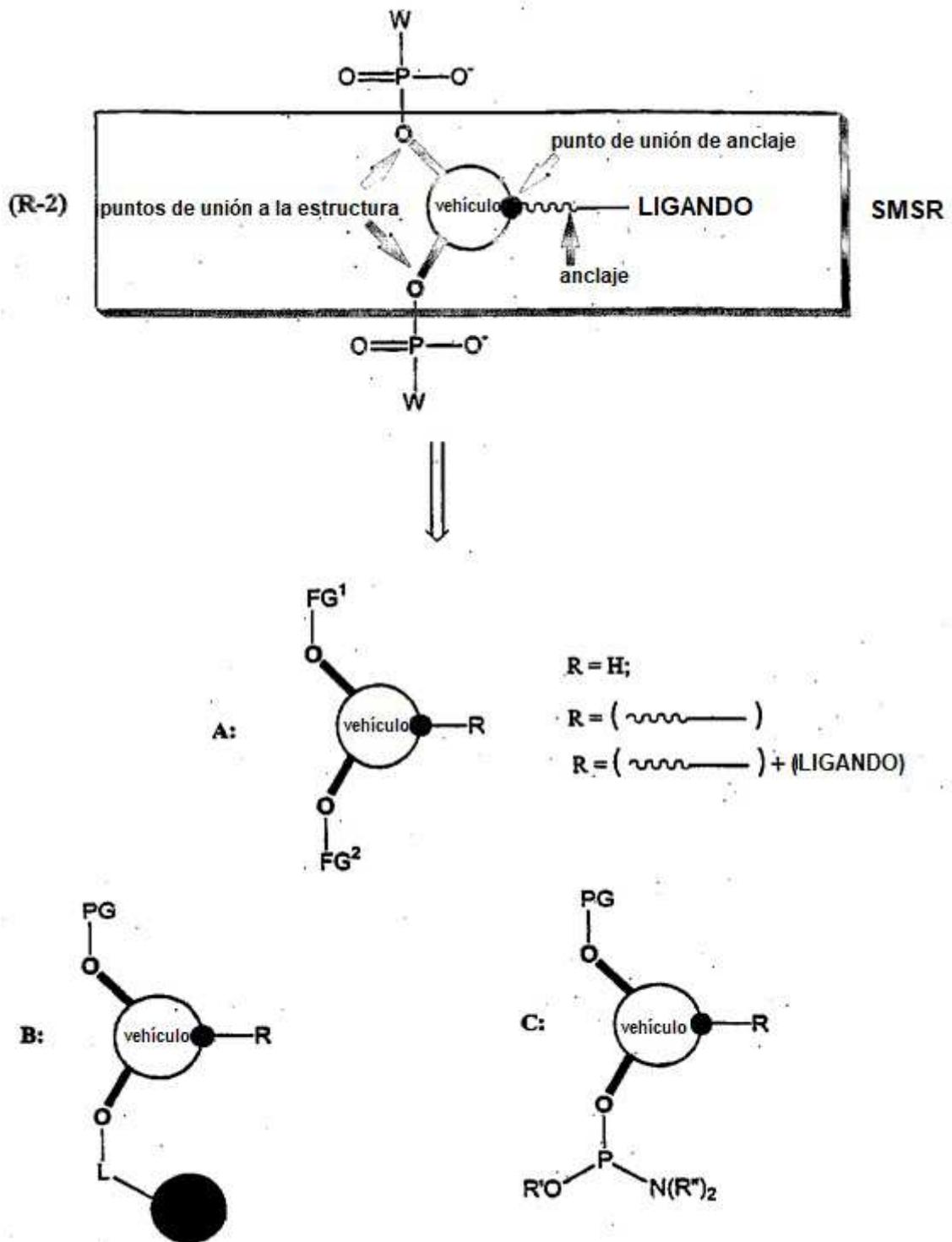


FIG. 1

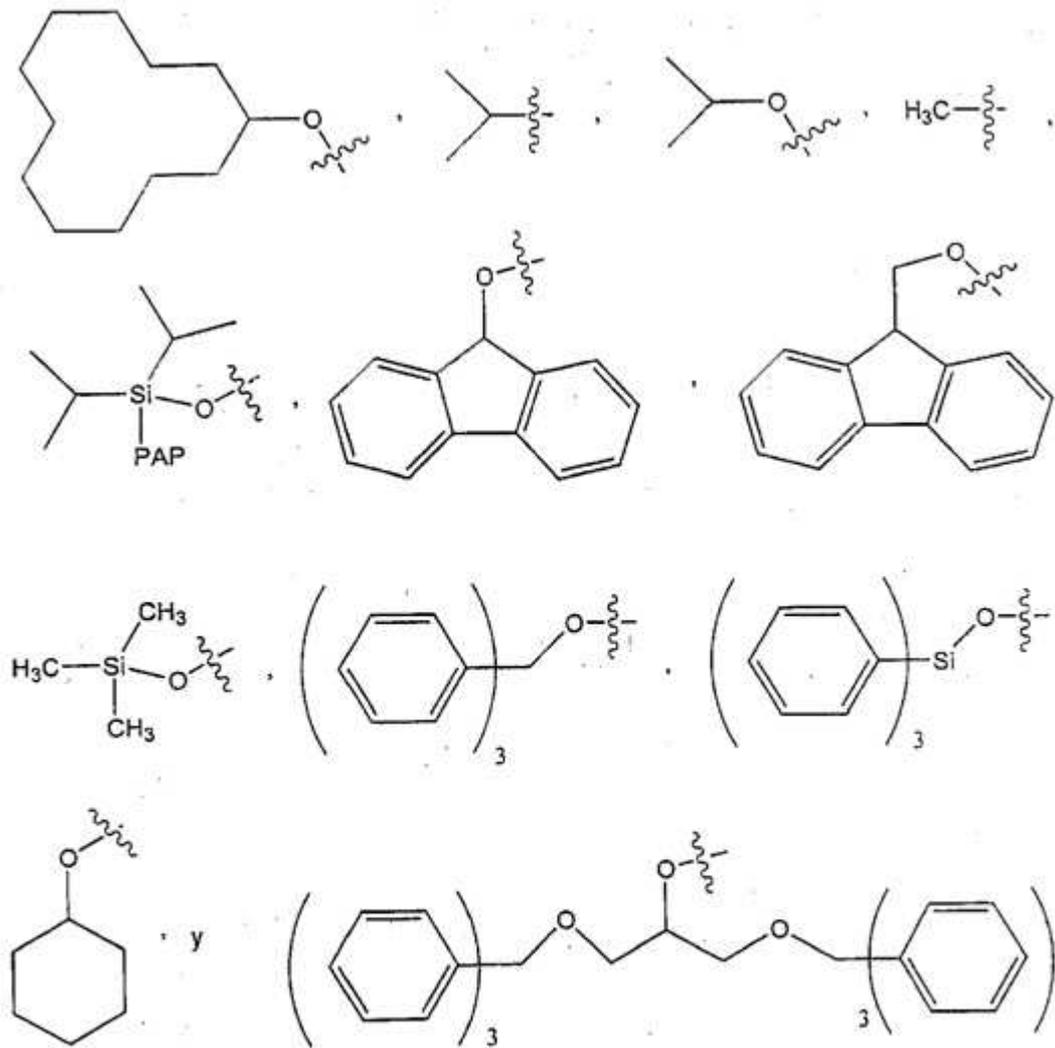


FIG. 2

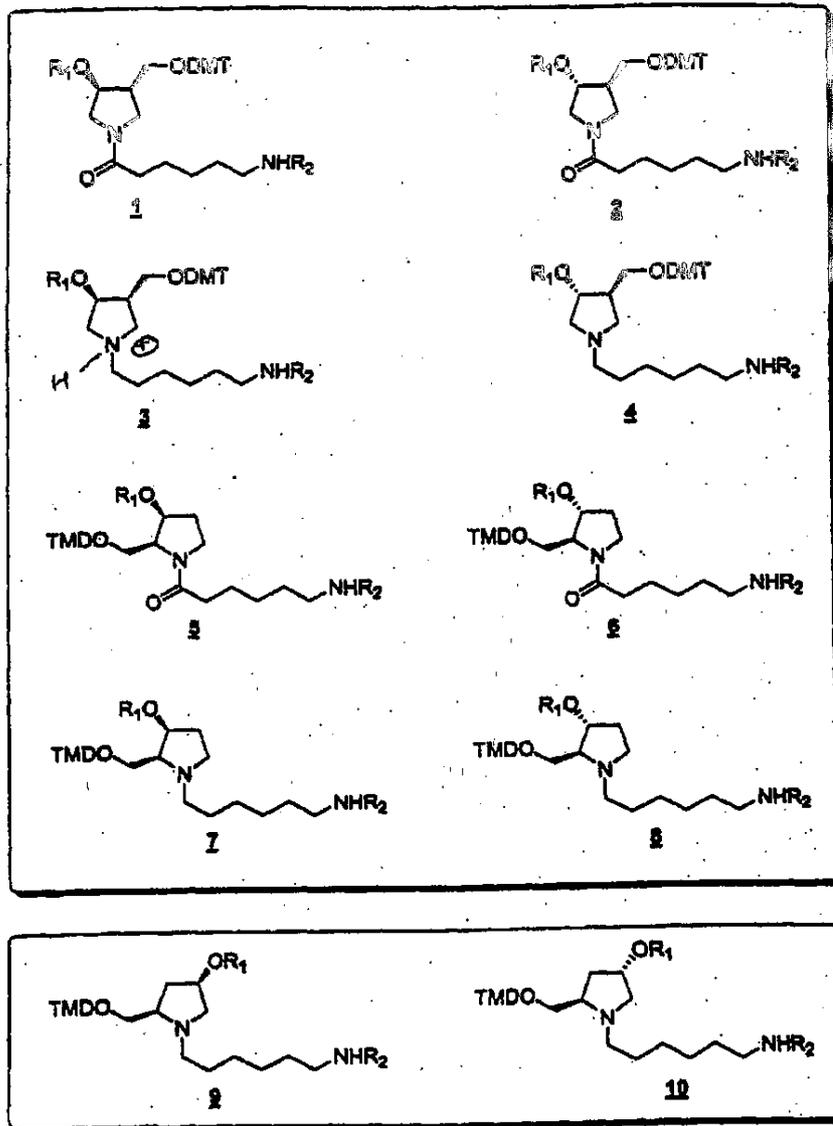


FIG. 3

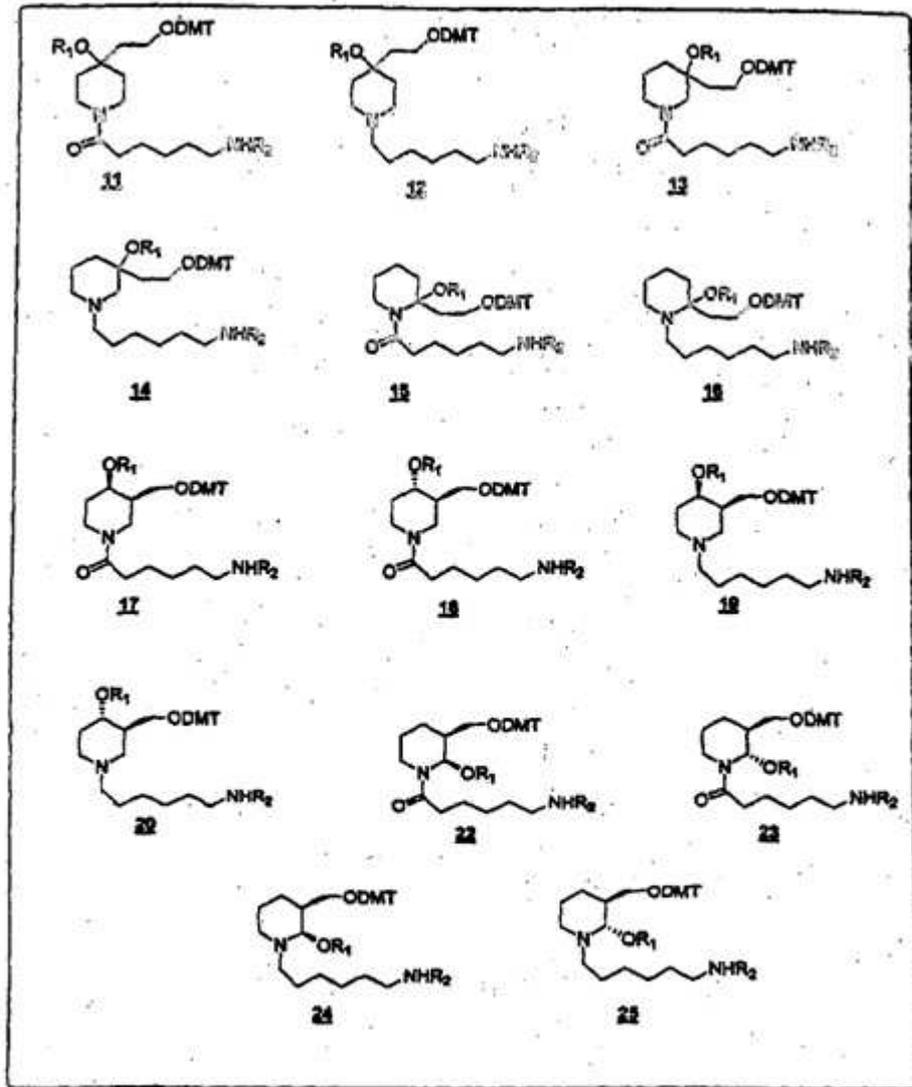


FIG. 3 (Continuación)

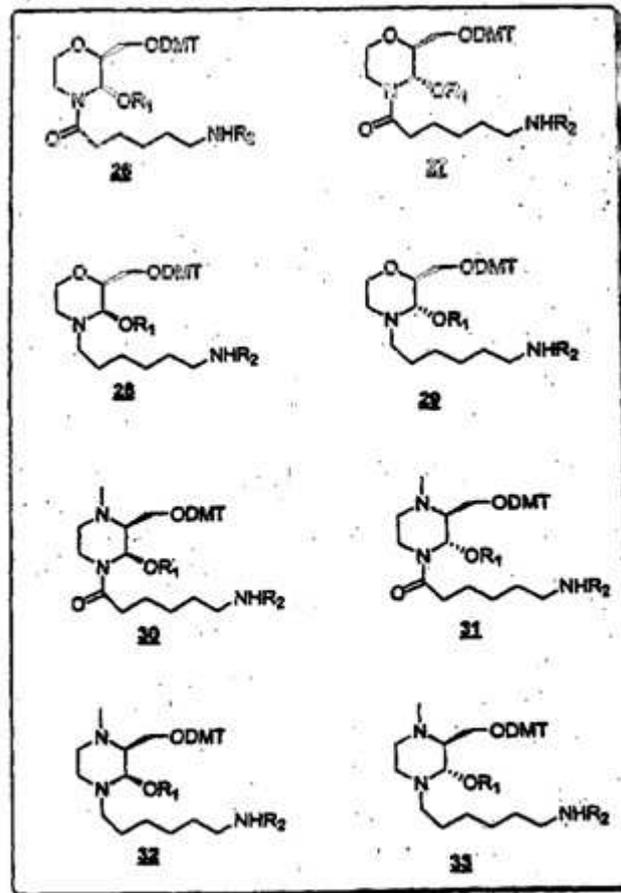


FIG. 3 (Continuación)

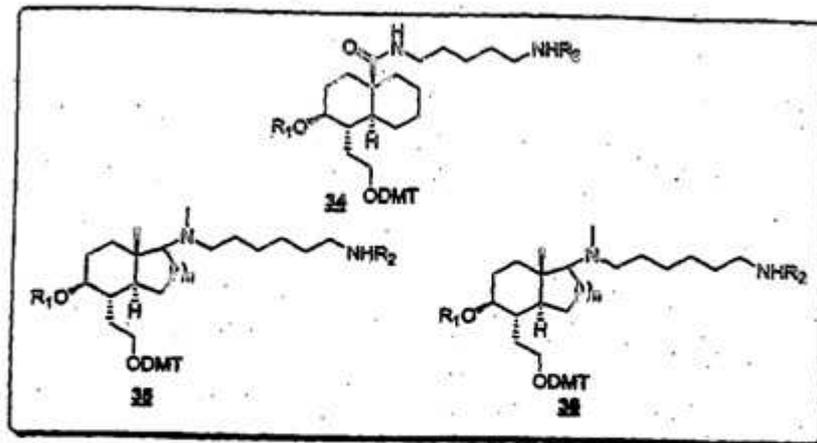
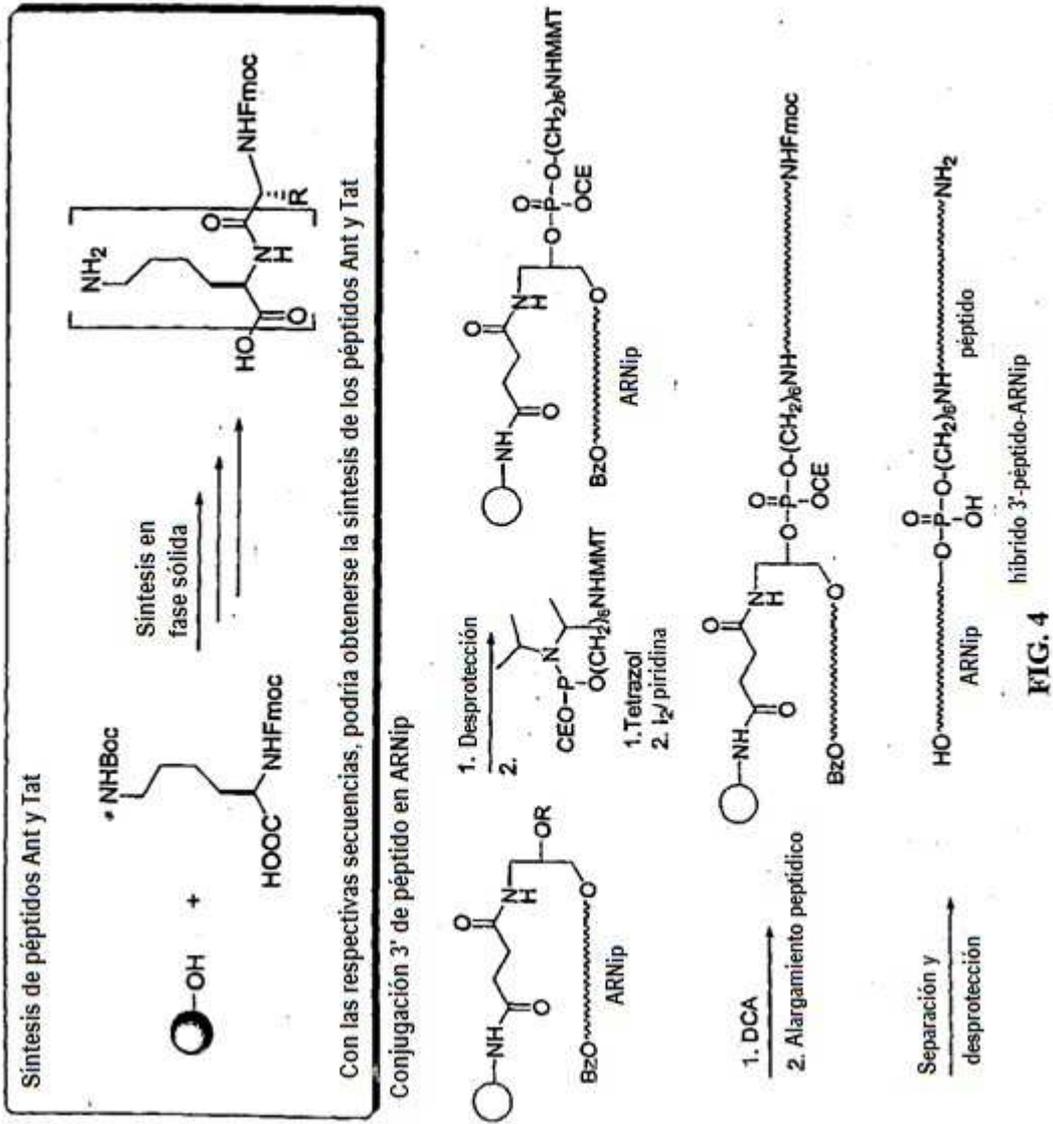


FIG. 3 (Continuación)



Conjugación 5' de péptido en ARNip

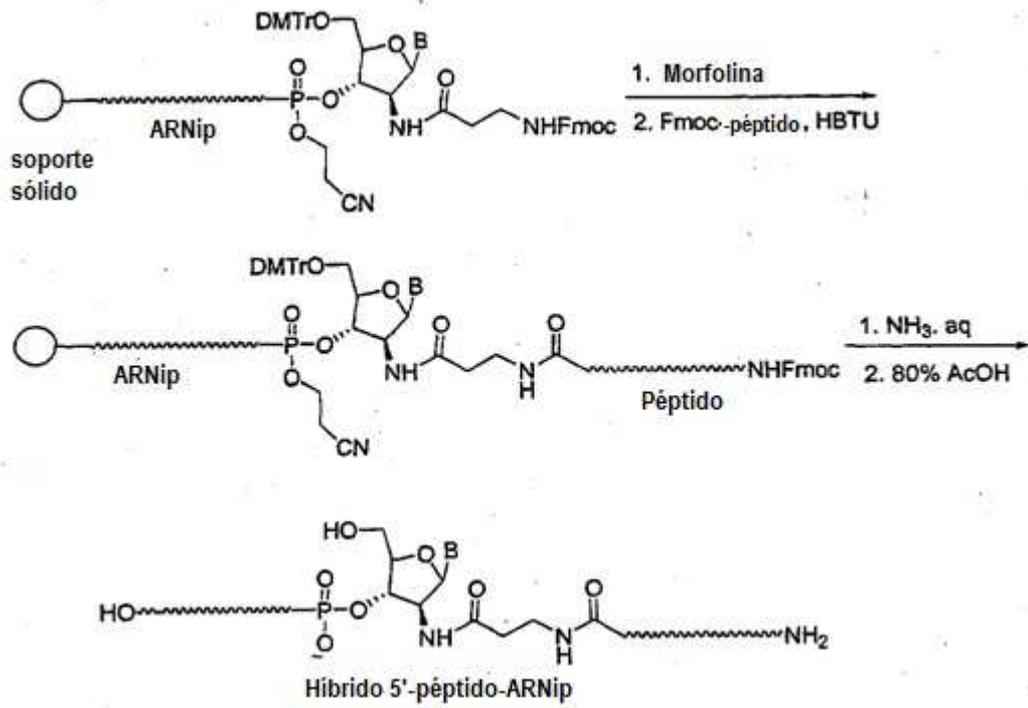


FIG. 5

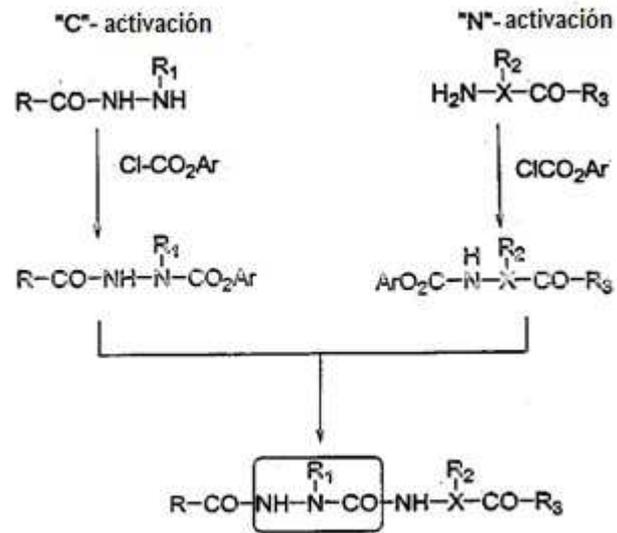


FIG. 6

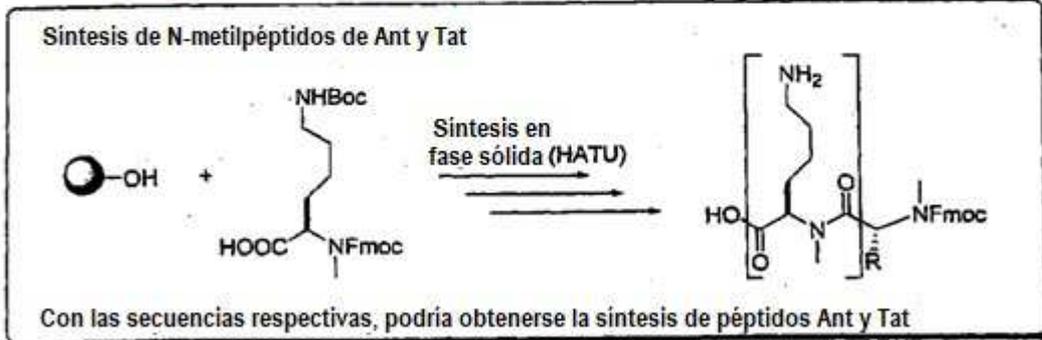
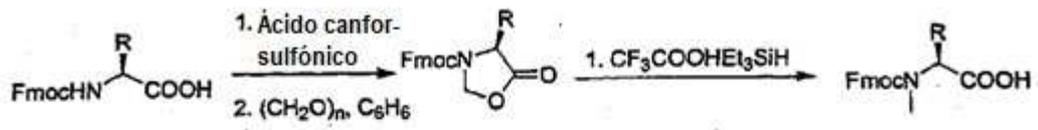


FIG. 7

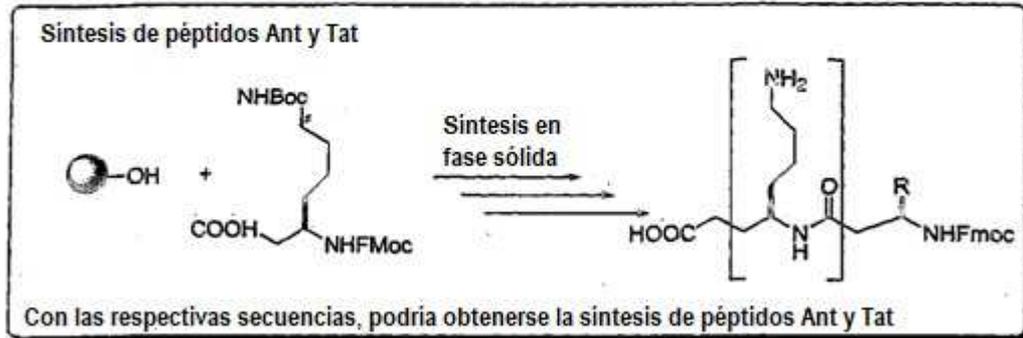
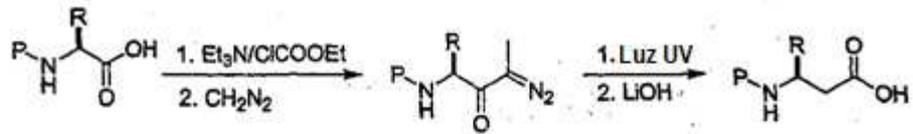


FIG. 8

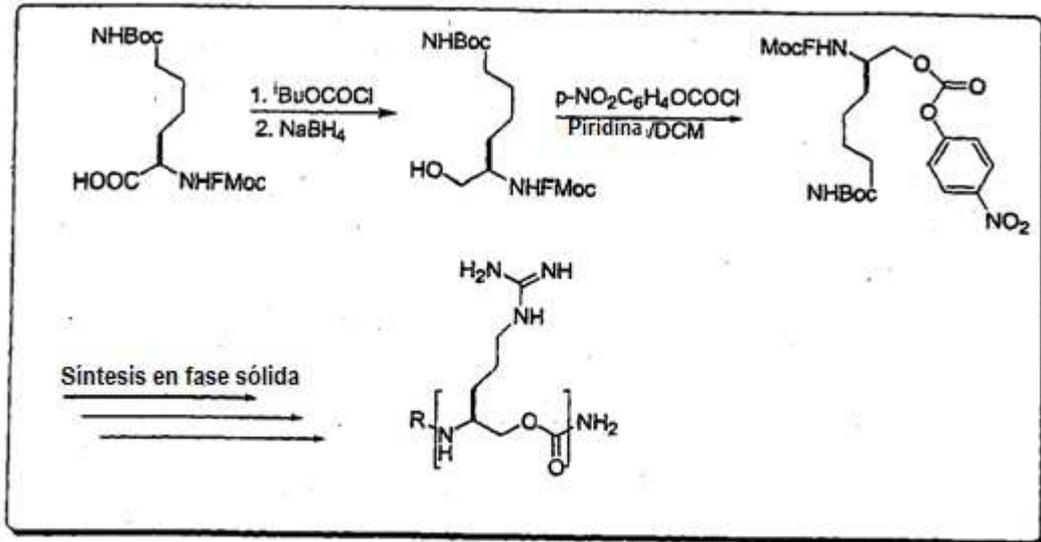


FIG. 9

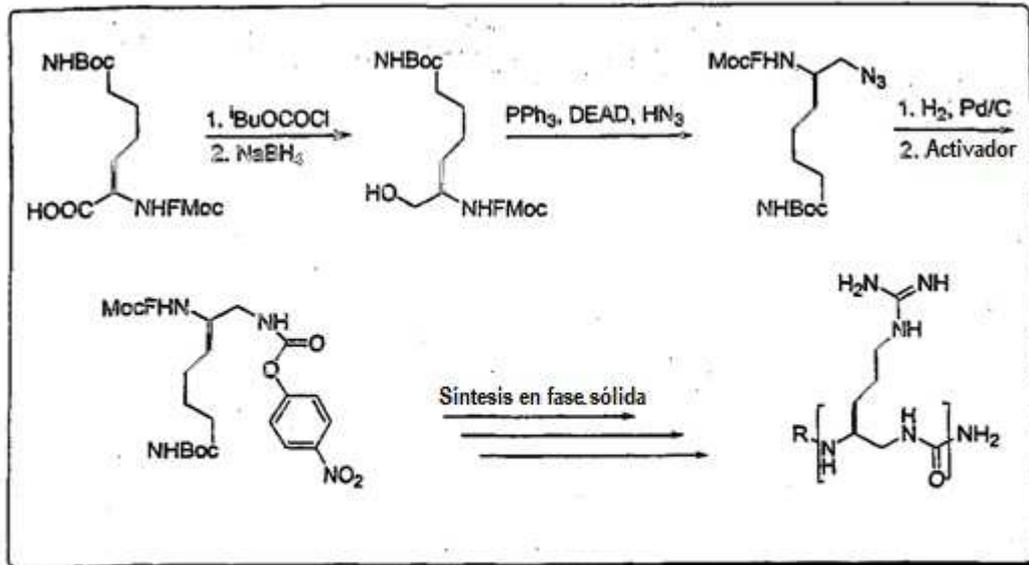


FIG. 10

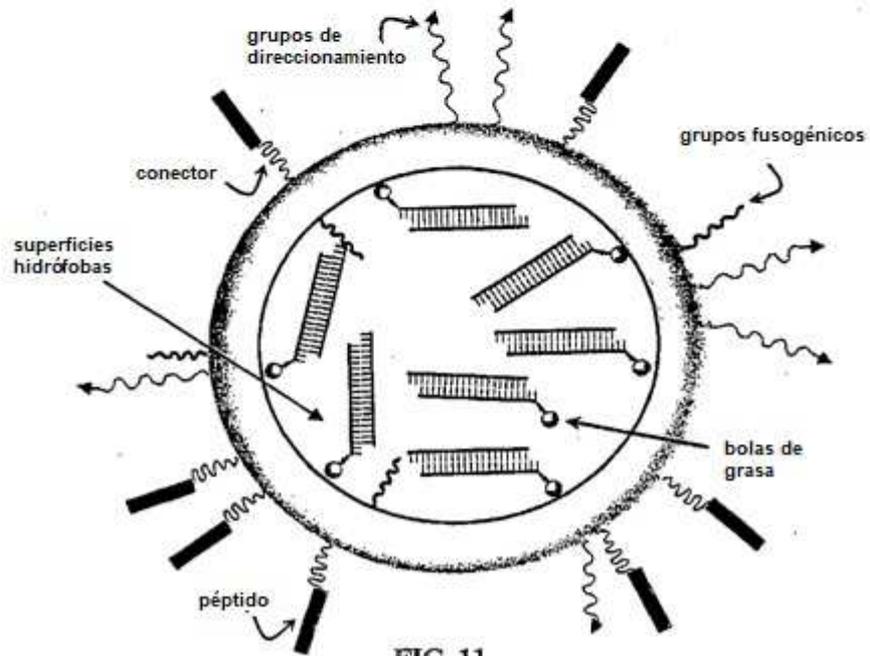
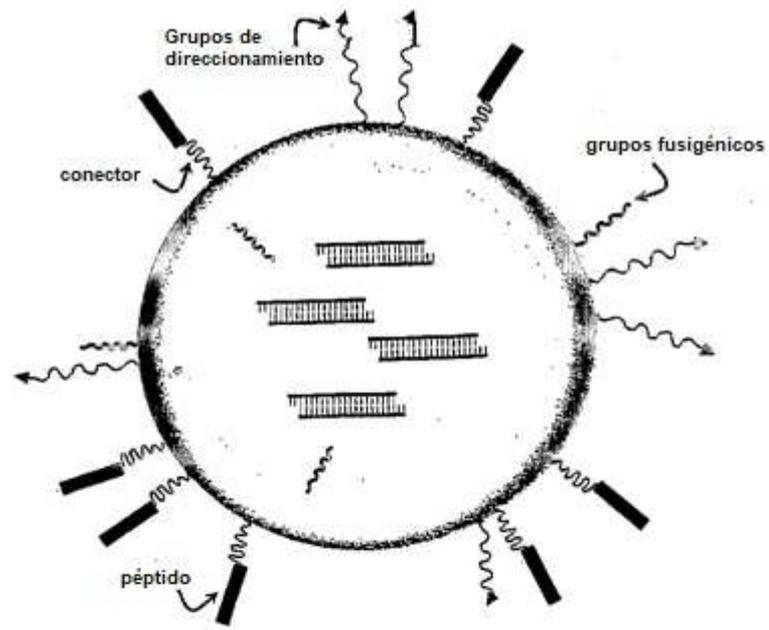


FIG. 11

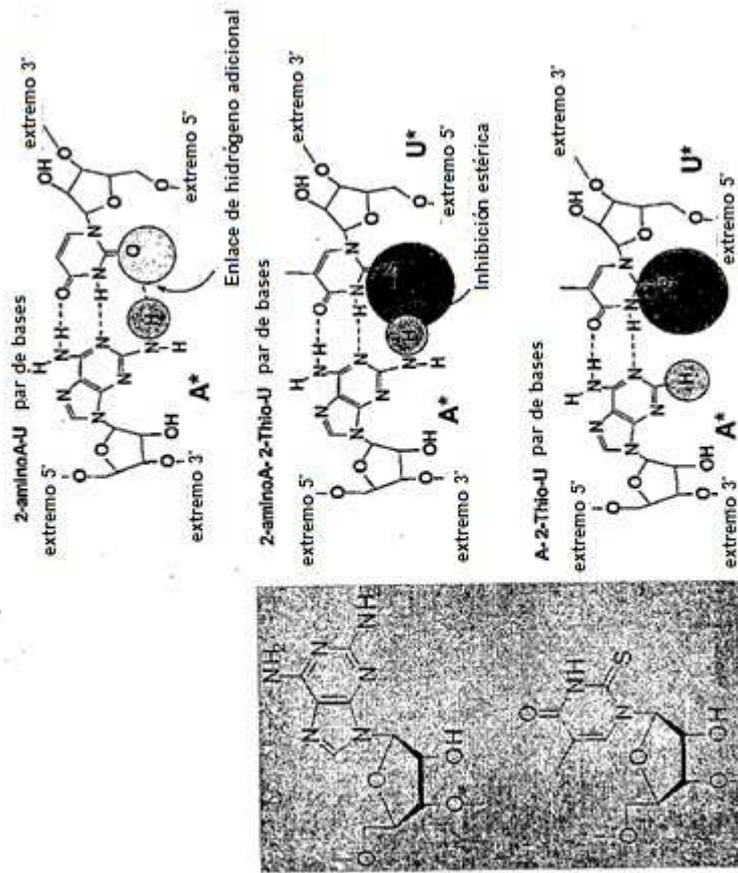


FIG. 12

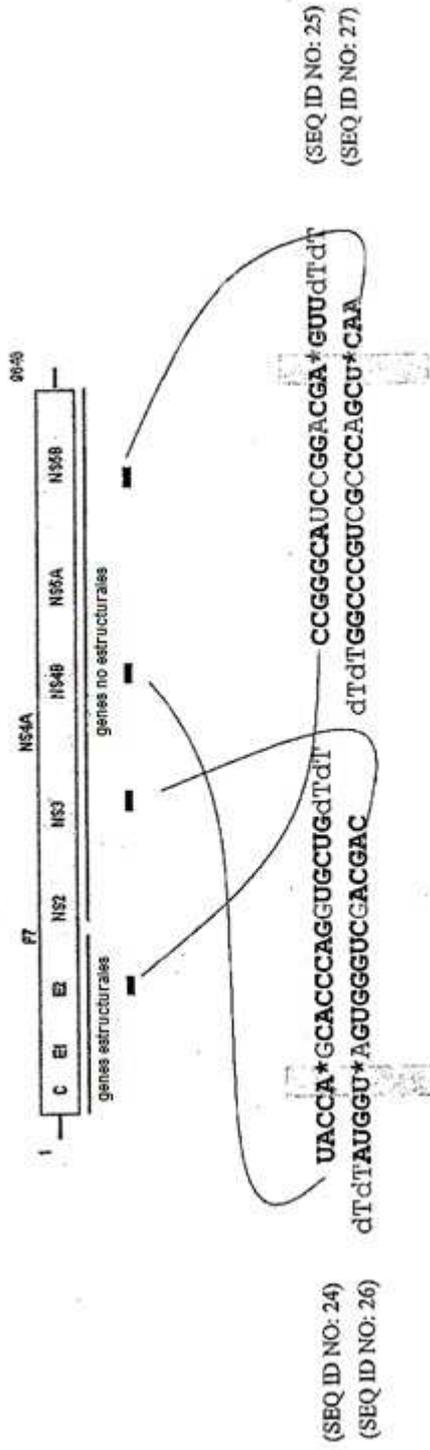


FIG. 14

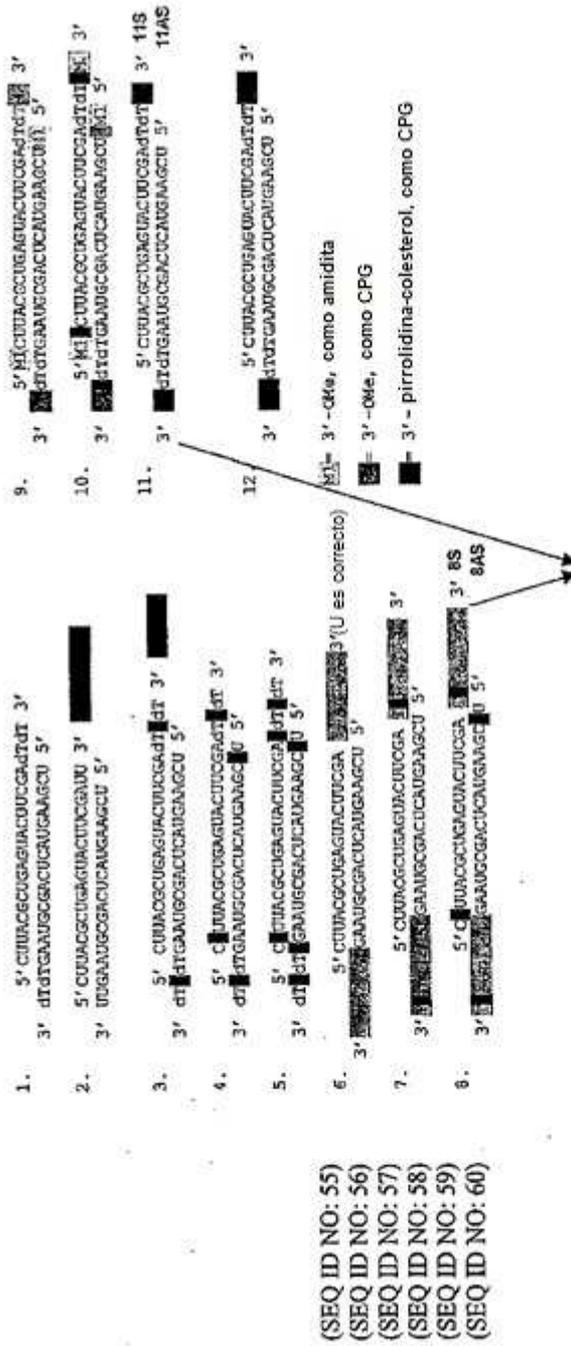


FIG. 15

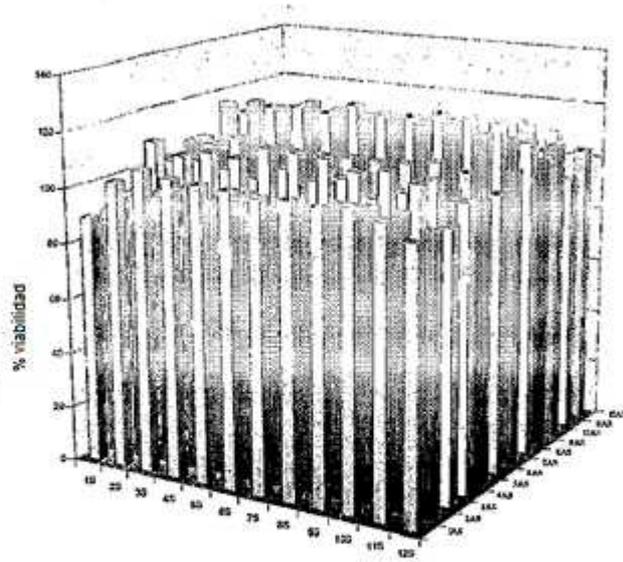


FIG. 16

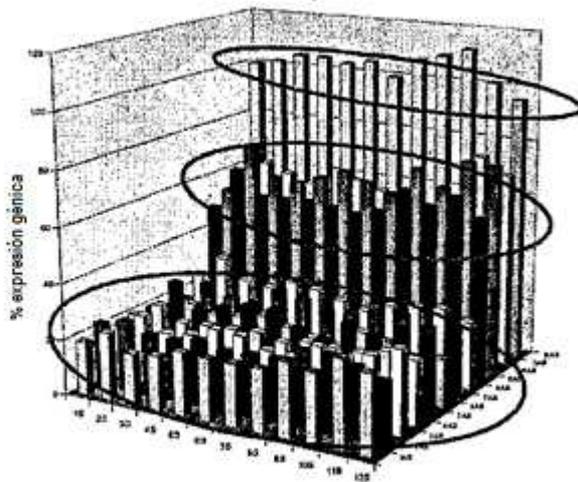


FIG. 17

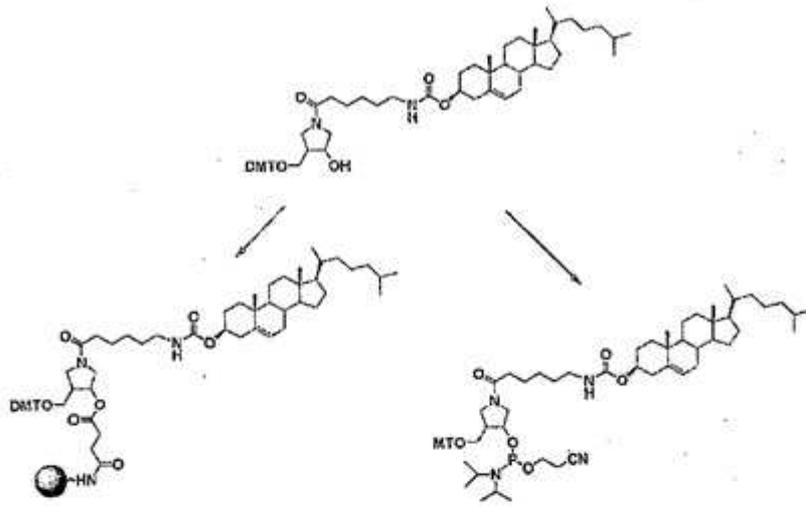


FIG. 18

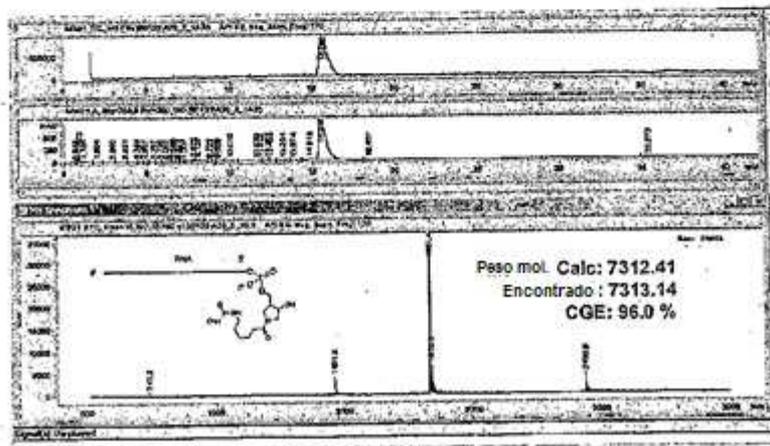


FIG. 19

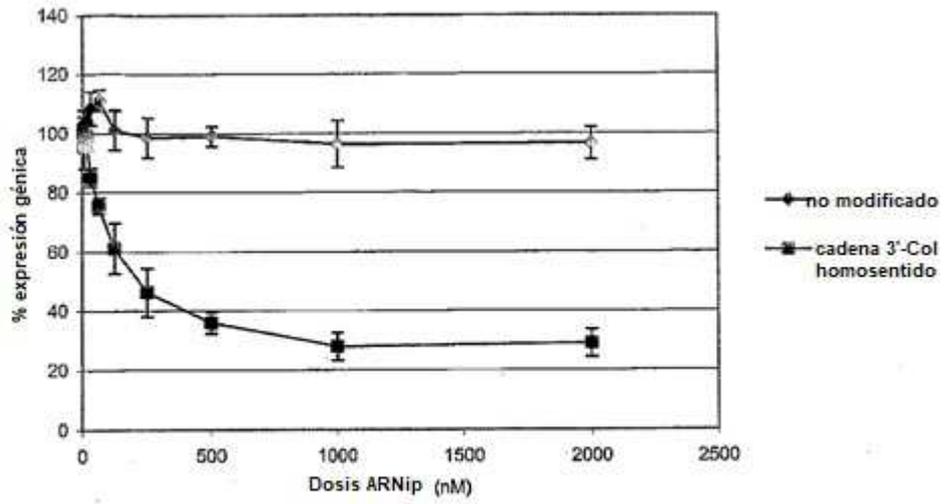


FIG. 20