

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 232**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2012 PCT/JP2012/083180**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013 WO13089283**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2012 E 12815856 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2791335**

54 Título: **Ácido nucleico bicatenario quimérico**

30 Prioridad:

16.12.2011 JP 2011275488

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.04.2019

73 Titular/es:

**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO
MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY (50.0%)
5-45 Yushima 1-chome Bunkyo-ku
Tokyo 113-8510, JP y
OSAKA UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**YOKOTA, TAKANORI;
NISHINA, KAZUTAKA;
OBIKA, SATOSHI y
MIZUSAWA, HIDEHIRO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 707 232 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

Ácido nucleico bicatenario quimérico

5 [Campo técnico]

La presente solicitud se refiere a un ácido nucleico bicatenario que tiene una actividad de supresión de la expresión de un gen diana por medio de un efecto no codificante y, más en particular, a un ácido nucleico bicatenario que incluye un ácido nucleico no codificante que es complementario al producto de transcripción de un gen diana y
10 contiene una región que comprende cuatro o más bases contiguas y un ácido nucleico que es complementario al ácido nucleico anterior.

[Antecedentes de la técnica]

15 En los últimos años, los oligonucleótidos han sido un tema de interés en el desarrollo continuo de productos farmacéuticos denominados fármacos de ácido nucleico y, en particular, desde los puntos de vista de la alta selectividad del gen diana y la baja toxicidad, el desarrollo de fármacos de ácido nucleico que utilizan un método no codificante está activamente en curso. El método no codificante es un método de inhibición selectiva de la expresión de una proteína que está codificada por un gen diana, mediante la introducción en una célula de un oligonucleótido
20 (oligonucleótido no codificante (ONC)) que es complementario a una secuencia parcial del ARNm (cadena codificante) de un gen diana.

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

Por otro lado, cuando se introduce un oligonucleótido que comprende un ADN en una célula como un ONC, se forma un heterodúplex de ADN-ARN parcial. Puesto que esta estructura es reconocida por la ARNasa H y, de este modo,
30 el ARNm del gen diana se descompone, se inhibe la expresión de la proteína codificada por el gen diana. (Fig. 1, porción inferior). Además, también se ha descubierto que, en muchos casos, el efecto supresor de la expresión génica es mayor en el caso del uso de un ADN como un ONC (vía dependiente de la ARNasa H), en comparación con el caso del uso de un ARN.

35 En ocasión del uso de un oligonucleótido como un fármaco de ácido nucleico, se han desarrollado diversos análogos de ácido nucleico tales como el ácido nucleico bloqueado (ANB) (marca registrada), otros ácidos nucleicos unidos y similares, considerando una potenciación de la afinidad de unión a un ARN diana, estabilidad in vivo y similares.

Como se ilustra en la FIG. 2, puesto que el resto de azúcar de un ácido nucleico natural (ARN o ADN) tiene un anillo de cinco miembros con cuatro átomos de carbono y un átomo de oxígeno, el resto de azúcar tiene dos tipos de conformaciones, una forma N y una forma S. Se sabe que estas conformaciones oscilan de una a otra y, por tanto, la estructura helicoidal del ácido nucleico también adopta diferentes formas, una forma A y una forma B. Puesto que el ARNm que sirve como diana del ONC mencionado anteriormente adopta una estructura helicoidal en la forma A,
40 con el resto de azúcar principalmente en la forma N, es importante que el resto de azúcar del ONC adopte la forma N desde el punto de vista de aumentar la afinidad al ARN. Un producto que se ha desarrollado con este concepto es un ácido nucleico modificado tal como un ANB (ácido nucleico con puente de 2'-O,4'-C-metileno (2',4'-ANU)). Por ejemplo, en el ANB, como el oxígeno en la posición 2' y el carbono en la posición 4' están unidos por un grupo metileno, la conformación se fija en la forma N y no hay más fluctuación entre las conformaciones. Por tanto, un oligonucleótido sintetizado mediante la incorporación de varias unidades de ANB tiene una afinidad muy alta por el
45 ARN y una especificidad de secuencia muy alta, y también presenta una excelente resistencia al calor y resistencia a nucleasas, en comparación con los oligonucleótidos sintetizados con ácidos nucleicos naturales convencionales (véase la BPT 1). Puesto que otros ácidos nucleicos artificiales también tienen dichas características, se ha prestado mucha atención a los ácidos nucleicos artificiales con respecto a la utilización de un método no codificante y similares (véanse las BPT 1 a 8).

55 Además, cuando se aplica un oligonucleótido a un fármaco, es importante que el oligonucleótido relevante pueda entregarse al sitio diana con alta especificidad y alta eficiencia. Además, como métodos para entregar un oligonucleótido, se han desarrollado un método de utilización de lípidos tales como el colesterol y la vitamina E (BNP 1 y 2), un método de utilización de un péptido específico del receptor tal como el RVG-9R (BNP 3) y un método de
60 utilización de un anticuerpo específico para el sitio diana (BNP 4).

[Listado de citas]**[Bibliografía de patente]**

65 [BPT 1] JP 10-304889 A

[BPT 2] WO 2005/021570
 [BPT 3] JP 10-195098 A
 [BPT 4] JP 2002-521310 W
 [BPT 5] WO 2007/143315
 5 [BPT 6] WO 2008/043753
 [BPT 7] WO 2008/029619
 [BPT 8] WO 2005/113571

[Bibliografía no de patente]

10 [BNP 1] Kazutaka Nishina et al., *Molecular Therapy*, vol. 16, 734-740 (2008)
 [BNP2] Jurgen Soutscheck et al., *Nature*, vol. 432, 173-178 (2004)
 [BNP 3] Kazutaka Nishina et al., *Molecular Therapy*, vol. 16, 734-740 (2008)
 [BNP 4] Dan Peer et al., *Science*, vol. 319, 627-630 (2008)

[Sumario de la invención]

[Problema técnico]

20 En determinadas realizaciones, un complejo de ácido nucleico bicatenario comprende un ácido nucleico no codificante que suprime la expresión de un gen diana o, más generalmente, suprime el nivel de un producto de transcripción de ARN. Es un objeto adicional que el complejo de ácido nucleico bicatenario entregue la cadena de ácido nucleico no codificante a un sitio diana con alta especificidad y alta eficiencia.

[Solución al problema]

25 Con el fin de estudiar cómo potenciar la estabilidad de un ONC, la actividad de suprimir la expresión de un gen diana in vivo (efecto no codificante) y la especificidad y eficiencia en la entrega de un ONC a un sitio diana (propiedades de entrega) en un método no codificante, los inventores prepararon un ONC que comprende un ANB y un ADN (oligómero con huecos de ANB/ADN), al cual se unió directamente un lípido (colesterol), y los inventores evaluaron las propiedades de entrega y el efecto no codificante mediante la administración por vía intravenosa este ONC a un ratón. Como resultado, se descubrió que cuando el colesterol se une al ONC, las propiedades de entrega del ONC al hígado aumentan, sin embargo, se perdió el efecto no codificante.

35 Por tanto, los inventores realizaron investigaciones exhaustivas con el fin de desarrollar un ácido nucleico que tenga un alto efecto no codificante aumentando al mismo tiempo las propiedades de entrega de un ONC y, como resultado, los inventores concibieron un nuevo complejo de ácido nucleico bicatenario producido, en una realización, mediante la hibridación de un oligómero con huecos de ANB/ADN con una cadena de ARN complementaria al oligómero con huecos, y evaluaron en primer lugar el efecto no codificante. Como resultado, se descubrió que el efecto no codificante del ácido nucleico bicatenario es normalmente mejor que el de un oligómero con huecos de ANB/ADN monocatenario y se potencia bastante dependiendo de la longitud de la cadena del ONC utilizado. Los inventores también produjeron un ácido nucleico bicatenario en el que el tocoferol se une a la cadena complementaria que comprende ARN, se administra por vía intravenosa el ácido nucleico bicatenario a un ratón y evalúa su efecto no codificante. Como resultado, se descubrió que el ácido nucleico bicatenario que contiene la cadena complementaria unida al tocoferol tiene un efecto no codificante muy alto. Además, los inventores también descubrieron que el efecto no codificante de un oligómero con huecos de ANB/ADN producido mediante hibridación con una cadena complementaria que comprende ANP (ácido nucleico peptídico) en lugar de ARN es al menos similar o mejor que el de un oligómero con huecos de ANB/DNA monocatenario, y además el ANP proporciona una forma de asociar indirectamente el ONC a un péptido, proteína o anticuerpo que puede dirigir la entrega del ONC a un sitio particular.

Es decir, la solicitud se refiere a un ácido nucleico bicatenario que tiene una actividad de supresión de la expresión de un gen diana mediante un efecto no codificante.

55 En determinadas realizaciones, se proporciona lo siguiente.

(1) Una composición farmacéutica para su uso en la reducción del nivel de un producto de transcripción en una célula, que comprende:
 un complejo de ácido nucleico bicatenario que comprende una primera cadena de ácido nucleico hibridada con
 60 una segunda cadena de ácido nucleico, en el que:

(a) la primera cadena de ácido nucleico (i) comprende nucleótidos y análogos de nucleótidos, y el número total de nucleótidos y análogos de nucleótidos en la primera cadena de ácido nucleico es de 12 a 25, (ii) comprende al menos 4 nucleótidos de ADN o nucleótidos de ADN modificados consecutivos que son reconocidos por la ARNasa H cuando la primera cadena de ácido nucleico está hibridada con el producto de transcripción, (iii) se hibrida con el producto de transcripción y (iv) comprende una región ala 5' de uno o más

análogos de nucleótidos ubicados en posición 5' con respecto a los al menos 4 nucleótidos de ADN o nucleótidos de ADN modificados consecutivos que son reconocidos por la ARNasa H y/o una región ala 3' de uno o más análogos de nucleótidos ubicados en posición 3' con respecto a los al menos 4 nucleótidos de ADN o nucleótidos de ADN modificados consecutivos que son reconocidos por la ARNasa H; y

(b) la segunda cadena de ácido nucleico (i) comprende al menos 4 nucleótidos de ARN consecutivos y (ii) comprende adicionalmente una región ala 5' de uno o más nucleótidos fosforotioados o análogos de nucleótidos fosforotioados ubicados en posición 5' con respecto a los al menos 4 nucleótidos de ARN consecutivos y que tiene un efecto de supresión de la descomposición por enzimas, en la que dichos análogos de nucleótidos son nucleótidos unidos, y/o una región ala 3' de uno o más nucleótidos fosforotioados o análogos de nucleótidos fosforotioados ubicados en posición 3' con respecto a los al menos 4 nucleótidos de ARN consecutivos y que tiene un efecto de supresión de la descomposición por enzimas, en las que dichos análogos de nucleótidos son nucleótidos unidos, en la que los al menos 4 nucleótidos de ARN consecutivos son escindidos por la ARNasa H cuando la segunda cadena de ácido nucleico está hibridada con la primera cadena de ácido nucleico, y en la que la segunda cadena de ácido nucleico comprende adicionalmente un resto funcional que tiene una función de entrega dirigida.

(2) La composición farmacéutica del punto (1), en la que los al menos 4 nucleótidos de ARN consecutivos de la segunda cadena de ácido nucleico son nucleótidos de ARN naturales o nucleótidos de ARN 2'-O-metilados.

(3) La composición farmacéutica de acuerdo con el punto (1) o (2), en la que la primera cadena de ácido nucleico comprende la región ala 5' y la región ala 3' y en la que la región ala 5' comprende al menos 2 análogos de nucleótidos y la región ala 3' comprende al menos 2 análogos de nucleótidos.

(4) La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1)-(3), en la que

(i) el número total de nucleótidos y análogos de nucleótidos en la primera cadena de ácido nucleico y el número total de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ADN, análogos de nucleótidos y nucleótidos de ANP en la segunda cadena de ácido nucleico son iguales; o

(ii) el número total de nucleótidos y análogos de nucleótidos en la primera cadena de ácido nucleico y el número total de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ADN, análogos de nucleótidos y nucleótidos de ANP en la segunda cadena de ácido nucleico son diferentes.

(5) La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de los puntos (1)-(4), en la que la primera cadena de ácido nucleico comprende al menos un análogo de nucleótido que es o son nucleótidos unidos.

(6) La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1)-(5), en la que al menos uno de los nucleótidos y/o al menos uno de los análogos de nucleótidos en la primera cadena de ácido nucleico está fosforotioado.

(7) La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1)-(3) o (5)-(6), en la que el complejo de ácido nucleico bicatenario comprende adicionalmente una tercera cadena de ácido nucleico hibridada con la segunda cadena de ácido nucleico.

(8) La composición farmacéutica de acuerdo con el punto (7), en la que la tercera cadena de ácido nucleico comprende nucleótidos de ANP.

(9) La composición farmacéutica de acuerdo con el punto (7) u (8), en la que la tercera cadena de ácido nucleico comprende adicionalmente un resto funcional que tiene una función de entrega dirigida.

[Efectos ventajosos de la invención]

De acuerdo con determinadas realizaciones, puede administrarse un ácido nucleico no codificante en un complejo bicatenario y la expresión de un gen diana o el nivel de un producto de transcripción pueden suprimirse selectiva y muy eficazmente por el ácido nucleico no codificante. En algunas realizaciones, el complejo bicatenario puede entregarse a un sitio diana con alta especificidad y alta eficiencia mediante la asociación de un resto de entrega con el complejo.

[Breve descripción de los dibujos]

[Fig. 1] La FIG. 1 es un diagrama que ilustra los mecanismos generales de determinados métodos no codificantes. Como se ilustra en el diagrama, cuando un oligonucleótido (oligonucleótido no codificante (ONC)) ("ADN" en el diagrama) que es complementario con una secuencia parcial del ARNm de un gen diana se introduce en una célula, la expresión de una proteína que está codificada por el gen diana, se inhibe selectivamente. En el cuadro discontinuo, se muestra un mecanismo de degradación en el que la ARNasa H escinde el ARNm en una ubicación en la que se hibrida con un ONC. Como resultado de la escisión por la ARNasa H, el ARNm generalmente no se traducirá para producir un producto de expresión génica funcional.

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

[Fig. 3] Las FIG. 3A-B son diagramas esquemáticos que ilustran ejemplos de complejos de ácido nucleico bicatenario adecuados. Las cadenas 5'-ANB-ADN-ANB-3' son ácidos nucleicos no codificantes complementarios con el producto de transcripción dirigido. En el diagrama, "(s)" representa ácidos nucleicos con enlaces fosforotioato; "(o)" representa ácidos nucleicos con enlaces fosforotioato naturales; y "(m/s)" representa el ARN que ha sido fosforotioado y 2'-O-metilado. Además, "X" representa un resto funcional y puede representar

independientemente un lípido (por ejemplo, colesterol o tocoferol), un azúcar o similar, o una proteína, un péptido (por ejemplo, un anticuerpo) o similar.

[Fig. 4] Las FIG. 4A-B son diagramas esquemáticos que ilustran ejemplos de realizaciones adecuadas de complejos de ácido nucleico bicatenario que contienen tres cadenas: una primera cadena de ácido nucleico de ONC y una segunda cadena de ácido nucleico complementaria, que tienen diferentes longitudes de cadena y una tercera cadena de ácido nucleico que comprende un ANP al que se une una molécula funcional tal como un péptido, un anticuerpo o similar. Los símbolos en el diagrama tienen los mismos significados que los definidos en la FIG. 3.

[Fig. 5] Las FIG. 5A-B son diagramas esquemáticos que ilustran ejemplos de realizaciones adecuadas de un complejo de ácido nucleico bicatenario que tiene al menos una primera cadena de ácido nucleico de ONC y una segunda cadena de ácido nucleico complementaria que tienen diferentes longitudes de cadena. En estas realizaciones, ya sea (A) el ácido nucleico comprende adicionalmente una tercera cadena de ácido nucleico complementaria con la segunda cadena de ácido nucleico o (B) la segunda cadena de ácido nucleico comprende adicionalmente una región autocomplementaria con ADN fosforotioado unida a la segunda cadena de ácido nucleico mediante un enlazador de horquilla. Además, en el diagrama, "(m)" representa un ARN 2'-O-metilado. Otros símbolos tienen los mismos significados que los definidos en la FIG. 3.

[Fig. 6] La FIG. 6A es un diagrama esquemático que ilustra un ácido nucleico que tiene la estructura de 5'-ANB-ADN-ANB-3' que está marcado en el extremo 5' con el colorante fluorescente Cy3. La FIG. 6B es un diagrama esquemático que ilustra un ácido nucleico que tiene la estructura de 5'-ANB-ADN-ANB-3' que está marcado en el extremo 5' con el colorante fluorescente Cy3 y está marcado en el extremo 3' con colesterol ("Col"). "(s)" representa un ácido nucleico fosforotioado.

[Fig. 7] La FIG. 7 es una fotografía microscópica de fluorescencia que ilustra los resultados de la observación del hígado de un ratón al que se le ha administrado "ANB" marcado con (Cy3) de forma fluorescente (de acuerdo con la FIG. 6A) o "col-ANB" marcado con (Cy3) de forma fluorescente (de acuerdo con la FIG. 6B).

[Fig. 8] La FIG. 8 es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos mediante la administración a ratones de "Cy3-Col-ANB(ApoB1) de 12 monómeros" (de acuerdo con la FIG. 6B), "Cy3-Col-ANB(ApoB1) de 20 monómeros" o "Cy3-Col-ANB(ApoB1) de 29 monómeros" o "Cy3-ANB(ApoB1) de 12 monómeros" (de acuerdo con la FIG. 6A), todos los cuales tienen una secuencia complementaria con la secuencia de bases del gen ApoB1 y mediante el análisis de la cantidad de expresión del gen ApoB1 en los hígados de estos ratones mediante PCR cuantitativa.

[Fig. 9] La FIG. 9 es un diagrama esquemático que ilustra determinadas realizaciones de un ácido nucleico bicatenario. Los símbolos tienen los mismos significados que los definidos en las FIG. 3-6.

[Fig. 10] La FIG. 10 es un diagrama esquemático que ilustra la cadena no codificante (ONC) y sus cadenas complementarias (ARNc(o), ARNc(G) y ARNc(m/s)), que se usaron para evaluar el efecto no codificante de un complejo de ácido nucleico bicatenario de acuerdo con una realización. Los símbolos tienen los mismos significados que los definidos en la FIG. 3-6 y 9.

[Fig. 11] La FIG. 11 muestra fotografías que ilustran los resultados obtenidos mediante el análisis de la presencia o ausencia de hibridación de la cadena no codificante y sus cadenas complementarias ilustradas en la FIG. 10 mediante electroforesis. El panel A indica los resultados de tomar una fotografía con iluminación UV y el panel B muestra una fotografía del gel.

[Fig. 12] La FIG. 12 es una fotografía tomada con iluminación UV que ilustra los resultados obtenidos mediante hibridación de la cadena no codificante y sus cadenas complementarias ilustradas en la FIG. 10, mediante tratamiento de las cadenas con ARNasa H y mediante análisis de los productos de reacción mediante electroforesis.

[Fig. 13] La FIG. 13 es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos mediante la introducción de la cadena no codificante ilustrada en la FIG. 10 o complejos de ácido nucleico bicatenario (en concentraciones de 0,4 nM o 10 nM) compuestos por la cadena no codificante y una de las cadenas complementarias ilustradas en la FIG. 10, en las células. La cantidad de expresión del gen ApoB1, cuyo producto de transcripción está dirigido por la cadena no codificante, en las células, se analizó mediante PCR cuantitativa.

[Fig. 14] La FIG. 14 es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos mediante el análisis de la cantidad de expresión del gen ApoB1 en células en las que la cadena no codificante ilustrada en la FIG. 10 o complejos de ácido nucleico bicatenario compuestos por la cadena no codificante y una de las cadenas complementarias ilustradas en la FIG. 10, normalizados a la cantidad de expresión obtenida en las células donde solo se introdujo la cadena no codificante.

[Fig. 15] La FIG. 15 es un diagrama esquemático que ilustra una cadena no codificante, una cadena complementaria (ARNc(G)) y una cadena complementaria con un resto funcional tocoferol (Toc-ARNc(G)), que se usaron para evaluar el efecto no codificante de un complejo de ácido nucleico bicatenario. "Toc" representa tocoferol. Otros símbolos tienen los mismos significados que los definidos en las FIG. 3-6, 9 y 10.

[Fig. 16] La FIG. 16 es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos mediante la administración a ratones de la cadena no codificante ilustrada en la FIG. 15 o ácidos nucleicos bicatenarios compuestos por la cadena no codificante y una de las cadenas complementarias ilustradas en la FIG. 15, y mediante el análisis de las cantidades de expresión del gen ApoB1, cuyo producto de transcripción está dirigido por la cadena no codificante, en los ratones.

[Fig. 17] La FIG. 17 es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos mediante la evaluación de la especificidad del efecto no codificante de un complejo de ácido nucleico bicatenario compuesto por la cadena no codificante y una cadena complementaria que tiene tocoferol unido a la misma como se ilustra en la FIG. 15.

[Fig. 18] La FIG. 18 es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos mediante la evaluación de la dependencia

de la dosis del efecto no codificante de un complejo de ácido nucleico bicatenario compuesto por la cadena no codificante y una cadena complementaria que tiene tocoferol unido a la misma como se ilustra en la FIG. 15.

[Fig. 19A] La FIG. 19A es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos mediante la evaluación de la sostenibilidad del efecto no codificante de complejos de ácido nucleico bicatenario compuestos por la cadena no codificante y cadenas complementarias que tienen tocoferol unido a las mismas como se ilustra en la FIG. 15. En el diagrama, "d" representa el número de días transcurridos después de que se administró el ácido nucleico bicatenario pertinente.

[Fig. 19B] La FIG. 19B es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos mediante la evaluación de la sostenibilidad del efecto no codificante de complejos de ácido nucleico bicatenario compuestos por la cadena no codificante y cadenas complementarias que tienen tocoferol unido a las mismas como se ilustra en la FIG. 15. En el diagrama, "d" representa el número de días transcurridos después de que se administró el ácido nucleico bicatenario pertinente.

[Fig. 20A] La FIG. 20A es un diagrama esquemático que ilustra un oligonucleótido no codificante y cadenas complementarias de acuerdo con determinadas realizaciones.

[Fig. 20B] La FIG. 20B es un gráfico que compara los resultados obtenidos mediante la evaluación del efecto no codificante del complejo de ácido nucleico bicatenario (ANB/ARNc(G)-OM) de acuerdo con una realización de la presente invención, que tiene una cadena complementaria que comprende ARN que está completamente 2'-O-metilado.

[Fig. 21] La FIG. 21 es un diagrama esquemático que ilustra realizaciones adecuadas de un ácido nucleico bicatenario que puede usarse para incorporar un péptido, proteína o similar como un resto funcional. Los símbolos en el diagrama tienen los mismos significados que los definidos en la FIG. 3 y la FIG. 4.

[Fig. 22] La FIG. 22 es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos mediante la evaluación del efecto no codificante del complejo de ácido nucleico bicatenario compuesto por tres cadenas: la cadena no codificante, una cadena complementaria que comprende ARN y una cadena de ANP para la unión a un péptido o similar.

[Fig. 23] La FIG. 23 es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos mediante la evaluación del efecto no codificante de complejos de ácido nucleico bicatenario compuestos por una cadena no codificante y una cadena complementaria que comprende ANP.

[Fig. 24] La FIG. 24 es un diagrama esquemático que ilustra un oligonucleótido no codificante y cadenas complementarias de acuerdo con determinadas realizaciones.

[Fig. 25A] La FIG. 25A es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos para complejos de ácido nucleico bicatenario preparados con las cadenas que se muestran en la FIG. 24.

[Fig. 25B] La FIG. 25B es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos para complejos de ácido nucleico bicatenario preparados con las cadenas que se muestran en la FIG. 24.

[Fig. 26] La FIG. 26 es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos en el Ejemplo 11 para la supresión de la expresión usando complejos de ácido nucleico bicatenario.

[Fig. 27A] La FIG. 27A es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos en el Ejemplo 12 que evalúa la supresión de la expresión de TTRh con complejos de ácido nucleico bicatenario de diferente longitud.

[Fig. 27B] Las FIG. 27B es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos en el Ejemplo 12 que evalúa la supresión de la expresión de TTRh con complejos de ácido nucleico bicatenario de diferente longitud.

[Fig. 28] La FIG. 28 es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos en el Ejemplo 12 que evalúa el nivel de proteína sérica para una proteína dirigida por un complejo de ácido nucleico bicatenario antes y después del tratamiento.

[Fig. 29] La FIG. 29 es una imagen fluorescente que muestra los resultados obtenidos en el Ejemplo 13 que muestra la ubicación de un complejo de ácido nucleico bicatenario compuesto por tres cadenas.

[Fig. 30] La FIG. 30 es un gráfico que ilustra los resultados del Ejemplo 13 que muestra la supresión de la expresión causada por un complejo de ácido nucleico bicatenario compuesto por tres cadenas.

[Fig. 31] La FIG. 31 es un gráfico que ilustra los resultados del Ejemplo 14 que muestra la supresión del nivel de un miARN.

[Fig. 32] La FIG. 32 es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos en el Ejemplo 15 que demuestra la supresión de la expresión usando un complejo de ácido nucleico bicatenario que contiene un ONC que incluye un análogo de nucleótido de amidaANU (AmAN)

Descripción detallada

En el presente documento se describen complejos de ácido nucleico bicatenario que incluyen un ácido nucleico no codificante y un ácido nucleico complementario con el ácido nucleico no codificante.

Determinadas realizaciones incluyen un complejo de ácido nucleico bicatenario purificado o aislado que comprende un primer ácido nucleico hibridado con un segundo ácido nucleico, que tiene una actividad de supresión de la expresión de un gen diana o, más generalmente, el nivel de un producto de transcripción, por medio de un efecto no codificante.

La primera cadena de ácido nucleico (i) comprende nucleótidos y análogos de nucleótidos, y el número total de nucleótidos y análogos de nucleótidos en la primera cadena de ácido nucleico es de 12 a 25, (ii) comprende al menos 4 nucleótidos de ADN o nucleótidos de ADN modificados consecutivos que son reconocidas por la ARNasa H cuando la primera cadena de ácido nucleico se hibrida con un producto de transcripción, (iii) la primera cadena de

ácido nucleico se hibrida con el producto de transcripción; y (iv) comprende una región ala 5' de uno o más análogos de nucleótidos ubicados en posición 5' con respecto a los al menos 4 nucleótidos de ADN o nucleótidos de ADN modificados consecutivos que son reconocidos por la ARNasa H y/o una región ala 3' de uno o más análogos de nucleótidos ubicados en posición 3' con respecto a los al menos 4 nucleótidos de ADN o nucleótidos de ADN modificados consecutivos que son reconocidos por la ARNasa H.

La segunda cadena de ácido nucleico comprende nucleótidos y opcionalmente análogos de nucleótidos, y la segunda cadena de ácido nucleico puede hibridarse con la primera cadena de ácido nucleico.

La segunda cadena de ácido nucleico comprende:

(i) al menos 4 nucleótidos de ARN consecutivos, y

(ii) comprende adicionalmente una región ala 5' de uno o más nucleótidos fosforotioados o análogos de nucleótidos fosforotioados ubicados en posición 5' con respecto a los al menos 4 nucleótidos de ARN consecutivos y que tiene un efecto de supresión de la descomposición por enzimas, en la que dichos análogos de nucleótidos son nucleótidos unidos y/o una región ala 3' de uno o más nucleótidos fosforotioados o análogos de nucleótidos fosforotioados ubicados en posición 3' con respecto a los al menos 4 nucleótidos de ARN consecutivos y que tiene un efecto de supresión de la descomposición por enzimas, en las que dichos análogos de nucleótidos son nucleótidos unidos, en la que los al menos 4 nucleótidos de ARN consecutivos son escindidos por la ARNasa H cuando la segunda cadena de ácido nucleico está hibridada con la primera cadena de ácido nucleico y en la que la segunda cadena de ácido nucleico comprende adicionalmente un resto funcional que tiene una función de entrega dirigida.

El "efecto no codificante" significa la supresión de la expresión de un gen diana o el nivel de un producto de transcripción dirigido, que se produce como resultado de la hibridación del producto de transcripción dirigido (cadena de codificante de ARN) con, por ejemplo, una cadena de ADN o, más generalmente, la cadena está diseñada para causar el efecto no codificante, complementaria con una secuencia parcial del producto de transcripción o similar, en la que, en determinados casos, la inhibición de la traducción o el efecto de modificación de la función de corte y empalme, tal como la omisión de exones (véase la descripción en la parte superior fuera del área rodeada por líneas discontinuas en la FIG. 1) puede causarse mediante la cobertura del producto de transcripción por el producto de hibridación, y/o la descomposición del producto de transcripción puede ocurrir como resultado del reconocimiento de la porción hibridada (véase la descripción dentro del área rodeada por líneas discontinuas en la figura 1).

El "gen diana" o el "producto de transcripción dirigido" cuya expresión es suprimida por el efecto no codificante no están particularmente limitados y los ejemplos de los mismos incluyen genes cuya expresión aumenta en diversas enfermedades. Además, el "producto de transcripción del gen diana" es un ARNm transcrito a partir del ADN genómico que codifica el gen diana, y también incluye un ARNm que no ha sido sometido a modificación de base, un precursor de ARNm que no se ha cortado y empalmado y similares. Más generalmente, el "producto de transcripción" puede ser cualquier ARN sintetizado por una ARN polimerasa dependiente de ADN.

La expresión "complejo de ácido nucleico bicatenario purificado o aislado" como se usa en el presente documento significa un complejo de ácido nucleico que comprende al menos una cadena nucleica que no aparece en la naturaleza o está esencialmente libre de materiales de ácido nucleico de origen natural.

El término "complementario", como se usa en el presente documento, significa una relación en la que los denominados pares de bases de Watson-Crick (pares de bases de tipo natural) o los pares de bases no de Watson-Crick (pares de bases de Hoogsteen y similares) pueden formarse mediante enlaces de hidrógeno. No es necesario que la secuencia de bases del producto de transcripción diana, por ejemplo, el producto de transcripción de un gen diana y la secuencia de bases de la primera cadena de ácido nucleico sean perfectamente complementarias y es aceptable si las secuencias de bases tienen una complementariedad de al menos el 70 % o más, preferentemente el 80 % o más y más preferentemente el 90 % o más (por ejemplo, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % o más). La complementariedad de secuencia puede determinarse mediante el uso de un programa BLAST o similar. Una primera cadena puede "hibridarse" con una segunda cadena cuando las secuencias son complementarias. Un experto en la materia puede determinar fácilmente las condiciones (temperatura, concentración de sal, etc.) en las cuales pueden hibridarse dos cadenas. Además, un experto habitual en la materia puede diseñar fácilmente un ácido nucleico no codificante complementario al producto de transcripción dirigido basándose en la información de la secuencia de bases de, por ejemplo, el gen diana.

La primera cadena de ácido nucleico de acuerdo con determinadas realizaciones es un ácido nucleico no codificante complementario con un producto de transcripción, tal como el de un gen diana y es un ácido nucleico que contiene una región que comprende al menos 4 nucleótidos de ADN o nucleótidos de ADN modificados consecutivos que son reconocidos por la ARNasa H cuando la primera cadena de ácido nucleico se hibrida con el producto de transcripción.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico" puede referirse a un nucleótido o nucleósido monomérico o puede significar un oligonucleótido que consiste en varios monómeros. La expresión "cadena de

ácido nucleico" también se usa en el presente documento para referirse a un oligonucleótido. Las cadenas de ácido nucleico pueden prepararse en su totalidad o en parte mediante métodos de síntesis química, incluyendo el uso de un sintetizador automatizado o mediante procesos enzimáticos, incluyendo, pero no limitados a, reacciones de polimerasa, ligasa o restricción.

5 La longitud de la cadena de la primera cadena de ácido nucleico es de 12 a 25 bases. La longitud puede ser de 13 a 20 bases. En determinados casos, la elección de la longitud generalmente depende de un equilibrio de la intensidad del efecto no codificante con la especificidad de la cadena de ácido nucleico para la diana, entre otros factores tales como el coste, el rendimiento de síntesis y similares.

10 Los "al menos cuatro nucleótidos de ADN o nucleótidos de ADN modificados consecutivos que son reconocidos por la ARNasa H" es generalmente una región que comprende de 4 a 20 bases consecutivas, una región que comprende de 5 a 16 bases consecutivas o una región que comprende de 6 a 12 bases consecutivas. Además, los nucleótidos que pueden usarse en esta región son aquellos que, como el ADN natural, son reconocidos por la ARNasa H cuando se hibridan con nucleótidos de ARN, en los que la ARNasa H escinde la cadena de ARN. Se conocen en la técnica nucleótidos adecuados, tales como los nucleótidos de ADN modificado. Se sabe que nucleótidos que contienen un grupo 2'-hidroxi, como un nucleótido de ARN, no son adecuados. Un experto en la materia puede determinar fácilmente la idoneidad de un nucleótido para su uso en esta región de "al menos cuatro nucleótidos de ADN o nucleótidos de ADN modificados consecutivos".

20 En determinadas realizaciones, la primera cadena de ácido nucleico comprende "nucleótidos y análogos de nucleótidos". Esta expresión significa que la primera cadena puede incluir nucleótidos de ADN, nucleótidos de ARN e incluye adicionalmente análogos de nucleótidos en la cadena.

25 Como se usa en el presente documento, "nucleótido de ADN" significa un nucleótido de ADN de origen natural o un nucleótido de ADN con una subunidad de base, azúcar o enlace fosfato modificada. De forma similar, "nucleótido de ARN" significa un nucleótido de ARN de origen natural o un nucleótido de ARN con una subunidad de base, azúcar o enlace fosfato modificada. Una subunidad de base, azúcar o enlace de fosfato modificada es aquella en la que se ha añadido o sustituido un solo sustituyente en una subunidad y la subunidad en su totalidad no se ha reemplazado con un grupo químico diferente. Desde el punto de vista de que una parte o la totalidad de la región que comprende el nucleótido tiene una alta resistencia a la desoxirribonucleasa y similares, el ADN puede ser un nucleótido modificado. Los ejemplos de dicha modificación incluyen la 5-metilación, 5-fluoración, 5-bromación, 5-yodación y N4-metilación de citosina; 5-desmetilación, 5-fluoración, 5-bromación y 5-yodación de timidina; N6-metilación y 8-bromación de adenina; N2-metilación y 8-bromación de guanina; fosforotioación, metilfosfonación, metiltiofosfonación, metilfosfonación quiral, fosforoditioación, fosforilación, 2'-O-metilación, 2'-metoxietilo (MOE), 2'-aminopropilo (AP) y 2'-fluoración. Sin embargo, desde el punto de vista de que tenga una farmacocinética excelente, se prefiere la fosforilación. Dicha modificación puede realizarse de manera que el mismo ADN pueda someterse a varios tipos de modificaciones en combinación. Y, como se analiza más adelante, pueden modificarse nucleótidos de ARN para conseguir un efecto similar.

40 En determinados casos, el número de ADN modificados y la posición de modificación pueden afectar al efecto no codificante y similar proporcionado por el ácido nucleico bicatenario del que se desvela en el presente documento. Puesto que estas realizaciones pueden variar con la secuencia del gen diana y similar, puede depender de los casos, pero un experto habitual en la materia puede determinar realizaciones adecuadas haciendo referencia a las descripciones de los documentos relacionados con métodos no codificantes. Además, cuando se mide el efecto no codificante que posee un complejo de ácido nucleico bicatenario después de la modificación, si el valor medido obtenido de este modo no es significativamente más bajo que el valor medido del complejo de ácido nucleico bicatenario antes de la modificación (por ejemplo, si el valor medido obtenido después de la modificación es inferior en un 30 % o más al valor medido del complejo de ácido nucleico bicatenario antes de la modificación), puede evaluarse la modificación pertinente. La medición del efecto no codificante puede realizarse, como se indica en los Ejemplos a continuación, mediante la introducción de un compuesto de ácido nucleico sometido a ensayo en una célula o similar y midiendo la cantidad de expresión (cantidad de ARNm, cantidad de ADNc, cantidad de una proteína o similar) del gen diana en la célula en la que la expresión es suprimida por el efecto no codificante proporcionado por el compuesto de ácido nucleico sometido a ensayo, mediante el uso apropiado de técnicas conocidas tales como transferencia Northern, PCR cuantitativa y transferencia Western.

60 Como se usa en el presente documento, "análogo de nucleótido" significa un nucleótido de origen no natural, en el que la subunidad de base, azúcar o enlace fosfato tiene más de un sustituyente añadido o sustituido en una subunidad o que la subunidad en su totalidad se ha reemplazado con un grupo químico diferente. Un ejemplo de un análogo con más de una sustitución es un ácido nucleico unido, en el que se ha añadido una unidad de unión en virtud de dos sustituciones en el anillo de azúcar, unidas normalmente a los átomos de carbono 2' y 4'. Con respecto a la primera cadena de ácido nucleico de acuerdo con determinadas realizaciones, desde el punto de vista de aumentar la afinidad a una secuencia parcial del producto de transcripción del gen diana y/o la resistencia del gen diana a una nucleasa, la primera cadena de ácido nucleico comprende adicionalmente un análogo de nucleótido. El "análogo de nucleótido" puede ser cualquier ácido nucleico en el que, debido a las modificaciones (grupos de unión, sustituyentes, etc.), la afinidad a una secuencia parcial del producto de transcripción del gen diana y/o la resistencia

del ácido nucleico a una nucleasa se potencian y los ejemplos del mismo incluyen ácidos nucleicos que se desvelan como adecuados para su uso en métodos no codificantes, en el documento JP 10-304889 A, el documento WO 2005/021570, el documento JP 10-195098 A, el documento JP 2002-521310 W, el documento WO 2007/143315, el documento WO 2008/043753, el documento WO 2008/029619 y el documento WO 2008/049085 (en lo sucesivo en el presente documento, estos documentos se denominarán "documentos relacionados con métodos no codificantes"). Es decir, ejemplos de los mismos incluyen los ácidos nucleicos desvelados en los documentos descritos anteriormente: un ácido nucleico de hexitol (ANH), un ácido nucleico de ciclohexano (ANCe), un ácido nucleico peptídico (ANP), un ácido nucleico de glicol (ANG), un ácido nucleico de treosa (ANT), un ácido nucleico de morfolino, un triciclo-ADN (ADNtc), un ácido nucleico 2'-O-metilado, un ácido nucleico 2'-MOE (2'-O-metoxietil)ado, un ácido nucleico 2'-AP (2'-O-aminopropil)ado, un ácido nucleico 2'-fluorado, un ácido 2'-F-arabinonucleico (2'-F-ANA) y un ANU (ácido nucleico unido).

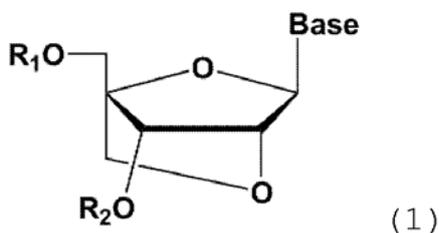
El ANU de acuerdo con determinadas realizaciones puede ser cualquier ribonucleótido o desoxirribonucleótido en el que el átomo de carbono 2' y el átomo de carbono 4' están unidos por dos o más átomos. Los expertos en la materia conocen ejemplos de ácidos nucleicos unidos. Un subgrupo de dichos ANU puede describirse como que tiene el átomo de carbono en la posición 2' y el átomo de carbono en la posición 4' unidos por 4'-(CH₂)_p-O-2', 4'-(CH₂)_p-S-2', 4'-(CH₂)_p-OCO-2', 4'-(CH₂)_n-N(R₃)-O-(CH₂)_m-2' (en el presente documento, p, m y n representan un número entero de 1 a 4, un número entero de 0 a 2 y un número entero de 1 a 3, respectivamente y R₃ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, un grupo alqueno, un grupo cicloalquilo, un grupo arilo, un grupo aralquilo, un grupo acilo, un grupo sulfonilo y un sustituyente unitario (una molécula marcadora fluorescente o quimioluminiscente, un grupo funcional que tiene actividad de escisión del ácido nucleico, un péptido señal de ubicación intracelular o intranuclear o similar). Además, en lo que respecta al ANU de acuerdo con determinadas realizaciones, en el sustituyente OR₂ en el átomo de carbono en la posición 3' y el sustituyente OR₁ en el átomo de carbono en la posición 5', R₁ y R₂ son normalmente átomos de hidrógeno, pero pueden ser idénticos o diferentes entre sí y también pueden ser un grupo protector de un grupo hidroxilo para la síntesis de ácido nucleico, un grupo alquilo, un grupo alqueno, un grupo cicloalquilo, un grupo arilo, un grupo aralquilo, un grupo acilo, un grupo sulfonilo, un grupo sililo, un grupo ácido fosfórico, un grupo ácido fosfórico protegido por un grupo protector para la síntesis de ácido nucleico o -P(R₄)R₅ (en el presente documento, R₄ y R₅, que pueden ser idénticos o diferentes entre sí, representan cada uno un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido por un grupo protector para la síntesis de ácido nucleico, un grupo mercapto, un grupo mercapto protegido por un grupo protector para la síntesis de ácido nucleico, un grupo amino, un grupo alcoxi que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo cianoalcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o un grupo amino sustituido con un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono). Los ejemplos no limitantes de un ANU de este tipo incluyen α-L-metilenoxi(4'-CH₂-O-2')ANU o β-D-metilenoxi(4'-CH₂-O-2')ANU, que también se conoce como ANB (ácido nucleico bloqueado (marca registrada), 2',4'-ANU), etilenoxi(4'-CH₂)₂-O-2')ANU que también se conoce como ANE, β-D-tio(4'-CH₂-S-2')ANU, aminooxi(4'-CH₂-O-N(R₃)-2')ANU, oxiamino(4'-CH₂-N(R₃)-O-2')ANU que también se conoce como 2',4'-ANUNC, 2',4'-ANUCOC, 3'-amino-2',4'-ANU, 5'-metil ANU, (4'-CH(CH₃)-O-2')ANU, que también se conoce como cEt-ANU, (4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2')ANU, que también se conoce como cMOE-ANU, amidaANU (4'-C(O)-N(R)-2')ANU (R = H, Me), que también se conoce como AmAN y otros ANU conocidos por los expertos en la materia.

Además, en el análogo de nucleótido, de acuerdo con determinadas realizaciones, puede modificarse un resto base. Los ejemplos de la modificación en un resto de base incluyen 5-metilación, 5-fluoración, 5-bromación, 5-yodación y N4-metilación de citosina; 5-desmetilación, 5-fluoración, 5-bromación y 5-yodación de timidina; N6-metilación y 8-bromación de adenina; y N2-metilación y 8-bromación de guanina. Además, en el ácido nucleico modificado de acuerdo con determinadas realizaciones, puede modificarse un sitio de unión a diéster de ácido fosfórico. Los ejemplos de la modificación del sitio de unión del diéster de ácido fosfórico incluyen la fosforilación, la metilfosfonación, la metilfosfonación quiral, la fosforoditioación y la fosforilación. Sin embargo, desde el punto de vista de que tenga una farmacocinética excelente, puede usarse la fosforilación. Además, dicha modificación de un resto de base o la modificación de un sitio de unión a diéster de ácido fosfórico puede realizarse de manera que el mismo ácido nucleico pueda someterse a múltiples tipos de modificaciones en combinación.

En general, los nucleótidos modificados y los análogos de nucleótidos modificados no se limitan a los que se ejemplifican en el presente documento. Se conocen en la técnica numerosos nucleótidos modificados y análogos de nucleótidos modificados, tales como, por ejemplo, aquellos desvelados en la Patente de los EE.UU. N.º 8.299.039 de Tachas et al., Particularmente en las columnas 17-22 y pueden usarse en las realizaciones de la presente solicitud.

Un experto habitual en la materia puede seleccionar y usar apropiadamente un análogo de nucleótido entre dichos ácidos nucleicos modificados teniendo en cuenta al mismo el efecto no codificante, la afinidad a una secuencia parcial del producto de transcripción del gen diana, la resistencia a una nucleasa y similares. Sin embargo, el análogo de nucleótido en algunas realizaciones es un ANB representado por la siguiente fórmula (1):

[Fórmula química 1]



En la fórmula (1), "Base" representa un grupo heterocíclico aromático o un grupo de anillo de hidrocarburo aromático que puede estar sustituido, por ejemplo, un resto de base (base de purina o base de pirimidina) de un nucleósido natural o un resto de base de un nucleósido no natural (modificado), mientras que los ejemplos de modificación del resto de base incluyen los que se han descrito anteriormente; y

R_1 y R_2 , que pueden ser idénticos o diferentes entre sí, representan cada uno un átomo de hidrógeno, un grupo protector de un grupo hidroxilo para la síntesis de ácido nucleico, un grupo alquilo, un grupo alqueno, un grupo cicloalquilo, un grupo arilo, un grupo aralquilo, un grupo acilo, un grupo sulfonilo, un grupo sililo, un grupo ácido fosfórico, un grupo ácido fosfórico protegido por un grupo protector para la síntesis de ácido nucleico o $-P(R_4)R_5$ [aquí, R_4 y R_5 , que pueden ser idénticos o diferentes entre sí, cada uno representa un grupo hidroxilo, un grupo hidroxilo protegido por un grupo protector para la síntesis de ácido nucleico, un grupo mercapto, un grupo mercapto protegido por un grupo protector para la síntesis de ácido nucleico, un amino grupo, un grupo alcoxi que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, grupo aralquilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono, un grupo cianoalcoxi que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o un grupo amino sustituido con un grupo alquilo que tiene 1 a 5 átomos de carbono.

Los compuestos mostrados por las fórmulas químicas anteriores se representan como nucleósidos, pero el "ANB" y, más generalmente, el ANU de acuerdo con determinadas realizaciones incluyen formas de nucleótidos en las que un grupo derivado de ácido fosfórico está unido al nucleósido pertinente (nucleótido). En otras palabras, los ANU, tales como el ANB, se incorporan como nucleótidos en las cadenas nucleicas que comprenden el complejo de ácido nucleico bicatenario.

La "región ala que comprende uno o más análogos de nucleótidos" de acuerdo con determinadas realizaciones se encuentra en el lado 5' terminal y/o el lado 3' terminal de la región que comprende al menos cuatro nucleótidos de ADN consecutivos (en lo sucesivo en el presente documento, también denominada "región de huecos de ADN").

La región que comprende un análogo de nucleótido que está dispuesta en el extremo 5' de la región de huecos de ADN (en lo sucesivo en el presente documento, también llamada "región ala 5'") y la región que comprende un análogo de nucleótido que está dispuesta en el extremo 3' de la región del hueco del ADN (en lo sucesivo en el presente documento, también denominada "región ala 3'") pueden comprender cada una independientemente al menos un tipo de análogo de nucleótido que se discute en los documentos relacionados con los métodos no codificantes y puede comprender además un ácido nucleico natural (ADN o ARN) además de dicho análogo de nucleótido. Además, las longitudes de las cadenas de la región ala 5' y la región ala 3' son, independientemente, generalmente de 1 a 10 bases, de 1 a 7 bases o de 2 a 5 bases.

Además, existen realizaciones adecuadas del número de tipos y la posición del análogo de nucleótido y el nucleótido natural en la región ala 5' y la región ala 3', puesto que el número y la posición de esos ácidos nucleicos pueden afectar el efecto no codificante y similares proporcionados por el complejo de ácido nucleico bicatenario en determinadas realizaciones. Puesto que estas realizaciones adecuadas pueden variar con la secuencia y similares, puede depender de los casos, pero un experto habitual en la materia puede determinar las realizaciones adecuadas haciendo referencia a las descripciones de los documentos relacionados con los métodos no codificantes. Además, cuando el efecto no codificante que posee un ácido nucleico bicatenario después de la modificación se mide de la misma manera que en el caso de la región que comprende "al menos cuatro nucleótidos de ADN consecutivos", si el valor medido obtenido de este modo no es significativamente menor que el de un ácido nucleico bicatenario antes de la modificación, la modificación pertinente puede evaluarse como una realización preferida.

Mientras tanto, los métodos no codificantes que implican un ARN o un ANB solamente que se han intentado tradicionalmente han suprimido la traducción a través de la unión a un ARNm diana; sin embargo, sus efectos son normalmente insuficientes. Por otro lado, en métodos no codificantes que implican solo un ADN, puesto que una estructura bicatenaria compuesta por un ADN y un ARN se obtiene una vez que el ADN se une a un transcrito del gen diana, puede esperarse que se obtenga un fuerte efecto de supresión de la expresión del gen diana haciendo que el heterodúplex de ADN-ARN sea una diana de la ARNasa H y, por tanto, escindir el ARNm. Sin embargo, puesto que la unión del ADN mismo al ARN diana es débil, el efecto real también ha sido normalmente insuficiente.

Por tanto, cuando un ADN que tiene una longitud de cadena de al menos cuatro o más bases se dispone en el centro de una primera cadena de ácido nucleico y un ANB (u otro ANU) que tiene una fuerte afinidad de unión al ARN (es decir, al producto de transcripción dirigido) está dispuesto en ambos extremos de esta primera cadena, una cadena compuesta de este tipo promueve de este modo la escisión del ARN diana por la ARNasa H. El "ADN que

5 tiene una longitud de cadena de cuatro" no se limita sin embargo solo a los nucleótidos de ADN. Se contempla que la primera cadena de ácido nucleico comprenda al menos 4 nucleótidos de ADN o nucleótidos de ADN modificados consecutivos que sean reconocidos por la ARNasa H cuando la primera cadena de ácido nucleico se hibride con un producto de transcripción. Desde el punto de vista de que el efecto no codificante que se produce como resultado de la formación del heterodúplex con el producto de transcripción seleccionado es excelente, la inclusión opcional de

10 análogos de nucleótidos de acuerdo con determinadas realizaciones en regiones que comprenden un ácido nucleico modificado dispuesto en el lado 5' y el lado 3' de la región que comprende al menos cuatro nucleótidos de ADN o nucleótidos de ADN modificados consecutivos que son reconocidos por la ARNasa H cuando la primera cadena de ácido nucleico se hibrida con un producto de transcripción, es deseable. El análogo de nucleótido puede ser un ANU, tal como, por ejemplo, ANB.

15 La segunda cadena de ácido nucleico es un ácido nucleico complementario de la primera cadena de ácido nucleico descrita anteriormente. No es necesario que la secuencia de bases de la segunda cadena de ácido nucleico y la secuencia de bases de la primera cadena de ácido nucleico sean perfectamente complementarias entre sí y las secuencias de bases pueden tener una complementariedad de al menos el 70 % o más, preferentemente del 80 % o más y más preferentemente del 90 % o más (por ejemplo, del 95 %, del 96 %, del 97 %, del 98 %, del 99 % o más).

La segunda cadena de ácido nucleico en la invención (i) comprende al menos 4 nucleótidos de ARN consecutivos y (ii) comprende adicionalmente una región ala 5' de uno o más nucleótidos fosforotioados o análogos de nucleótidos fosforotioados ubicados en posición 5' con respecto a los al menos 4 nucleótidos de ARN consecutivos y que tiene

25 un efecto de supresión de la descomposición por enzimas, en la que dichos análogos de nucleótidos son nucleótidos unidos y/o una región ala 3' de uno o más nucleótidos fosforotioados o análogos de nucleótidos fosforotioados ubicados en posición 3' con respecto a los al menos 4 nucleótidos de ARN consecutivos y un efecto de la supresión de la descomposición por enzimas, en la que dichos análogos de nucleótidos son nucleótidos unidos, en la que los al menos 4 nucleótidos de ARN consecutivos son escindidos por ARNasa H cuando la segunda cadena de ácido

30 nucleico está hibrida con la primera cadena de ácido nucleico y en la que la segunda cadena de ácido nucleico comprende adicionalmente un resto funcional que tiene una función de entrega dirigida.

La segunda cadena de ácido nucleico es un oligonucleótido que comprende al menos un tipo de ácido nucleico seleccionado entre ARN, ADN, ANP (ácido nucleico peptídico) y ANU (por ejemplo, ANB). Más específicamente, la

35 segunda cadena comprende

- (i) un nucleótido de ARN y opcionalmente un análogo de nucleótido y opcionalmente un nucleótido de ADN; o
- (ii) un nucleótido de ADN y/o un análogo de nucleótido; o
- (iii) nucleótidos de ANP.

40 La expresión "nucleótidos de ARN y opcionalmente análogos de nucleótidos y opcionalmente un nucleótido de ADN" significa que la segunda cadena incluye nucleótidos de ARN y opcionalmente puede incluir análogos de nucleótidos en la cadena y opcionalmente puede incluir nucleótidos de ADN en la cadena. La expresión "nucleótidos de ADN y/o análogos de nucleótidos" significa que la segunda cadena puede incluir nucleótidos de ADN o análogos de nucleótidos o puede incluir tanto nucleótidos de ADN como análogos de nucleótidos. La expresión "nucleótidos de

45 ANP" significa que la segunda cadena puede estar compuesta de nucleótidos de ANP.

Sin embargo, como se describirá en los ejemplos a continuación, desde el punto de vista de que cuando el complejo de ácido nucleico bicatenario de determinadas realizaciones es reconocido por la ARNasa H en la célula y la

50 segunda cadena de ácido nucleico se descompone, el efecto no codificante de la primera cadena de ácido nucleico se presenta fácilmente, la segunda cadena de ácido nucleico comprende nucleótidos de ARN. Además, desde el punto de vista de que una molécula funcional tal como un péptido puede unirse fácilmente al complejo de ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones, la segunda cadena de ácido nucleico es un ANP.

55 Como se usa en el presente documento, "nucleótido de ARN" significa un nucleótido de ARN que se produce de forma natural o un nucleótido de ARN con una subunidad de base, azúcar o enlace fosfato modificada. Una subunidad de base, azúcar o enlace de fosfato modificada es aquella en la que se ha añadido o sustituido un solo sustituyente en una subunidad y la subunidad en su totalidad no se ha reemplazado con un grupo químico diferente.

60 Con respecto a la segunda cadena de ácido nucleico, una porción o la totalidad del ácido nucleico puede ser un nucleótido modificado, desde el punto de vista de que tenga una alta resistencia a una nucleasa tal como una ribonucleasa (ARNasa). Los ejemplos de dicha modificación incluyen 5-metilación, 5-fluoración, 5-bromación, 5-yodación y N4-metilación de citosina; 5-desmetilación, 5-fluoración, 5-bromación y 5-yodación de timidina; N6-metilación y 8-bromación de adenina; N2-metilación y 8-bromación de guanina; fosforotioación, metilfosfonación, metilfosfonación quiral, fosforoditioación, fosforilación, 2'-O-metilación, 2'-metoxietilo (MOE), 2'-aminopropilo (AP) y 2'-fluoración. Además, también se contempla un nucleótido de ARN con una base de timidina

65

sustituida por una base de uracilo. Sin embargo, desde el punto de vista de que tenga una farmacocinética excelente, se usa la fosforilación. Además, dicha modificación puede realizarse de manera que el mismo ácido nucleico pueda someterse a varias modificaciones en combinación. Por ejemplo, como se usa en los ejemplos que de describen a continuación, el mismo ARN puede someterse a fosforilación y 2'-O-metilación para proporcionar

5 resistencia a la escisión enzimática. Sin embargo, cuando se espera o se desea que un ARN nucleótido sea escindido por la ARNasa H, entonces solo puede aplicarse fosforilación o 2'-O-metilación.

Existen realizaciones adecuadas del número de análogos de nucleótidos y la posición de modificación con respecto a la segunda cadena de ácido nucleico, puesto que el número y la posición de modificación pueden afectar al efecto no codificante y similares proporcionados por el complejo de ácido nucleico bicatenario en determinadas realizaciones. Puesto que estas realizaciones adecuadas pueden variar con el tipo, secuencia y similares del ácido nucleico que se ha de modificar, puede depender de los casos, pero el tipo, la secuencia y similares pueden caracterizarse midiendo el efecto no codificante que posee el ácido nucleico bicatenario después de la modificación de la misma manera que en el caso de la primera cadena de ácido nucleico descrita anteriormente. De acuerdo con

10 una realización adecuada de este tipo, desde el punto de vista de que mientras la descomposición de una ribonucleasa como la ARNasa A se suprime hasta que la segunda cadena de ácido nucleico se administra al núcleo de una célula particular, la segunda cadena de ácido nucleico puede presentar fácilmente el efecto no codificante al descomponerse por la ARNasa H en la célula particular, la segunda cadena de ácido nucleico es un ARN, una región complementaria con la región de la primera cadena de ácido nucleico que comprende un análogo de nucleótido (es decir, la región ala 5' y/o la región ala 3') es un ácido nucleico modificado o es un análogo de nucleótido y la modificación o el análogo tiene el efecto de supresión de la descomposición por enzimas, tal como una ribonucleasa. De acuerdo con determinadas realizaciones, la modificación es 2'-O-metilación y/o fosforilación del ARN. Además, en el presente documento, puede modificarse la región completa que es complementaria con la región de la primera cadena de ácido nucleico que comprende un análogo de nucleótido o puede modificarse una

15 porción de la región que es complementaria con la región que comprende un ácido nucleico modificado de la primera cadena de ácido nucleico. Además, la región que se modifica puede ser más larga que la región que comprende un ácido nucleico modificado de la primera cadena de ácido nucleico o puede ser más corta, siempre que la región que se modifique comprenda esa porción.

En el complejo de ácido nucleico bicatenario de la invención, un resto funcional está unido a la segunda cadena de ácido nucleico. El enlace entre la segunda cadena de ácido nucleico y el resto funcional puede ser un enlace directo o puede ser un enlace indirecto mediado por otro material. Sin embargo, en determinadas realizaciones, es preferible que un resto funcional esté unido directamente a la segunda cadena de ácido nucleico mediante enlace covalente, enlace iónico, enlace de hidrógeno o similares y desde el punto de vista de que puede obtenerse un

20 enlace más estable, se prefiere más el enlace covalente.

No existen limitaciones particulares en la estructura del "resto funcional" de acuerdo con determinadas realizaciones, siempre que transmita la función deseada al complejo de ácido nucleico bicatenario y/o la cadena a la que está unido. La función deseada es una función de entrega.

25

Además, desde el punto de vista de la entrega de la primera cadena de ácido nucleico a un sitio diana con alta especificidad y alta eficiencia y suprimiendo de este modo la expresión de un gen diana por el ácido nucleico pertinente, es preferible que una molécula que tenga una actividad de entregar el complejo de ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones a un "sitio diana" dentro del cuerpo, esté unida como un resto funcional a la

30 segunda cadena de ácido nucleico.

El resto que tiene una "función de entrega dirigida" puede ser, por ejemplo, un lípido, desde el punto de vista de que sea capaz de entregar el complejo de ácido nucleico bicatenario de determinadas realizaciones al hígado o similares con alta especificidad y alta eficiencia. Los ejemplos de dicho lípido incluyen lípidos tales como colesterol y ácidos grasos (por ejemplo, vitamina E (tocoferoles, tocotrienoles), vitamina A y vitamina D); vitaminas solubles en lípidos tales como la vitamina K (por ejemplo, acilcarnitina); metabolitos intermedios tales como acil-CoA; glucolípidos, glicéridos y derivados de los mismos. Sin embargo, entre estos, desde el punto de vista de que tenga una mayor seguridad, en determinadas realizaciones, se usan el colesterol y la vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles). Además, desde el punto de vista de que sea capaz de entregar el complejo de ácido nucleico bicatenario de determinadas realizaciones al cerebro con alta especificidad y alta eficiencia, los ejemplos del "resto funcional" de acuerdo con determinadas realizaciones incluyen azúcares (por ejemplo, glucosa y sacarosa). Además, desde el punto de vista de que sea capaz de entregar el complejo de ácido nucleico bicatenario de determinadas realizaciones a diversos órganos con alta especificidad y alta eficiencia mediante la unión a las diversas proteínas presentes en la superficie celular de los diversos órganos, os ejemplos del "resto funcional" de acuerdo con determinadas realizaciones incluyen péptidos o proteínas tales como ligandos de receptores y anticuerpos y/o fragmentos de los mismos.

35

40

45

Con respecto al complejo de ácido nucleico bicatenario de determinadas realizaciones, la longitud de la cadena de la primera cadena de ácido nucleico y la longitud de la cadena de la segunda cadena de ácido nucleico pueden ser idénticas o pueden ser diferentes. Como el complejo de ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones en las que la primera y la segunda cadena de ácido nucleico tienen la misma longitud de cadena, por ejemplo, los ácidos

50

55

60

nucleicos bicatenarios ilustrados en la FIG. 3 son un ejemplo de dichas realizaciones.

Además, como el ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones en las que la primera y la segunda cadena de ácido nucleico tienen diferentes longitudes de cadena, por ejemplo, los ácidos nucleicos bicatenarios ilustrados en la FIG. 4 y la FIG. 5 son ejemplos de dichas realizaciones. Es decir, algunas realizaciones pueden proporcionar un ácido nucleico bicatenario que comprenda adicionalmente una tercera cadena de ácido nucleico además de la primera y segunda cadenas de ácido nucleico descritas anteriormente.

La tercera cadena de ácido nucleico es complementaria con una región de cualquiera que sea la más larga entre la primera y la segunda cadena de ácido nucleico, cuya región sobresale con respecto al otro ácido nucleico.

La tercera cadena de ácido nucleico de acuerdo con algunas realizaciones puede servir como un oligonucleótido no codificante, como la primera cadena de ácido nucleico. Como tal, la tercera cadena puede dirigirse a la misma secuencia o a una secuencia diferente de la primera cadena. Por tanto, la estructura y la composición de nucleótidos analizadas con respecto a la primera cadena pueden aplicarse de forma similar a la estructura y composición de la tercera cadena. Además, de forma similar a la segunda cadena de ácido nucleico, al hacer que los restos funcionales descritos anteriormente se unan directa o indirectamente a la tercera cadena de ácido nucleico, pueden transmitirse diversas funciones a la tercera cadena de ácido nucleico, por ejemplo, puede hacerse que actúe como agente de entrega del complejo.

Por ejemplo, como se ilustra en la FIG. 4, cuando se usa un ANP como la tercera cadena de ácido nucleico, puesto que el ANP y una proteína (aminoácido) pueden unirse mediante un enlace peptídico, puede prepararse fácilmente un complejo de ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones que tiene un resto funcional que comprende una proteína o similares. Además, puesto que el ANP del ácido nucleico bicatenario ilustrado en la FIG. 4 tiene una longitud de cadena más corta que la del ARN del ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones ilustradas en la parte inferior de la FIG. 3 y no hay necesidad de hacer coincidir el ANP con la secuencia de bases del gen diana, puede conseguirse la producción en masa. En general, puesto que la síntesis de un ANP es un proceso caro, el ácido nucleico bicatenario ilustrado en la FIG. 4 es una realización preferida desde el punto de vista de que puede proporcionarse un ácido nucleico bicatenario relativamente barato. En particular, puesto que el ácido nucleico bicatenario ilustrado en la parte inferior de la FIG. 4 tiene no solo un primer resto funcional que comprende una proteína o similar, sino también un segundo resto funcional, que puede comprender un lípido o similar, el complejo de ácido nucleico bicatenario puede entregarse a un sitio diana con mayor especificidad y mayor eficiencia.

Además, en general, cuando un compuesto se administra por vía enteral (administración por vía oral o similar), el compuesto difunde en el cuerpo no a través de los vasos sanguíneos sino a través de los vasos linfáticos. Sin embargo, para alcanzar los vasos linfáticos, el peso molecular de los compuestos generalmente debería ser de 11.000 Dalton a 17.000 Dalton o más. Además, puesto que un compuesto administrado por vía enteral se expone a ARNasa A en el tubo intestinal, es normalmente preferible que un fármaco de ácido nucleico que contenga ARN tenga todas las porciones de ARN modificadas por 2'-O-metilación o similares. Por tanto, el ácido nucleico bicatenario ilustrado en la FIG. 5, que tiene un peso molecular de aproximadamente 18.000 Dalton y tiene todas las partes de ARN 2'-O-metiladas, puede usarse adecuadamente para la administración parenteral. Además, el ácido nucleico bicatenario ilustrado en la parte inferior de la FIG. 5 tiene una cadena de ADN (tercera cadena de ácido nucleico) y un ácido nucleico de bucle de horquilla (preferentemente, un ácido nucleico que comprende de 4 a 9 bases) que une la cadena de ADN y una cadena complementaria que comprende ARN (segunda cadena de ácido nucleico).

Por tanto, se han descrito algunas realizaciones de ejemplo adecuadas del complejo de ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones, pero el ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones no pretende limitarse a las realizaciones de ejemplo descritas anteriormente. Además, cualquier experto habitual en la materia puede producir la primera cadena de ácido nucleico, la segunda cadena de ácido nucleico y la tercera cadena de ácido nucleico de acuerdo con algunas realizaciones seleccionando apropiadamente un método conocido. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de acuerdo con algunas realizaciones pueden producirse diseñando las secuencias de bases respectivas de los ácidos nucleicos sobre la base de la información de la secuencia de bases del producto de transcripción dirigido (o, en algunos casos, la secuencia de bases de un gen dirigido), sintetizando los ácidos nucleicos usando un sintetizador de ácidos nucleicos automatizado disponible en el mercado (productos de Applied Biosystems, Inc.; productos de Beckman Coulter, Inc. y similares) y purificando posteriormente los oligonucleótidos resultantes usando una columna de fase inversa o similar. Los ácidos nucleicos producidos de esta manera se mezclan en una solución tampón apropiada y se desnaturalizan a aproximadamente 90 °C a 98 °C durante varios minutos (por ejemplo, durante 5 minutos), posteriormente los ácidos nucleicos se hibridan a aproximadamente 30 °C a 70 °C durante aproximadamente 1 a 8 horas y, por tanto, puede producirse el complejo de ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones. Además, un complejo de ácido nucleico bicatenario al que se une un resto funcional puede producirse usando una especie de ácido nucleico al que se ha unido un resto funcional por adelantado y realizando la síntesis, purificación e hibridación como se ha descrito anteriormente. Se conocen bien numerosos métodos para unir restos funcionales a ácidos nucleicos en la técnica.

Por tanto, se han descrito realizaciones de ejemplo adecuadas de los ácidos nucleicos bicatenarios de la presente invención, pero como se desvelará en los siguientes ejemplos, la "segunda cadena de ácido nucleico" de acuerdo con algunas realizaciones es excelente desde el punto de vista de que un ácido nucleico no codificante puede entregarse a un sitio diana con alta eficiencia, sin causar una disminución en el efecto no codificante. Por tanto, los ácidos nucleicos bicatenarios de algunas realizaciones no pretenden limitarse a las realizaciones de ejemplo descritas anteriormente. También se desvela un aspecto que incluye el siguiente ácido nucleico no codificante en lugar de la primera cadena de ácido nucleico descrita anteriormente:

Un complejo de ácido nucleico bicatenario que tiene una actividad de supresión de la expresión de un gen diana mediante el efecto no codificante, el complejo de ácido nucleico bicatenario que comprende (i) un ácido nucleico no codificante que es complementario al producto de transcripción del gen diana, en el que el ácido nucleico no comprende ADN y (ii) un ácido nucleico que es complementario al ácido nucleico anterior (i).

Es decir, en determinados aspectos de la divulgación, un ácido nucleico no codificante tiene un efecto no codificante no dependiente de la ARNasa H. El "efecto no codificante no dependiente de la ARNasa H" significa una actividad de supresión de la expresión de un gen diana que se produce como resultado de la inhibición de la traducción o un efecto modificador de la función de corte y empalme tal como el salto de exón cuando un producto de transcripción del gen diana (cadena codificante de ARN) y una cadena de ácido nucleico que es complementaria con una secuencia parcial del producto de transcripción se hibridan (véase la descripción de la parte superior fuera del área rodeada de líneas discontinuas en la FIG. 1).

El "ácido nucleico que no comprende ADN" significa un ácido nucleico no codificante que no comprende ADN natural ni ADN modificado y un ejemplo del mismo puede ser un ANP o un ácido nucleico que comprende ácido morfolino nucleico. Además, con respecto al "ácido nucleico que no comprende ADN", de forma similar a la primera cadena de ácido nucleico o la segunda cadena de ácido nucleico, una porción o la totalidad del ácido nucleico puede estar compuesta de nucleótidos modificados, desde el punto de vista de que la resistencia a las nucleasas es alta. Los ejemplos de dicha modificación incluyen los descritos anteriormente y el mismo ácido nucleico puede someterse a varios tipos de modificaciones en combinación. Además, pueden caracterizarse aspectos preferidos relacionados con el número de ácidos nucleicos modificados y la posición de modificación midiendo el efecto no codificante que posee el ácido nucleico bicatenario después de la modificación, como en el caso de la primera cadena de ácido nucleico descrita anteriormente.

No es necesario que la secuencia de bases del "ácido nucleico que no comprende ADN" y la secuencia de bases de un ácido nucleico que es complementario con el ácido nucleico o la secuencia de bases del producto de transcripción de un gen diana sean perfectamente complementarias entre sí y las secuencias de bases pueden tener una complementariedad de al menos el 70 % o más, preferentemente del 80 % o más y más preferentemente del 90 % o más (por ejemplo, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o más alta).

No existen limitaciones particulares en la longitud de la cadena del "ácido nucleico que no comprende ADN", pero la longitud de la cadena es como se ha descrito anteriormente con respecto al primer ácido nucleico y es generalmente de 8 a 35 bases, de 10 a 35 bases, de 12 a 25 bases o de 13 a 20 bases.

El "ácido nucleico que es complementario a un ácido nucleico que no comprende ADN" de acuerdo con algunos aspectos es el mismo que la segunda cadena de ácido nucleico descrita anteriormente. Además, en el caso en que la longitud de la cadena del ácido nucleico que no comprende el ADN y la longitud de la cadena del ácido nucleico que es complementario al ácido nucleico sean diferentes, este aspecto también puede comprender una tercera cadena de ácido nucleico. Además, este aspecto también puede tener los restos funcionales descritos anteriormente unidos al "ácido nucleico que es complementario al ácido nucleico que no comprende ADN" y/o la tercera cadena de ácido nucleico.

Composición para suprimir la expresión del gen diana o el nivel del producto de transcripción dirigido por medio del efecto no codificante.

El complejo de ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones puede entregarse a un sitio diana con alta especificidad y alta eficiencia y puede suprimir muy eficazmente la expresión de un gen diana o el nivel de un producto de transcripción, como se desvelará en los ejemplos que se describen a continuación. Por tanto, algunas realizaciones pueden proporcionar una composición que contenga el complejo de ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones como principio activo y tiene por objeto suprimir, por ejemplo, la expresión de un gen diana mediante un efecto no codificante. En particular, el complejo de ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones puede proporcionar una alta eficacia incluso cuando se administra a una concentración baja y mediante la supresión de la distribución del ácido nucleico no codificante en órganos distintos del área dirigida a la entrega, los efectos secundarios adversos pueden reducirse. Por tanto, algunas realizaciones también pueden proporcionar una composición farmacéutica que tiene por objeto tratar y prevenir enfermedades asociadas a, por ejemplo, un aumento de la expresión de un gen diana, tales como enfermedades metabólicas, tumores e infecciones.

La composición que contiene el complejo de ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones puede formularse mediante métodos farmacéuticos conocidos. Por ejemplo, la composición puede usarse por vía enteral (por vía oral

o similar) en forma de cápsulas, comprimidos, píldoras, líquidos, polvos, gránulos, gránulos finos, agentes de recubrimiento pelicular, microgránulos, trociscos, agentes sublinguales, peptizantes, preparaciones bucales, pastas, jarabes, suspensiones, elixires, emulsiones, agentes de recubrimiento, pomadas, parches, cataplasmas, preparaciones transdérmicas, lociones, inhaladores, aerosoles, inyecciones y supositorios, o por vía no enteral.

5 Con respecto a la formulación de estas preparaciones, pueden incorporarse apropiadamente vehículos farmacológicamente aceptables o vehículos aceptables como alimentos y bebidas, específicamente agua esterilizada, solución salina fisiológica, aceites vegetales, disolventes, bases, emulsionantes, agentes de suspensión, tensioactivos, agentes de ajuste del pH, estabilizadores, aromas, fragancias, excipientes, vehículos, antisépticos, aglutinantes, diluyentes, agentes isotonzantes, agentes calmantes, agentes diluyentes, disgregantes, agentes tamponantes, agentes de recubrimiento, agentes lubricantes, colorantes, agentes edulcorantes, agentes espesantes, correctores, adyuvantes de disolución y otros aditivos.

15 Con motivo de la formulación, como se describe en el documento no de patente 1, el complejo de ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones a las que se une un lípido como resto funcional puede provocar que se forme un complejo con una lipoproteína, tal como un quilomicrón o remanente de quilomicrones. Además, desde el punto de vista de aumentar la eficiencia de la administración enteral, también pueden usarse, además de las lipoproteínas, complejos (micelas mixtas y emulsiones) con sustancias que tienen una acción potenciadora de la permeabilidad epitelial de la mucosa colónica (por ejemplo, ácidos grasos de cadena media, ácidos grasos insaturados de cadena larga o derivados de los mismos) (sales, formas de éster o formas de éter) y tensioactivos (tensioactivos no iónicos y tensioactivos aniónicos).

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

30 La composición de algunas realizaciones puede usarse para animales incluyendo seres humanos como sujetos. Sin embargo, no existen limitaciones particulares en cuanto a los animales excluyendo a los seres humanos y diversos animales domésticos, aves domésticas, mascotas, animales de experimentación y similares pueden ser los sujetos de algunas realizaciones.

35 Cuando se administra o ingiere la composición de algunas realizaciones, la cantidad de administración o la cantidad de ingestión pueden seleccionarse de manera apropiada de acuerdo con la edad, el peso corporal, los síntomas y el estado de salud del sujeto, del tipo de composición (producto farmacéutico, alimento y bebida o similar) y similares. Sin embargo, la cantidad eficaz de ingestión de la composición de acuerdo con determinadas realizaciones es de 0,001 mg/kg/día a 50 mg/kg/día del complejo de ácido nucleico bicatenario.

40 El complejo de ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones puede entregarse a un sitio diana con alta especificidad y alta eficiencia y puede suprimir la expresión de un gen diana o el nivel de un producto de transcripción de manera muy eficaz, como se describirá en los Ejemplos a continuación. Por tanto, se desvela un método para administrar el complejo de ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones a un sujeto y suprimir la expresión de un gen diana o nivel de producto de transcripción por medio de un efecto no codificante. Además, también se desvela un método para tratar o prevenir diversas enfermedades que se asocian, por ejemplo, a la expresión incrementada de genes diana, mediante la administración de la composición de algunas realizaciones a un sujeto.

[Ejemplos]

50 En lo sucesivo en el presente documento, se describirán algunas realizaciones más específicamente a modo de Ejemplos y Ejemplos comparativos, pero las realizaciones no tienen por objeto limitarse a los siguientes ejemplos. Mientras tanto, los ratones suministrados a los experimentos que se describen a continuación eran ratones ICR hembra de 4 a 6 semanas de edad con pesos corporales de 20 a 25 g. A menos que se indique lo contrario, todos los experimentos con ratones se realizaron con $n = 3$ a 4. Además, el ANU utilizado en los presentes Ejemplos fue un ANB representado por la fórmula (1) anterior. Además, las secuencias descritas en el Ejemplo comparativo 1 y los Ejemplos 1-15 se presentan en las Tablas 1-3.

[Tabla 1]

SEQ ID	SECUENCIA	SÍMBOLO	Cadena	Ej.
SEQ ID NO: 1	5'-G ₂ C ₂ A ₂ T ₂ G ₂ G ₂ T ₂ A ₂ T ₂ C ₂ -3'	May: ANB; Min: ADN; S: fosforotioato	NC/12	ECl: tiene dos formas, 5'Cy3 y 5'Cy3/3'Col; 1 (sencillo) 2 3 7 (sencillo) 8 (sencillo) 9 (sencillo)
SEQ ID NO: 2	5'-GAAUCCAAUGC-3'	May: ARN;	c/12	1: {0} 2
SEQ ID NO: 3	5'-g ₂ a ₂ u ₂ u ₂ u ₂ g ₂ c ₂ c ₂ a ₂ u ₂ g ₂ c-3'	May: ARN; Min: OMe-ARN; S: fosforotioato	c/12	1: {G}; 2 3 (tiene dos formas, sencillo y 5'Toc) 7
SEQ ID NO: 4	5'-g ₂ a ₂ a ₂ u ₂ a ₂ c ₂ c ₂ a ₂ u ₂ g ₂ c-3'	May: ARN; Min: OMe-ARN; S: fosforotioato	c/12	1: {m/a} 2
SEQ ID NO: 5	5'-G ₂ C ₂ A ₂ T ₂ G ₂ G ₂ T ₂ A ₂ T ₂ C ₂ A-3'	May: ANB; Min: ADN; S: fosforotioato	NC/13	3 4 5 6 10
SEQ ID NO: 6	5'-A ₂ C ₂ A ₂ T ₂ G ₂ G ₂ T ₂ A ₂ T ₂ C ₂ A-3'	May: ANB; Min: ADN; S: fosforotioato	NC/14	3
SEQ ID NO: 7	5'-u ₂ g ₂ a ₂ u ₂ u ₂ u ₂ g ₂ c-3'	May: ARN; Min: OMe-ARN; S: fosforotioato	c/13	3 (tiene dos formas, sencillo y 5'Toc) 4 (solamente forma 5'Toc) 5 (solamente forma 5'Toc) 6 (sencillo y 5'Toc) 10 (solamente forma 5'Toc) 11 (solamente forma 5'Toc) 15 (solamente forma 5'Toc)
SEQ ID NO: 8	5'-u ₂ g ₂ a ₂ u ₂ u ₂ u ₂ g ₂ c-3'	May: ARN; Min: OMe-ARN; S: fosforotioato	c/14	3 (tiene dos formas, sencillo y 5'Toc)

[Tabla 2]

SEQ ID	SECUENCIA	SÍMBOLO	Cadena	Ej.
SEQ ID NO: 9	5'-j ₂ a ₂ u ₂ u ₂ u ₂ g ₂ c-3'	May: ARN; Inf: OMe-ARN; S: fosforotioato	c/12	7 (ARNc(G)-OM)
SEQ ID NO: 10	5'-u ₂ u ₂ c ₂ c ₂ c ₂ c ₂ c ₂ g ₂ a ₂ u ₂ u ₂ g ₂ c-3'	May: ARN; Inf: OMe-ARN; S: fosforotioato	c/21	8
SEQ ID NO: 11	N'- <u>TCCTGGAA</u> -C'	Subr: ANP	3 ^a /5	8
SEQ ID NO: 12	N'- <u>GAUACCAUGC</u> -C'	Subr: ANP	c/12	9
SEQ ID NO: 13	N'- <u>GAUACCAUC</u> -C'	Subr: ANP	c/10	9
SEQ ID NO: 14	N'- <u>GAUACCA</u> -C'	Subr: ANP	c/3	9
SEQ ID NO: 15	5'-u ₂ g ₂ a ₂ u ₂ u ₂ u ₂ g ₂ c-3'	May: ARN; Inf: ANB; S: fosforotioato	c/13	10
SEQ ID NO: 16	5'-u ₂ g ₂ a ₂ u ₂ u ₂ u ₂ g ₂ c-3'	May: ARN; Inf: ANB; S: fosforotioato	c/13	10
SEQ ID NO: 17	5'-u ₂ g ₂ a ₂ u ₂ u ₂ u ₂ g ₂ c-3'	May: ARN; Inf: OMe-ARN; S: fosforotioato	c/13	10
SEQ ID NO: 18	5'-u ₂ g ₂ a ₂ u ₂ u ₂ u ₂ g ₂ c-3'	May: ARN; Inf: OMe-ARN; S: fosforotioato	c/31	11

(fabricado por Roche Applied Bioscience Corp.). Mientras tanto, los cebadores utilizados en la RT-PCR cuantitativa se diseñaron y produjeron por Life Technologies Corp. Basándose en los diversos números de genes. Además, las condiciones de temperatura y tiempo fueron las siguientes: 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 segundo a 72 °C se designaron como un ciclo y se realizaron 40 ciclos de las mismas. Basándose en los resultados de la RT-PCR cuantitativa obtenida de este modo, se calcularon respectivamente la cantidad de expresión de ApoBm/cantidad de expresión de GAPDHm (gen convencional interno) y los resultados de cálculo para el grupo de control negativo y los resultados de cálculo para los grupos a los que se les administró ONC se compararon y evaluaron mediante un ensayo t. Los resultados obtenidos de este modo se presentan en la FIG. 8.

Como es obvio a partir de los resultados presentados en la FIG. 7, el oligómero con huecos de ANB/ADN al que se había unido directamente el colesterol se acumuló en el hígado en una cantidad mucho mayor que el oligómero con huecos de ANB/ADN sin el colesterol unido al mismo.

Sin embargo, como se presenta en la FIG. 8, se descubrió que cuando el colesterol se une directamente al oligómero con huecos de ANB/ADN y se usa, el efecto no codificante se pierde.

(Ejemplo 1)

Puesto que se descubrió que el efecto no codificante se altera cuando un resto funcional, tal como el colesterol, se une directamente al oligómero con huecos de ANB/ADN (cadena no codificante), los inventores concibieron el uso de un complejo de ácido nucleico bicatenario en el que la cadena complementaria con el ONC lleva un resto funcional para la entrega directa del ONC. La FIG. 9 ilustra esquemáticamente una realización de un complejo de este tipo.

Por ejemplo, en el caso del uso de una cadena de ARN como la cadena complementaria con un oligómero con huecos de ANB/ADN no codificante (ONC que comprende un ANB y un ADN) y de la unión adicional de un resto funcional al ARN, el complejo del ONC y la cadena de ARN complementaria (ARNc) se entrega específica y eficientemente al sitio diana mediante el resto funcional unido al ARNc. Adicionalmente, cuando el complejo se administra en el núcleo de la célula en el sitio diana, puesto que el ARNc es en sí mismo un hetero-oligonucleótido ARN-ADN, se cree que el ARNc es escindido por la ARNasa H presente en el núcleo, exponiendo de este modo el ONC como una cadena individual. Posteriormente, este ONC se une al ARNm del gen diana y forma un nuevo heterodúplex de ARN-ADN, en el que el ARNm se descompone por la ARNasa H para conseguir un efecto no codificante.

Es decir, los inventores concibieron que al realizar la escisión de un ARNc que tiene un resto funcional unido al mismo y la descomposición del ARNm de un gen diana mediante el uso de ARNasa H, puede entregarse un oligómero con huecos de ANB/ADN (ONC que comprende un ANB y un ADN) a un sitio diana con alta especificidad y alta eficiencia y la expresión del gen diana puede suprimirse de manera muy eficaz sin que el efecto no codificante del ONC sea inhibido por el resto funcional.

Después, con el fin de demostrar dicha concepción, los inventores produjeron en primer lugar un ADN bicatenario de un oligómero con huecos de ANB/ADN y un ARNc mediante el método que se describe a continuación y evaluaron las propiedades.

Como oligómero con huecos de ANB/ADN, se usó un Cy3-ONC producido de la misma manera que en el Ejemplo comparativo 1. Además, como ARNc, se prepararon tres estructuras de cadenas complementarias diferentes. Las tres estructuras se ilustran esquemáticamente en la FIG. 10. Una estructura comprende ARN convencional (ARN natural) solo (ARNc(o)), en una segunda estructura, dos bases cada una al final de la cadena de ARNc se modificaron químicamente (2'-O-metilada y fosforotioada) para que tuvieran resistencia a la ARNasa (ARNc(G)) y, en la tercera estructura, todas las bases en la cadena de ARNc se modificaron químicamente (2'-O-metiladas y fosforotioadas) para que fueran resistentes a la escisión por ARNasa (ARNc(m/s)). Las sondas se produjeron por encargo por Hokkaido System Science Co., Ltd. Las secuencias de las cadenas de ARNc fueron como se indica a continuación:

ARNc(o): 5'-GAAUACCAAUGC-3' (SEQ ID NO: 2)
 ARNc(G): 5'-g_sa_sAUACCAAU_sg_sc-3' (SEQ ID NO: 3)
 ARNc(m/s): 5'-g_sa_sa_su_sa_sc_sc_sa_sa_su_sg_sc-3' (SEQ ID NO: 4)

(Mayúsculas: ARN, minúsculas: 2'-OMe-ARN, s: enlaces fosforotioato entre los ácidos nucleicos)

Se mezclaron el oligómero de huecos de ANB/ADN y los respectivos ARNc en cantidades equimolares y las mezclas se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y después se mantuvieron calientes a 37 °C durante una hora para hidridar de este modo esta cadena de ácido nucleico y formar complejos de ácido nucleico bicatenario. Los ácidos nucleicos hibridados se almacenaron a 4 °C o en hielo.

Posteriormente, los Cy3-ONC que se habían hibridado con los respectivos ARNc y Cy3-ONC se aplicaron a un gel de acrilamida al 15 % en una cantidad de 100 pmol cada uno en términos de la cantidad de ANB y se realizó una electroforesis a 100 V durante una hora. Después de la electroforesis, se tomó una fotografía del gel directamente y después se tomó una fotografía con luz UV. Los resultados obtenidos de este modo se presentan en la FIG. 11A, B.

Además, los Cy3-ONC que se habían hibridado con los respectivos ARNc y los Cy3-ONC se trataron con ARNasa H, se sometieron a electroforesis como se ha descrito anteriormente y se tomó una fotografía del gel con iluminación UV. Los resultados obtenidos de este modo se presentan en la FIG. 12.

Los resultados presentados en la FIG. 11 demuestran que el producto obtenido mediante hibridación de Cy3-ONC y ARNc(o) juntos, el producto obtenido mediante hibridación de Cy3-ONC y ARNc(G) juntos y el producto obtenido mediante hibridación de Cy3-ONC y ARNc(m/s) juntos tenían todas tasas de migración más lentas en comparación con Cy3-ONC (Calle 1), que era un ONC monocatenario, lo que confirma que los productos hibridados formaron, respectivamente, ácidos nucleicos bicatenarios.

Además, aunque no se ilustra en los dibujos, una cadena complementaria que comprende ADN (ADNc) y Cy3-ONC se mezclaron y se hibridaron como se ha descrito anteriormente y el producto se analizó mediante electroforesis; sin embargo, el producto tenía la misma altura de banda que la de Cy3-ONC. Se confirmó que el ADNc y Cy3-ONC no pueden formar un ácido nucleico bicatenario en las condiciones empleadas. Al mismo tiempo, las secuencias y modificaciones de los ADNc que se evaluaron fueron las mismas que las de ARNc(o), ARNc(G) y ARNc(m/s), excepto porque el uracilo se cambió a timina (en lo sucesivo en el presente documento, igual).

Además, como es obvio a partir de los resultados ilustrados en la FIG. 12, aunque se aplicó un tratamiento con ARNasa H, el dúplex de Cy3-ONC y el ARNc(m/s) mantuvieron la estructura de ácido nucleico bicatenario. Por otro lado, puesto que el tratamiento de los dúplex de ARNc(o) y ARNc(G) produjo un producto que tenía la misma tasa de migración que la de Cy3-ONC, se confirmó que la cadena de ARN complementaria con estos dúplex se descompuso por la ARNasa H y, por tanto, los ácidos nucleicos Cy3-ONC monocatenarios se liberaron del dúplex y pudieron migrar como una cadena individual.

Posteriormente, además de la electroforesis descrita anteriormente, se evaluó el punto de fusión (Tf) de un ácido nucleico bicatenario compuesto por el oligómero con huecos de ANB/ADN y el ARNc mediante el método que se describe a continuación.

Se colocaron soluciones de muestra (100 µl) en las que las concentraciones finales se ajustaron a 100 mM para cloruro de sodio, 10 mM para una solución tampón de fosfato de sodio (pH 7,2) y 2 µM para las cadenas de oligonucleótidos respectivas, en un baño de agua hirviendo y las soluciones de muestra se enfriaron a temperatura ambiente durante 12 horas y se dejaron reposar durante 2 horas a 4 °C. En una corriente de gas nitrógeno, las soluciones de muestra se enfriaron a 5 °C y después de que las muestras se mantuviesen a 5 °C durante 15 minutos, se inició el análisis. Para el análisis del punto de fusión, la temperatura se aumentó a 90 °C a una velocidad de 0,5 °C/min y la absorbancia a 260 nm se representó en un intervalo de 0,5 °C. Los valores de Tf se calcularon mediante un método diferencial. La medición se realizó usando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1650PC. Los resultados obtenidos de este modo se presentan en la Tabla 4.

[Tabla 4]

Ácido nucleico	Modificación	Tf (°C)
ARNc	o	45,32
	G	47,65
	m/s	41,17
ADNc	o	37,51
	G	34,33
	m/s	26,45

Como se demuestra por los resultados presentados en la Tabla 4, la temperatura de fusión (Tf) de los dúplex formados entre el oligómero con huecos de ANB/ADN y las cadenas de ADNc fue inferior a la temperatura corporal en todos los casos. Por el contrario, la temperatura de fusión (Tf) del dúplex de oligómero con huecos de ANB/ADN y ARNc se mantuvo en el intervalo de 40 °C en todos los casos y, por tanto, se descubrió que los ácidos nucleicos bicatenarios pertinentes no experimentan la disociación a temperatura ambiente o la temperatura corporal.

(Ejemplo 2)

Una cadena complementaria que comprendía solo ARN convencional (ARNc(o)) (SEQ ID NO: 2); una cadena complementaria en la que todos los ARN se sometieron a modificación 2'-OME (2'-O-metilación) y unión a fosforotioato (conversión S) entre los ácidos nucleicos (ARNc(m/s)) (SEQ ID NO: 4); y una cadena complementaria en la que solo las dos bases de ARN terminales se sometieron a modificación 2'-OME y conversión S entre los

ácidos nucleicos y las 8 bases en el centro fueron ARN convencionales (ARNc(G)) (SEQ ID NO: 3) se proporcionaron de la misma manera que en el Ejemplo 1. Todas estas cadenas complementarias se hibridaron con el oligómero con huecos de ANB/ADN (SEQ ID NO: 1) y, por tanto, se produjeron ácidos nucleicos bicatenarios. El gen diana del oligómero con huecos de ANB/ADN fue el gen de la apolipoproteína B de rata (ApoBr). El ONC fue producido por encargo por Gene Design, Inc. con la síntesis.

El oligómero con huecos de ANB/ADN se transfectó solo y como parte de un complejo bicatenario con cada una de las cadenas de ARNc descritas anteriormente para sistemas de cultivo de células de hígado de rata (McA-RH7777), usando Lipofectamina 2000 (fabricada por Invitrogen, Inc.) de acuerdo con el protocolo de uso proporcionado con el reactivo. La concentración del oligómero con huecos que se añadió al medio en el momento de la transfección se estableció en 0,4 nM o 10 nM. Además, también se prepararon controles en los que no se añadieron cadenas de ácido nucleico a las células. Posteriormente, 24 horas después de la transfección, las células se recogieron usando Isogen y los ARNm se recogieron de acuerdo con el protocolo de uso del fabricante.

Las concentraciones de estos ARNm se midieron y los ADNc se sintetizaron a partir de determinadas cantidades de ARNm mediante el uso de SuperScript III de acuerdo con el protocolo del fabricante. Posteriormente, los ADNc producidos de este modo se usaron como moldes y se realizó una RT-PCR cuantitativa usando un sistema TaqMan. Al mismo tiempo, para los cebadores utilizados en la RT-PCR cuantitativa, aquellos diseñados y producidos por Life Technologies Corp. se basan en los diversos números de genes. Además, las condiciones de temperatura y tiempo fueron como se indica a continuación: 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 segundo a 72 °C se designaron como un ciclo y se realizaron 40 ciclos de las mismas. Basándose en los resultados de la RT-PCR cuantitativa obtenida de este modo, se calcularon respectivamente la cantidad de expresión de ApoBr/cantidad de expresión de GAPDHr (gen convencional interno) y los resultados del cálculo para el grupo de control y los resultados del cálculo para los grupos a los que se les administró ácido nucleico se compararon y se evaluaron mediante un ensayo t. Los resultados obtenidos de este modo se presentan en la FIG. 13. Además, para las transfecciones realizadas con una concentración de 10 nM, los resultados para los complejos de ácido nucleico bicatenario se normalizaron a los resultados para el oligómero con huecos de ANB/ADN (ONC) solo y se evaluaron mediante el ensayo t. Los resultados obtenidos de este modo se presentan en la FIG. 14.

Como se demuestra por los resultados presentados en la FIG. 13, el efecto no codificante del ácido nucleico bicatenario que comprendía el oligómero con huecos ANB/ADN y ARNc(o) (ANB/ARNc(o)) y el ácido nucleico bicatenario que comprendía el oligómero con huecos ANB/ADN y ARNc(G) (ANB/ARNc(G)) es similar al provocado por el oligómero con huecos de ANB/ADN (ONC-mc) cuando se administra a la concentración más baja de 0,4 nM. Sin embargo, como se muestra en la FIG. 14, cuando se administra a la concentración más alta de 10 nM, los resultados sugieren que los complejos bicatenarios en los que la cadena complementaria es susceptible de escisión (ANB/ARNc(o) y ANB/ARNc(G)) mejoran el efecto no codificante en aproximadamente el 20 % en comparación con el oligómero con huecos ONC administrado como una cadena individual.

Por tanto, se descubrió que incluso si un oligómero con huecos de ANB/ADN se hibridaba con una cadena complementaria que comprendía ARN para obtener un complejo de ácido nucleico bicatenario, se mantenía el efecto supresor de la expresión del gen diana (efecto no codificante) en la célula. Además, cuando se usó una cadena de ARN complementaria susceptible a ARNasa H, el efecto no codificante en la célula aumentó aún más. Se cree que un aumento de este tipo en el efecto no codificante es causado por la escisión del ARN de cadena complementaria en el núcleo.

(Ejemplo 3)

A continuación, como se ilustra esquemáticamente en la FIG. 15, se produjo una cadena de ARN complementaria en la que se unió tocoferol (Toc) al extremo 5' del ARNc(G) (Toc-ARNc(G)) y esto se hibridó con el oligómero con huecos de ANB/ADN (cadena no codificante). De este modo, se consiguió satisfactoriamente la unión indirecta de tocoferol a una cadena no codificante. La secuencia, la composición y la longitud de la cadena de los oligómeros con huecos de ANB/ADN y las cadenas complementarias (ARNc) utilizadas en los Ejemplos fueron como se indica a continuación.

Cadenas de oligómeros con huecos de ANB/ADN no codificantes

1. ONC de 12 monómeros: 5'-GCattggtatTC-3' (SEQ ID NO: 1)
2. ONC de 13 monómeros: 5'-GCattggtatTCA-3' (SEQ ID NO: 5)
3. ONC de 14 monómeros: 5'-AGCattggtatTCA-3' (SEQ ID NO: 6)

(Mayúsculas: ANB, minúsculas: ADN, entre los ácidos nucleicos: enlace fosforotioato en todos los sitios)
Cadenas complementarias

1. ARNc de 12 monómeros: 5'-g_sa_sAUACCAAU_sg_sc-3' (SEQ ID NO: 2)
2. ARNc de 13 monómeros: 5'-u_sg_sa_sAUACCAAU_sg_sc-3' (SEQ ID NO: 7)
3. ARNc de 14 monómeros: 5'-u_sg_sa_sAUACCAAU_sg_sc_su-3' (SEQ ID NO: 8)

(Mayúsculas: ARN, minúsculas: 2'-OMe-ARN, s: enlaces fosforotioato entre los ácidos nucleicos)

La unión entre tocoferol y el ARNc se realizó de acuerdo con una técnica conocida, preparando tocoferol amidita en la cual el grupo hidroxilo en la posición 6 del anillo de cromano del tocoferol se unió a la fosforamidita y después la tocoferol amidita se acopló al extremo 5' del ARN mediante métodos de acoplamiento convencionales.

A continuación, el oligómero con huecos de ANB/ADN (ONC-mc), el complejo de ácido nucleico bicatenario que comprendía un oligómero con huecos de ANB/ADN y ARNc(G) (ANB/ARNc(G)) y el complejo de ácido nucleico bicatenario que comprendía un oligómero con huecos de ANB/ADN y Toc-ARNc(G) (ANB/Toc-ARNc(G)), emparejando en cada complejo las cadenas que tenían la misma longitud de cadena de 12 bases, 13 bases o 14 bases, respectivamente, se inyectaron por vía intravenosa a un ratón en una cantidad de 0,75 mg/kg a través de la vena de la cola. Además, como grupo de control negativo, también se prepararon ratones en los que solo se inyectó PBS en lugar de ONC monocatenario o complejo de ácido nucleico bicatenario. Setenta y dos horas después de la inyección, los ratones se perfundieron con PBS y después los ratones se diseccionaron para extraer el hígado. Posteriormente, se realizaron la extracción de ARNm, la síntesis de ADNc y la RT-PCR cuantitativa mediante los mismos métodos que los métodos descritos en el Ejemplo comparativo 1, se calculó la cantidad de expresión de ApoBm/cantidad de expresión de GAPDHm (gen convencional interno) y se realizaron comparaciones entre el grupo administrado con PBS (PBS solo) y los grupos a los que se les administró un ácido nucleico. Los resultados obtenidos de este modo se presentan en la FIG. 16.

Como se ilustra en la FIG. 16, se descubrió que, mediante la unión de tocoferol a una cadena complementaria, ONC/Toc-ARNc(G) se entrega y se acumula en el hígado con alta especificidad y alta eficiencia y se demostró un efecto no codificante notable en comparación con ONC/ARNc(G). Como se muestra, el efecto presentado por el ONC/Toc-ARNc que tenía una longitud de cadena de 13 bases fue particularmente grande.

(Ejemplo 4)

La especificidad del complejo ONC/Toc-ARNc para su gen diana se evaluó mediante el mismo método que el descrito en el Ejemplo 3. Es decir, un ácido nucleico bicatenario que comprendía un oligómero con huecos de ANB/ADN que tenía una longitud de cadena de 13 bases y se preparó la cadena complementaria Toc-ARNc(G) (ONC/Toc-ARNc(G)) y se inyectó por vía intravenosa a un ratón y, mediante el uso del ADNc derivado del hígado obtenido del ratón, la expresión del gen diana (gen ApoBm) en el hígado y los genes de control endógenos (gen TTRm, gen SOD1 y gen GAPDHm) se evaluaron mediante PCR cuantitativa. Al mismo tiempo, con respecto a los cebadores utilizados en la RT-PCR cuantitativa, se usaron cebadores diseñados y producidos por Life Technologies Corp. basados en los diversos números de genes. Los resultados obtenidos de este modo se presentan en la FIG. 17.

Como se muestra en los resultados graficados en la FIG. 17, en el hígado del ratón al que se administró ONC/Toc-ARNc de 13 monómeros, se observó una disminución significativa en la expresión solo en el gen ApoBm, que era el producto de la transcripción del gen dirigido por el oligómero con huecos de ANB/ADN (ONC). Por tanto, se descubrió que el complejo de ácido nucleico bicatenario que comprende el oligómero con huecos de ANB/ADN y Toc-ARNc(G) tiene una alta especificidad para el gen diana.

(Ejemplo 5)

La dependencia de la dosis del efecto no codificante por ONC/Toc-ARNc(G) se evaluó mediante el mismo método que el método descrito en el Ejemplo 3 usando las cadenas de 13 monómeros. Es decir, el complejo bicatenario ONC/Toc-ARNc(G) de 13 monómeros se inyectó por vía intravenosa a ratones en una cantidad de 0 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,09 mg/kg o 0,75 mg/kg y, usando el ADNc derivado de hígado obtenido de los ratones, se evaluó la expresión del gen ApoBm mediante PCR cuantitativa. Los resultados obtenidos de este modo se presentan en la FIG. 18.

Como se muestra en los resultados ilustrados en la FIG. 18, se descubrió que el efecto no codificante de ONC/Toc-ARNc(G) presentó un efecto dependiente de la dosis. Además, a partir de estos resultados, se descubrió que la cantidad de ONC/Toc-ARNc(G) necesaria para suprimir la expresión del gen diana a la mitad (DE50) se calculó que era de aproximadamente 0,036 mg/kg, que es una concentración baja para conseguir una supresión del 50 %.

(Ejemplo 6)

La sostenibilidad del efecto no codificante por ONC/ARNc y ONC/Toc-ARNc se evaluó mediante el mismo método que el método descrito en el Ejemplo 3. Es decir, se inyectó un oligómero con huecos de ANB/ADN (ONC-mc), el ácido nucleico bicatenario que comprendía un oligómero con huecos de ANB/ADN y ARNc-G (ONC/ARNc(G)) o el ácido nucleico bicatenario que comprendía un oligómero con huecos de ANB/ADN y Toc-ARNc (ONC/Toc-ARNc(G)) por vía intravenosa en un ratón. La longitud de la cadena de todas las cadenas de ácido nucleico era de 13 bases. También se incluyeron controles en los que solo se inyectaron soluciones de PBS y ningún ácido nucleico. En un primer experimento, después de la inyección intravenosa, se extrajo el hígado después de 1 día, después de 3 días,

después de 7 días, después de 14 días y después de 28 días y mediante el uso del ADNc derivado del hígado, se evaluó la expresión del gen ApoBm por PCR cuantitativa. Los resultados obtenidos de este modo se presentan en la FIG. 19A. El experimento se repitió usando un control de solución de PBS, ANB monocatenario solo y el complejo bicatenario ONC/Toc-ARNc(G) y se evaluaron los niveles de expresión resultantes de ApoBm mediante el mismo método, después de 1 día, 3 días, 7 días, 14 días, 28 días y 42 días después de la inyección. Los resultados obtenidos se presentan en la FIG. 19B.

Como se muestra en los resultados ilustrados en la FIG. 19A, el efecto no codificante máximo se presentó el tercer día después de la administración en todos los ácidos nucleicos sometidos a ensayo. Además, se observó el mismo grado de efecto no codificante que se observó el primer día después de la administración incluso 7 días después de la administración. Además, se demostró que la expresión del gen diana se suprimió en un 60 % incluso 14 días después de la administración y en un 20 % incluso 28 días después de la administración, niveles de supresión que son particularmente significativos en comparación con el ONC de cadena única. En el segundo experimento, se observó la misma tendencia general, como se muestra en la FIG. 19B. El efecto no codificante máximo se observó 3 días después de la inyección y el nivel de supresión observado el primer día se mostró 7 días después de la inyección. Se observó que la supresión 14 y 28 días más tarde era del 80 % y del 50 %, respectivamente, y se observó un efecto medible incluso 42 días después de la inyección. Por tanto, también se descubrió que los ácidos nucleicos bicatenarios de algunas realizaciones tienen una alta sostenibilidad con respecto a el efecto no codificante.

(Ejemplo 7)

Se evaluó el efecto no codificante del complejo de ácido nucleico bicatenario de otra realización. La composición de las cadenas de ácido nucleico comparadas se ilustra esquemáticamente en la FIG. 20A. Mientras que los experimentos anteriores usaron ARNc(G) (SEQ ID NO: 3), que tiene una región central de bases de ARN naturales con regiones ala 5' y 3' fosforotioadas modificadas con 2'-OMe, en el presente documento, una cadena complementaria contenía las mismas a las 5' y 3' (dos bases terminales de ARN modificadas con 2'-OMe y enlaces fosforotioato), pero las 8 bases centrales eran ARN modificado con 2'-OMe con un enlace fosfodiéster natural entre los nucleótidos (ARNc(G)-OM) (SEQ ID NO: 9).

Es decir, se diseñaron y produjeron un oligómero con huecos de ANB/ADN de 12 monómeros contra la apolipoproteína B de ratón (ApoBm) y las cadenas complementarias de 12 monómeros que incorporaban bases de ARN modificadas en diferentes grados.

Cadena de oligómero con huecos de ANB/ADN no codificante ONC de 12 monómeros: 5'-GCattggtatTC-3' (SEQ ID NO: 1)

(Mayúsculas: ANB, minúsculas: ADN, enlaces fosforotioato entre los ácidos nucleicos en todos los sitios)
Cadenas complementarias

1. ARNc(G): 5'-g_sa_sAUACCAAU_sg_sc-3' (SEQ ID NO: 3)

2. ARNc(G)-OM: 5'-g_sa_sauaccaau_sg_sc-3' (SEQ ID NO: 9)

(Mayúsculas: ARN, minúsculas: 2'-OMe-ARN, s: enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos)

Con respecto al oligómero con huecos de ANB/ADN, se usó un producto producido por encargo de Gene Design, Inc. Con respecto a las cadenas complementarias, se usaron productos producidos por encargo por Hokkaido System Science Co., Ltd.

Adicionalmente, el oligómero con huecos de ANB/ADN y cada una de las cadenas complementarias se mezclaron en cantidades equimolares y la mezcla se calentó a 95 °C durante 5 minutos. Posteriormente, la mezcla se dejó reposar a una temperatura constante de 37 °C durante una hora para hibridar las cadenas. Además, si algún producto no se utilizó de inmediato, el producto se almacenó a 4 °C a partir de entonces.

Posteriormente, el ácido nucleico bicatenario que comprendía ANB de 12 monómeros y ARNc de 12 monómeros (ONC/ARNc(G)) o el ácido nucleico bicatenario que comprendía ANB de 12 monómeros y ARNc(G)-OM de 12 monómeros (ONC/ARNc(G)-OM) se inyectó por vía intravenosa a través de la vena de la cola de un ratón en una cantidad de 0,75 mg/kg. También se prepararon ratones de control que recibieron administraciones de PBS solamente. Tres días después de la inyección intravenosa, los ratones se perfundieron con PBS y después se extrajeron los hígados. Posteriormente, se realizaron la extracción de ARNm, la síntesis de ADNc y la RT-PCR cuantitativa mediante los mismos métodos que los métodos descritos en el Ejemplo comparativo 1, se calculó la cantidad de expresión de ApoBm/cantidad de expresión de GAPDHm (gen convencional interno) y se realizó una comparación entre el grupo al que se le administró solamente PBS (PBS solo) y los grupos a los que se les administró un ácido nucleico. Los resultados obtenidos de este modo se presentan en la FIG. 20B.

Como se demuestra por los resultados ilustrados en la FIG. 20B, incluso cuando se usó ARNc(G)-OM en lugar de ARNc(G) en la realización del complejo de ácido nucleico bicatenario de la presente invención, el efecto no codificante no se perdió.

Generalmente, cuando un producto farmacéutico se administra por vía enteral (administración oral o similar), puesto que el producto farmacéutico está expuesto a la ARNasa A en el tubo intestinal, es altamente preferible que un fármaco de ácido nucleico que contenga ARN tenga todas las partes relevantes de ARN modificadas por 2'-OMe o similar.

5 Por tanto, puesto que una cadena de ARN que está completamente modificada por 2'-OMe también puede usarse como una cadena complementaria para el ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones se descubrió que el ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones puede aplicarse a las realizaciones de administración enteral.

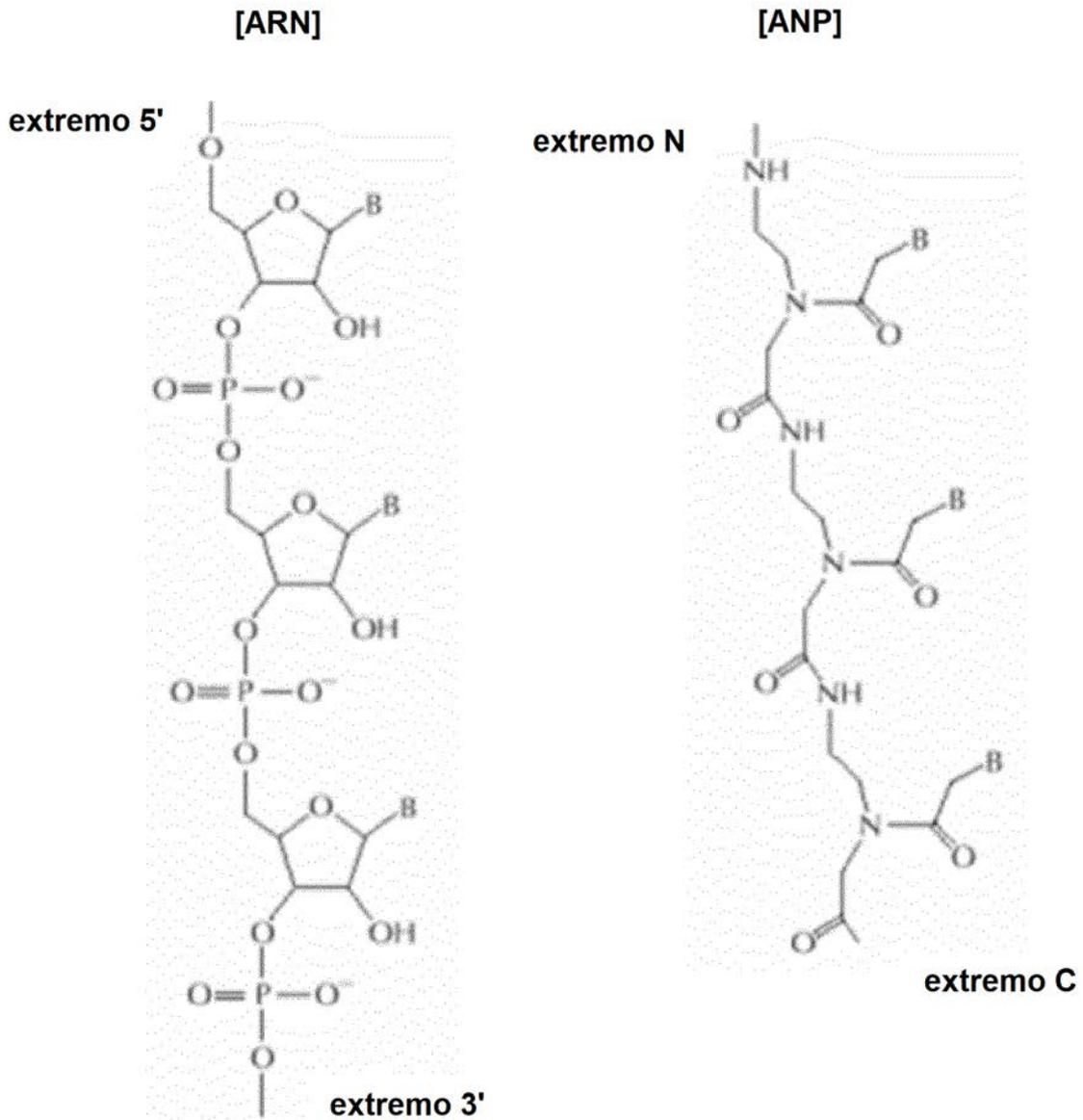
10 (Ejemplo 8)

Con respecto a un complejo de ácido nucleico bicatenario que comprendía un oligómero con huecos de ANB/ADN y Toc-ARNc, se descubrió que el ácido nucleico bicatenario tiene un alto efecto no codificante y puede entregarse al hígado o similar con alta especificidad y alta eficiencia.

15 Como tal, se sabe que cuando un lípido tal como el tocoferol se une, las propiedades de entrega al hígado o similar aumentan espectacularmente, pero la entrega a otros órganos es, por el contrario, difícil. Actualmente, un método para entregar a otros órganos que se usa de manera más eficaz es un método de utilización de un tipo de péptido diana que se une a diversas proteínas en la superficie celular de diversos órganos. En algunas realizaciones, se
20 contempla unir directamente un péptido como un resto de entrega a un ácido nucleico y de este modo utilizar un péptido dirigido en un complejo de ácido nucleico bicatenario que contiene una cadena complementaria que comprende ARN tal como se ha descrito anteriormente.

25 En otros aspectos, tal como se demuestra en el ejemplo que se describe a continuación, se usó un ácido nucleico peptídico (ANP), que puede unirse fácilmente a restos funcionales a base de péptidos o anticuerpos, como la cadena complementaria en el complejo de ácido nucleico bicatenario de algunos aspectos. Como se muestra en la siguiente fórmula, un ANP no tiene enlaces de fosfato como los ácidos nucleicos convencionales, sino que tiene la característica útil de tener enlaces peptídicos, de modo que se facilita la unión de un péptido a una cadena de ANP. Además, el ANP se caracteriza por tener un alto valor de Tf como en el caso de un ANB, por lo que no es probable
30 que la cadena doble se disocie, y por tener una fuerte resistencia a la escisión por ARNasa.

[Fórmula química 2]



Con respecto a la demostración, se contemplan varias realizaciones para unir un péptido de direccionamiento o similar (cadena de unión a péptido) a una cadena de ácido nucleico, que es parte del complejo de ácido nucleico bicatenario, pero donde el resto funcional peptídico de direccionamiento no está directamente unido a los oligómeros con huecos de ANB/ADN. Se muestran ejemplos de dichas realizaciones en las FIG. 21A-C. En la FIG. 21A, el resto funcional está unido a la cadena de ARN complementaria. En la FIG. 21B, se usan tres cadenas para formar el complejo de ácido nucleico bicatenario. En este caso, el ARN complementario se hibrida tanto con la cadena no codificante de ANB/ADN como con una cadena de ANP. La unión de un resto funcional a base de péptidos a las cadenas de ANP da como resultado un complejo que lleva un resto funcional de entrega, pero el resto no se une directamente al oligonucleótido no codificante. La tercera cadena no tiene que ser un ANP, pero podría comprender ADN, ARN y/o análogos de nucleótidos. En general, esta realización proporciona que un resto funcional puede asociarse indirectamente con la cadena no codificante usando una cadena complementaria que sea más larga que la cadena no codificante y preparando una tercera cadena que se acople a la cadena complementaria en la parte saliente. Además, como se muestra en la FIG. 21C, la cadena complementaria puede prepararse con un resto funcional. Los restos funcionales que se muestran en la FIG. 21C puede elegirse independientemente.

A continuación, basándose en este concepto, los inventores diseñaron y produjeron un oligómero con huecos de ANB/ADN contra la apolipoproteína B de ratón (ApoBm), una cadena complementaria que comprendía ARN y una cadena de unión a péptido como se muestra a continuación.

- 5 Cadena de oligómero con huecos no codificante de ANB/ADN
 ONC de 12 monómeros: 5'-GCattggtatTC-3' (SEQ ID NO: 1)
 (Mayúsculas: ANB, minúsculas: ADN, enlaces fosforotioato entre los ácidos nucleicos en todos los sitios)
 Cadena complementaria
 ARNc de 21 monómeros: 5'-u_su_scGCACCAGAAUACCAAu_sg_sc-3' (SEQ ID NO: 10)
- 10 (Mayúsculas: ARN, minúsculas: 2'-OMe-ARN, s: enlaces fosforotioato entre los ácidos nucleicos)
 Tercera cadena (péptido)
 ANP de 9 monómeros: N'-TGGTGCGAA-C' (SEQ ID NO: 11)
 (Subrayado: ANP)
- 15 Con respecto al oligómero de huecos de ANB/ADN, se usó un producto producido por encargo por Gene Design, Inc. Con respecto a la cadena complementaria, se usó un producto producido por encargo por Hokkaido System Science Co., Ltd. Además, con respecto a la cadena de unión a péptidos, se usó un producto producido por encargo por Fasmac Co., Ltd.
- 20 El oligómero con huecos de ANB/ADN, la cadena complementaria y la cadena basada en péptido se mezclaron en cantidades equimolares y la mezcla se calentó a 95 °C durante 5 minutos. Posteriormente, la mezcla se dejó reposar a una temperatura constante de 37 °C durante una hora para hibridar las cadenas. Además, si las cadenas no se iban a utilizar inmediatamente, las cadenas se almacenaron a 4 °C a partir de entonces.
- 25 Posteriormente, se inyectó ONC de 12 monómeros (ONC-mc) o un complejo de ácido nucleico bicatenario que comprendía (1) ONC de 12 monómeros, (2) ARNc(G) de 21 monómeros y (3) ANP de 9 monómeros (ONC, ANP/ARNc(G)) por vía intravenosa a un ratón a través de la vena de la cola en una cantidad de 0,75 mg/kg. Además, también se preparó como control un ratón al que solo se le administró PBS. Tres días después de la inyección intravenosa, los ratones se perfundieron con PBS y después se extrajeron los hígados. Posteriormente, se realizaron la extracción de ARNm, la síntesis de ADNc y la RT-PCR cuantitativa mediante los mismos métodos que los métodos descritos en el Ejemplo comparativo 1, se calculó la cantidad de expresión de ApoBm/cantidad de expresión de GAPDHm (gen convencional interno) y se realizó una comparación entre el grupo al que se le administró solo PBS (PBS solo) y los grupos a los que se les administraron ácidos nucleicos. Los resultados obtenidos de este modo se presentan en la FIG. 22.
- 30
- 35 Como es obvio a partir de los resultados ilustrados en la FIG. 22, el efecto no codificante del complejo de ONC, ANP/ARNc(G) no se redujo en comparación con el efecto de ANB de 12 monómeros.
- (Ejemplo 9)
- 40 El siguiente ejemplo demuestra que puede usarse una cadena de ANP como cadena complementaria en el complejo de ácido nucleico bicatenario.
- Es decir, se contempla que puede usarse una cadena de ANP como cadena complementaria, en lugar de ARN, como se ilustra en la FIG. 3B. Esta disposición también proporciona una realización de un complejo de ácido nucleico bicatenario en el que un resto funcional, tal como un péptido de direccionamiento, no se une directamente a la cadena no codificante (por ejemplo, oligómero con huecos de ANB/ADN), pero se asocia indirectamente con él.
- 45
- Basándose en este concepto, se diseñaron y produjeron un oligómero con huecos de ANB/ADN contra la apolipoproteína B de ratón (ApoBm) y una cadena complementaria que comprendía ANP como se muestra a continuación.
- 50
- Cadena de oligómero con huecos no codificante de ANB/ADN
 ONC de 12 monómeros: 5'-GCattggtatTC-3' (SEQ ID NO: 1)
 (Mayúsculas: ANB, minúsculas: ADN, enlaces fosforotioato entre los ácidos nucleicos en todos los sitios)
 Cadenas complementarias
- 55
1. ANPc de 12 monómeros: N'-GAAUACCAAUGC-C' (SEQ ID NO: 12)
 2. ANPc de 10 monómeros: N'-GAAUACCAAU-C' (SEQ ID NO: 13)
 3. ANPc de 8 monómeros: N'-GAAUACCA-C' (SEQ ID NO: 14)
- 60 (subrayado: ANP)
- Con respecto al oligómero con huecos de ANB/ADN, se usó un producto producido por encargo por Gene Design, Inc. Con respecto a la cadena complementaria, se usó un producto producido por encargo por Fasmac Co., Ltd.
- 65

El oligómero con huecos de ANB/ADN y cada una de las cadenas complementarias se mezclaron en cantidades equimolares y la mezcla se calentó a 95 °C durante 5 minutos. Posteriormente, la mezcla se dejó reposar a una temperatura constante de 37 °C durante una hora para hibridar las cadenas. Además, si las cadenas no se iban a utilizar inmediatamente, las cadenas se almacenaron a 4 °C a partir de entonces.

5 Posteriormente, se inyectaron ONC de 12 monómeros (ONC-mc), un ácido nucleico bicatenario que comprendía ONC de 12 monómeros y ANPc de 12 monómeros (ONC/ANPc de 12 monómeros), un ácido nucleico bicatenario que comprendía ONC de 12 monómeros y ANPc de 10 monómeros (ONC/ANPc de 10 monómeros) o un ácido nucleico bicatenario que comprendía ONC de 12 monómeros y ANPc de 8 monómeros (ONC/ANPc de 8 monómeros) por vía intravenosa a un ratón a través de la vena de la cola en una cantidad de 0,75 mg/kg. Además, también se preparó como control un ratón al que solo se le administró PBS. Tres días después de la inyección intravenosa, los ratones se perfundieron con PBS y después se extrajeron los hígados. Posteriormente, se realizaron la extracción de ARNm, la síntesis de ADNc y la RT-PCR cuantitativa mediante los mismos métodos que los métodos descritos en el Ejemplo comparativo 1, se calculó la cantidad de expresión de ApoBm/cantidad de expresión de GAPDHm (gen convencional interno) y se realizó una comparación entre el grupo al que solo se le administró PBS (PBS solo) y los grupos a los que se les administraron ácidos nucleicos. Los resultados obtenidos de este modo se presentan en la FIG. 23.

20 Como se muestra en los resultados ilustrados en la FIG. 23, el efecto no codificante de cualquiera de los complejos ONC/ANPc fue al menos tan fuerte como el efecto observado para el ONC-mc de 12 monómeros.

(Ejemplo 10)

25 Este ejemplo demostró que diversas estructuras para la cadena complementaria que comprenden "nucleótidos de ARN y opcionalmente análogos de nucleótidos" pueden usarse en el complejo de ácido nucleico bicatenario y producirán un efecto no codificante. Se diseñaron y prepararon cuatro tipos de estructuras de cadena complementaria. Las estructuras se ilustran esquemáticamente en la FIG. 24. Como muestra la figura, se combinaron dos tipos de regiones de ala 5' y 3' con dos tipos de regiones centrales. Las regiones del ala comprenden el ARN modificado con 2'-OMe con enlaces fosforotioato o el análogo de nucleótido ANB, con enlaces fosforotioato. La región central comprende ARN natural unido a fosfodiéster o ARN unido a fosforotioato.

Se produjeron y se sometieron a ensayo las siguientes cadenas nucleicas de 13 oligómeros:

35 Cadena de oligómero con huecos de ANB/ADN no codificante
ONC de 13 monómeros: 5'-GCattggtatTCA-3' (SEQ ID NO: 5)
(Mayúsculas: ANB, minúsculas: ADN, enlaces fosforotioato entre los ácidos nucleicos en todos los sitios)
Cadenas complementarias

40 1. Toc-ARNc(G): 5'-u_sg_sa_sAUACCAAU_sg_sc-3' (SEQ ID NO: 7)
2. Toc-ANBc(G): 5'-u_sg_sa_gAUACCAAU_sg_sc-3' (SEQ ID NO: 15)
3. Toc-ANBc(s): 5'-u_sg_sa_sA_sU_sA_sC_sC_sA_{ss}AA_sU_sg_sc-3' (SEQ ID NO: 16)
4. Toc-ARNc(s): 5'-U_sg_sa_sA_sU_sA_sC_sC_sA_sA_sU_sg_sc-3' (SEQ ID NO: 17)

45 (Mayúsculas: ARN, minúsculas: 2'-OMe-ARN, minúsculas subrayadas: ANB, s: enlaces fosforotioato entre los ácidos nucleicos).

El oligómero con huecos de ANB/ADN y cada una de las cadenas complementarias se mezclaron en cantidades equimolares y se hibridaron como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 7. A continuación, los complejos de ácido nucleico bicatenario hibridados se inyectaron por vía intravenosa a través de la vena de la cola de un ratón en una cantidad de 0,75 mg/kg. También se preparó un ratón de control inyectando solución de PBS a través de la vena de la cola. Tres días después de la inyección, los ratones se perfundieron con PBS, los hígados se extrajeron y, posteriormente, se realizaron la extracción de ARNm, la síntesis de ADNc y la RT-PCR cuantitativa como se describe en el Ejemplo comparativo 1. Se calculó el nivel de expresión relativo de ApoBm comparado con GAPDHm (gen convencional interno) y los resultados se presentan en las FIG. 25A-B.

55 Como se muestra en la FIG. 25A, comparando los resultados de Toc-ARNc(G) con Toc-ANBc (G), las regiones ala 5' y 3' de la cadena complementaria pueden prepararse usando ácidos nucleicos unidos y ARN y puede obtenerse un efecto no codificante similarmente grande. Los datos muestran adicionalmente que, para cualquiera de estos tipos de regiones ala, puede fosforotioarse la porción central de ARN de la cadena de ácido nucleico y el efecto no codificante seguiría siendo tan grande como el observado con el ARN natural en la porción central de la cadena. Compárese Toc-ANBc(s) y Toc-ARNc(s) con respecto al efecto observado para Toc-ARNc(G), en las FIG. 25A y 25B, respectivamente.

65 Como se ha analizado junto con el Ejemplo 7, este ejemplo muestra adicionalmente otras realizaciones en las que la resistencia a la nucleasa de la cadena complementaria puede aumentarse sin perder el efecto no codificante. Específicamente, la longitud completa de la cadena puede fosforotioarse y, aun cuando la región central comprenda

ARN modificado con fosforotioato, la cadena no codificante aún puede liberarse y suprimir el nivel del transcrito de ARNm.

(Ejemplo 11)

5 Este ejemplo demostró que incluso si las cadenas primera y segunda (cadenas no codificante y complementaria) tienen diferentes longitudes, todavía se obtiene el efecto no codificante. En este caso, un oligómero con huecos de ANB/ADN de 13 monómeros se hibridó con una cadena basada en ARN complementario de 31 monómeros y se sometió a ensayo la supresión de la expresión del gen ApoB en ratones. Además, el oligómero de 31 monómeros se preparó con un ala 5' que comprendía tres nucleótidos de ARN fosforotioados modificados con 2'-OMe, un ala 3' que comprendía veinte nucleótidos de ARN fosforotioados modificados con 2'-OMe y una región central que comprendía ocho nucleótidos de ARN que tenían un enlace de fosforotioato. La actividad del complejo de 13 monómeros/de 31 monómeros se comparó con la actividad de un complejo de 13 monómeros/de 13 monómeros.

15 Cadena de oligómero con huecos de ANB/ADN no codificante
ANB de 13 monómeros: 5'-GCattggtatTCA-3' (SEQ ID NO: 5)
(Mayúsculas: ANB, minúsculas: ADN, enlaces fosforotioato entre los ácidos nucleicos en todos los sitios)
Cadenas complementarias

20 1. Toc-ARNc(G) de 13 monómeros: 5'-u_sg_sa_sAUACCAAU_sg_sc-3' (SEQ ID NO: 7)
2. Toc-ARNc(s) de 31 monómeros: 5'-u_sg_sa_sAUACCAAUgcuacgcaccca_sc_sa-3' (SEQ ID NO: 18)

(Mayúsculas: ARN, minúsculas: 2'-OMe-ARN, s: enlaces fosforotioato entre los ácidos nucleicos)

25 El oligómero con huecos de ANB/ADN y cada uno de las cadenas complementarias se mezclaron en cantidades equimolares y se hibridaron como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 7. A continuación, los complejos de ácido nucleico bicatenario hibridados se inyectaron por vía intravenosa a través de la vena de la cola de un ratón en una cantidad de 0,75 mg/kg. También se preparó un ratón de control inyectando solución de PBS a través de la vena de la cola. Tres días después de la inyección, los ratones se perfundieron con PBS, los hígados se extrajeron y, posteriormente, se realizaron la extracción de ARNm, la síntesis de ADNc y la RT-PCR cuantitativa como se describe en el Ejemplo comparativo 1. Se calculó el nivel de expresión relativo de ApoBm comparado con GAPDHm (interno gen convencional) y los resultados se presentan en la FIG. 26.

35 Como se muestra en la FIG. 26, la comparación de la supresión conseguida con complejos bicatenarios que tenían una cadena complementaria Toc-ARNc(s) de 31 monómeros frente a los que tienen una cadena complementaria Toc-ANBc(G) de 13 monómeros que muestra que se obtuvo un efecto no codificante similarmente grande. Los datos muestran adicionalmente que puede fosforotioarse la porción de ARN central de la cadena de ácido nucleico y el efecto no codificante seguiría siendo tan grande como el observado con el ARN natural en la porción central de la cadena, incluso si las cadenas complementarias también difieren en longitud.

40 (Ejemplo 12)

45 Para demostrar la especificidad de secuencia y la aplicabilidad universal del efecto no codificante proporcionado por los complejos de ácido nucleico bicatenario descritos en el presente documento, se prepararon sondas no codificantes dirigidas al producto de transcripción de un gen diferente, la transtirretina humana (TTRh). Los experimentos se realizaron usando ratones transgénicos, alterados para contuvieran TTRh. (Los ratones, por tanto, contenían tanto TTRh como TTRm). Las cadenas no codificantes y complementarias se prepararon en dos longitudes, como cadenas de 13 monómeros y de 20 monómeros y se analizaron como complejos bicatenarios de 13 monómeros/de 13 monómeros y de 20 monómeros/de 20 monómeros. Además, la cadena complementaria se preparó con un resto funcional 5'-tocoferol para dirigir el complejo hacia el hígado. Además, debido a que la expresión de TTRh finalmente produce una proteína observable en la sangre, se analizó la concentración en suero de la proteína expresada y se descubrió que disminuía después de la inyección del complejo de ácido nucleico bicatenario. La secuencia y la composición de las distintas cadenas diseñadas, producidas y sometidas a ensayo se muestran a continuación.

55 Cadenas de interferencia ANB/ADN no codificantes

1. ONC de 13 monómeros: 5'-TGtctctgccTGG-3' (SEQ ID NO: 19)
2. ONC de 20 monómeros: 5'-TTATTgtctctgcctGGACT-3' (SEQ ID NO: 21)

60 (Mayúsculas: ANB, minúsculas: ADN, enlaces fosforotioato entre los ácidos nucleicos en todos los sitios)
Cadenas complementarias

Toc-ARNc(G) de 13 monómeros: 5'-cscsasGGCAGAGAscscsa-3' (SEQ ID NO: 20)
Toc-ARNc(G) de 20 monómeros: 5'-asgsuscscsAGGCAGAGACasasasasa-3' (SEQ ID NO: 22)

65 (Mayúsculas: ARN, minúsculas: 2'-OMe-ARN, s: enlaces fosforotioato entre los ácidos nucleicos)

Las cadenas no codificantes y complementarias de 13 monómeros y las cadenas no codificantes y complementarias de 20 monómeros, respectivamente, se mezclaron en cantidades equimolares y se hibridaron como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 7. A continuación, se inyectaron la cadena no codificante monocatenaria de 13 monómeros y el complejo de ácido nucleico bicatenario hibridado de 13 monómeros por vía intravenosa a través de la vena de la cola de un ratón transgénico en una cantidad de 0,75 mg/kg. De forma similar, se inyectaron la cadena monocatenaria no codificante de 20 unidades y el complejo bicatenario de 20 monómeros en una cantidad de 6 mg/kg. Los ratones de control también se prepararon inyectando solución de PBS a través de la vena de la cola. Tres días después de la inyección, los ratones se perfundieron con PBS, los hígados se extrajeron y, posteriormente, se realizaron la extracción de ARNm, la síntesis de ADNc y la RT-PCR cuantitativa como se describe en el Ejemplo comparativo 1. Se calcularon los niveles de expresión relativos de TTRh en comparación con GAPDHm (gen convencional interno) y los resultados se presentan en la FIG. 27A y 27B para las cadenas de 13 monómeros y de 20 monómeros, respectivamente.

La TTRh que se sintetiza en el hígado se secreta en la sangre. Por tanto, si pueden entregarse sondas no codificantes al hígado y son eficaces para suprimir la expresión de TTRh, el resultado de la supresión debería ser la disminución de la concentración sérica en sangre de la proteína. Los niveles de concentración sérica en sangre se midieron antes del tratamiento de inyección con las cadenas de ácido nucleico de 13 monómeros y nuevamente tres días después de la inyección en un laboratorio comercial. Las concentraciones séricas observadas se presentan en la FIG. 28.

Como se demuestra por la FIG. 27A, el complejo bicatenario de 13 monómeros fue eficaz en la supresión del transcrito de ARNm en más del 95 %. En comparación, el ONC monocatenario solo produjo una supresión de aproximadamente el 50 %. El complejo de 20 monómeros también produjo un nivel similar de supresión de aproximadamente el 50 %, mientras que la cadena monocatenaria de 20 monómeros no tuvo esencialmente ninguna supresión, como se ilustra en la FIG. 27B. Esta disminución en la capacidad para suprimir la expresión se observa habitualmente a medida que aumenta la longitud del oligonucleótido. Sin embargo, los oligonucleótidos más largos también son más selectivos y, por tanto, pueden ser más seguros. La eficacia de un tratamiento puede adaptarse ajustando, por ejemplo, la dosis, la pauta posológica y la longitud, secuencia y composición de la cadena no codificante. Sin embargo, como se muestra en estos ejemplos, la entrega de la cadena no codificante como un complejo de ácido nucleico bicatenario de acuerdo con las diversas realizaciones de la presente invención produce un grado de supresión significativamente mayor que cuando la misma cadena no codificante se entrega como una cadena individual.

Los niveles de concentración en suero antes y después del tratamiento se muestran en la FIG. 28 y los resultados muestran una reducción significativa en la TTRh provocada por el complejo bicatenario de 13 monómeros de ~40 mg/dl a <5 mg/dl, en comparación con la cadena monocatenaria de 13 monómeros (de ~44 mg/dl a ~28 mg/dl) y el control de PBS (aproximadamente sin cambios).

(Ejemplo 13)

Este ejemplo demostró la entrega de un complejo de ácido nucleico bicatenario a las células del sistema nervioso usando un péptido como resto funcional de entrega. Se usó un complejo bicatenario que comprendía tres cadenas, una cadena no codificante, una cadena complementaria y una cadena de ANP, que tenían la estructura general ilustrada en la FIG. 21B. Se unió un dodecapéptido, GRD1, al extremo N de una cadena de ANP de 9 monómeros para actuar como un agente de entrega para ubicar el complejo en las células de los ganglios de la raíz dorsal (GRD). Este ANP de 9 monómeros se hibridó con una cadena no codificante de 13 monómeros y una cadena complementaria de 22 monómeros, que se describen a continuación, para formar el complejo bicatenario utilizado en el experimento. El gen diana dirigido por la cadena no codificante era TRPV1.

Cadena de oligómero con huecos de ANB/ADN no codificante
 ONC de 13 monómeros: 5'-TAGtccagttCAC-3' (SEQ ID NO: 23)
 (Mayúsculas: ANB; minúsculas: ADN; enlaces fosforotioato entre los ácidos nucleicos en todos los sitios)
 Cadena complementaria
 ARNc(G) de 22 monómeros: 5'-g_su_sg_sAACUGGACuauacgcac_sc_sa-3' (SEQ ID NO: 24)
 (Mayúsculas: ARN; minúsculas: 2'-OMe-ARN; s: enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos)
 Tercera cadena (péptido)
 pep-ANP de 9 monómeros: N'-SPGARAFGGGS-tggtgcgta-C' (SEQ ID NO: 25 y 31)
 (Mayúsculas: aminoácido; subrayado, minúsculas: ANP)

El oligómero con huecos ANB/ADN, la cadena complementaria y la cadena de péptido-ANP se mezclaron en cantidades equimolares y la mezcla se calentó a 95 °C durante 5 minutos. Posteriormente, la mezcla se dejó reposar a una temperatura constante de 37 °C durante una hora para hibridar las tres cadenas ("TRPV1-tc"). Además, si las cadenas no se iban a utilizar inmediatamente, las cadenas se almacenaron a 4 °C. Además, se preparó un complejo bicatenario que comprendía solo la cadena no codificante y la cadena complementaria ("TRPV1-bc") de la misma manera.

Se obtuvieron ratones de Sankyo Lab (Tokio, Japón), se mantuvieron dentro de una instalación de animales libres de patógenos y se les proporcionó comida y agua a voluntad. Ratones ICR hembras de ocho semanas de edad que pesaban un promedio de aproximadamente 27 g recibieron 2,66 µg de inyecciones intratecales de PBS, TRPV1-bc o TRPV1-tc. Los procedimientos con animales fueron realizados por un médico con licencia para la experimentación con animales, de acuerdo con los protocolos de ética y seguridad aprobados por el Comité de Experimentos con Animales de la Universidad de Medicina y Odontología de Tokio. La inyección intratecal se administró después de la inducción de la anestesia a través de una inyección intraperitoneal de hidrato de cloral (0,5 mg/g de peso corporal) y clorhidrato de ketamina (0,05 mg/g de peso corporal). Todos los ratones se colocaron en posición de decúbito prono y se sometieron a laminectomía parcial de las vértebras lumbares segunda y tercera (L2-L3). Una vez expuesta, la duramadre entre estas vértebras se perforó con una aguja de calibre 27; posteriormente, se insertó un catéter PE-10 conectado a una jeringa Hamilton de 10 µl en el espacio subaracnoideo hasta aproximadamente el nivel de L5 y se administró constantemente un volumen de 10 µl durante un período de 1 minuto. Después de retirar el catéter, la fascia y la piel se suturaron con hilo de nylon 4-0 y se trataron con solución de antibiótico. Los animales se colocaron después en posición cabeza arriba y se les permitió recuperarse en una almohadilla calentada.

El análisis histológico se realizó de la siguiente manera como se indica a continuación. Los ratones se sometieron a eutanasia 2 días después de la inyección a través de inyección intraperitoneal de 3 mg de hidrato de cloral y fijación transcardial con PFA (paraformaldehído al 4 % en PBS) después de la perfusión de PBS. Se recogieron GRD (L6 unilateral). Los GRD obtenidos de este modo se fijaron con una solución de formol al 4 %, posteriormente la solución se reemplazó con una solución de sacarosa al 30 %, los hígados se incluyeron en Compuesto OCT y después se produjeron secciones con un espesor de 10 µm. Posteriormente, las secciones se tiñeron en el núcleo usando DAPI y después se observaron las intensidades de señal de Cy3 en las secciones usando un microscopio confocal. El análisis de imágenes confocales se muestra en la FIG. 29.

El análisis del nivel de expresión relativa de TRPV1 se realizó como se indica a continuación. Los ratones se sacrificaron 7 días después de la inyección a través de inducción de anestesia y perfusión transcardial de PBS. Se recogieron tres GRD unilaterales de cada ratón: GRD espinal lumbar (DEL) L4, L5 y L6. Posteriormente, se realizaron la extracción de ARNm, la síntesis de ADNc y la RT-PCR cuantitativa como se describe en el Ejemplo comparativo 1. Se calcularon los niveles de expresión relativos de TRPV1m en comparación con GAPDHm (gen convencional interno) y los resultados se presentan en la FIG. 30.

El análisis histológico, que se muestra en la FIG. 29, revela que la cadena no codificante marcada con Cy3 se ubica en el núcleo de las células del GRD. Esto se evidencia por las señales fluorescentes coincidentes de la tinción nuclear del marcador fluorescente en la cadena no codificante. De nuevo, este experimento demostró que el complejo bicatenario que comprendía tres cadenas permaneció intacto y el resto de entrega en la tercera cadena dirigió el complejo y, por tanto, la cadena no codificante, a la célula de interés.

El efecto no codificante se observa, como se muestra en la FIG. 30, mediante la supresión de la expresión de TRPV1m. El complejo, PRPV1-tc, que contiene la cadena péptido-ANP y, por tanto, puede guiar el complejo a las células GRD, demostró una supresión de aproximadamente el 40 %. Por el contrario, el complejo TRPV1-bc, que carecía de la cadena péptido-ANP suprimió la expresión del gen, pero solo en aproximadamente un 20 %. Este ejemplo demostró nuevamente la capacidad para entregar una cadena no codificante a un tipo de célula específico usando complejos que comprenden tres cadenas. Además, este ejemplo ilustra el uso de un péptido para guiar la entrega y lo consigue en un tipo celular (GRD) y un órgano diferente al ilustrado en otros ejemplos (sistema nervioso en lugar del hígado).

(Ejemplo 14)

Este ejemplo demostró un efecto no codificante por el complejo de ácido nucleico bicatenario contra productos de transcripción de ARN que no codifican proteínas, en concreto, contra un miARN. En un hígado de ratón, se sabe que se expresa miR-122, un miARN. Se diseñó y preparó una cadena anti-miR de 15 monómeros con un ala 5' y un ala 3' que comprendían tres análogos de nucleótidos (ácido nucleico unido, ANB) y una región central de 9 bases que comprendía ADN, en la que todos los enlaces estaban fosforotioados. Se preparó una cadena complementaria con alas 5' y 3' que comprendían 2'-OMe, ARN fosforotioado y una región central que comprendía ARN natural.

Cadena de oligómero con huecos de ANB/ADN anti-miR
 ONC de 15 monómeros: 5'-CCAAttgtcacacTCC-3' (SEQ ID NO: 26)
 (Mayúsculas: ANB; minúsculas: ADN; enlaces fosforotioato entre los ácidos nucleicos en todos los sitios)
 Cadena complementaria
 Toc-ARNc(G) de 15 monómeros: 5'-Toc-g_sg_sa_sGUGUGACCA_su_sg_sg-3' (SEQ ID NO: 27)
 (Mayúsculas: ARN; minúsculas: 2'-OMe-ARN; s: enlaces fosforotioato entre los ácidos nucleicos)

El oligómero con huecos de ANB/ADN anti-miR y la cadena complementaria se mezclaron en cantidades equimolares y se hibridaron como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 7. A continuación, la cadena anti-miR monocatenaria y los complejos de ácido nucleico bicatenario hibridado se inyectaron por vía intravenosa a través de la vena de la cola de un ratón en una cantidad de 0,75 mg/kg. También se preparó un ratón de control inyectando

solución de PBS a través de la vena de la cola. Tres días después de la inyección, los ratones se perfundieron con PBS, los hígados se extrajeron y, posteriormente, se realizaron la extracción de ARNm, la síntesis de ADNc y la RT-PCR cuantitativa como se describe en el Ejemplo comparativo 1. Se calculó el nivel de expresión relativo de ApoBm comparado con GAPDHm (gen convencional interno) y los resultados se presentan en la FIG. 31.

5 Como se demuestra por la FIG. 31, el complejo bicatenario proporciona una reducción de casi el 50 % en el nivel de miR-122, mientras que el oligonucleótido anti-miR monocatenario proporciona solo una reducción del ~20 %. También es digno de mencionar que los métodos normales para reducir los niveles de miARN usan una estructura de sonda de tipo mixómero y la sonda debe entregarse en una dosis de ~10 mg/kg para conseguir una reducción del 50 % (DE50). Como se ilustra, el complejo bicatenario de acuerdo con algunas realizaciones que se presenta en este ejemplo consigue una DE50 en una cantidad de dosis considerablemente menor.

(Ejemplo 15)

15 Este ejemplo usó una cadena no codificante que comprendía ácidos nucleicos con unión amido "aminaANU" para conseguir un efecto no codificante. Los ácidos nucleicos con unión amido (también denominados "AmAN") son análogos de los ANB que tienen una unión de amida cíclica (4'-C(O)-N(R)-2'; R = H, Me) que une los carbonos 2' y 4' del anillo de azúcar. La síntesis de AmAN, su incorporación en oligonucleótidos y las propiedades de los mismos, tales como la afinidad de unión y la resistencia a las nucleasas, fueron descritas recientemente por A. Yahara et al., en *ChemBioChem* 2012, 13, 2513-2516. Según lo revelado por Yahara et al., los AmAN presentan excelentes afinidades de unión hacia cadenas complementarias y un alto grado de resistencia a nucleasas, lo que los hace adecuados para su uso en oligonucleótidos no codificantes. Se diseñó y preparó una cadena no codificante de 13 monómeros con un ala 5' y un ala 3' que comprendían, respectivamente, dos y tres análogos de nucleótidos (amidaANU, AmAN) y una región central de 8 bases que comprendía ADN, en la que todos los enlaces fueron fosforotioados. Se preparó una cadena complementaria con alas 5' y 3' que comprendían 2'-OMe, ARN fosforotioado y una región central que comprendía ARN natural.

Cadena de oligómero con huecos de amidaANU(AmAN)/ADN no codificante

ONC de 15 monómeros: 5'-GCattggtatTCA-3' (SEQ ID NO: 28)

30 (Mayúsculas: N-metil amidaANU(AmAN), minúsculas: ADN, enlaces fosforotioato entre los ácidos nucleicos en todos los sitios)

Cadena complementaria

1. Toc-ARNc(G) de 13 monómeros: 5'-u_sg_sa_sAUACCAAU_sg_sc-3' (SEQ ID NO: 7)

(Mayúsculas: ARN, minúsculas: 2'-OMe-ARN, s: enlaces fosforotioato entre los ácidos nucleicos).

35 El oligómero con huecos de amidaANU/ADN no codificante (ONC) y la cadena complementaria se mezclaron en cantidades equimolares y se hibridaron como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 7. A continuación, el ONC monocatenario y el complejo de ácido nucleico bicatenario hibridado se inyectó por vía intravenosa a través de la vena de la cola de un ratón en diversas cantidades (ONC-mc: 0,75 mg/kg; 2,25 mg/kg; Toc-ONC/ARNc(G): 40 0,33 mg/kg; 1,0 mg /kg). También se preparó un ratón de control inyectando solución de PBS a través de la vena de la cola. Siete días o catorce días después de la inyección, los ratones se perfundieron con PBS, los hígados se extrajeron y, posteriormente, se realizaron la extracción de ARNm, la síntesis de ADNc y la RT-PCR cuantitativa como se describe en el Ejemplo comparativo 1. Se calculó el nivel de expresión relativo de ApoBm en comparación con GAPDHm (gen convencional interno) y los resultados se presentan en la FIG. 32.

45 Como se muestra en la FIG. 32, el complejo de ácido nucleico bicatenario que incorpora amidaANU (AmAN) en las regiones ala 5' y 3' del primer ácido nucleico (oligonucleótido no codificante) genera un efecto no codificante in vivo. Los gráficos muestran que incluso cuando el complejo bicatenario se inyecta en ratones en cantidades más bajas que el ONC de cadena única, se consigue un mayor grado de supresión con el complejo bicatenario. Por ejemplo, el complejo ONC/Toc-ARNc(G) inyectado a 1,0 mg/kg produjo una supresión en aproximadamente el 55 %, que fue significativamente menor que el resultado de solo el 20 % de supresión con ONC-mc a una dosis de 2,25 mg/kg cuando se mide 7 días después de la inyección. Como se demuestra en esta realización, se consigue un mayor grado de supresión de la expresión con menos reactivo poniendo en práctica el método y usando el complejo bicatenario que se desvela en el presente documento.

55 [Aplicabilidad industrial]

60 Como se ha analizado anteriormente, el uso de un complejo de ácido nucleico bicatenario de acuerdo con realizaciones de la presente invención, en algunas realizaciones puede entregarse un ácido nucleico no codificante a un órgano particular (células) con alta especificidad y alta eficiencia, y la expresión de un gen diana o el nivel de un producto de transcripción puede ser suprimido muy eficazmente por el ácido nucleico no codificante. Además, puesto que pueden aplicarse diversas moléculas tales como lípidos (por ejemplo, tocoferol y colesterol), azúcares (por ejemplo, glucosa y sacarosa), proteínas, péptidos y anticuerpos al ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones como restos funcionales para la entrega a órganos particulares, el complejo de ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones puede dirigirse a diversos órganos, tejidos y células. Además, puesto que el efecto no codificante no se reduce incluso si el ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones se somete a

modificaciones para transmitir resistencia a la ARNasa o similar, el ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones también puede usarse en administración enteral.

5 Por tanto, el ácido nucleico bicatenario de algunas realizaciones puede proporcionar una alta eficacia incluso cuando se administra a una concentración baja y también es excelente desde el punto de vista de la reducción de los efectos adversos secundarios mediante la supresión de la distribución de ácidos nucleicos no codificantes en órganos distintos del órgano diana. Por tanto, el ácido nucleico bicatenario es útil como una composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de enfermedades que se asocian al aumento de la expresión de genes diana, tales como enfermedades metabólicas, tumores e infecciones y/o al aumento del nivel de un producto de transcripción.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY OSAKA
UNIVERSITY
<120> ÁCIDO NUCLEICO BICATENARIO QUIMÉRICO
<130> IBPF12-540W0
<150> JP2011/275488
20 <151> 16-12-2011
<160> 31
<170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 12
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
<220>
<221> base_modificada
30 <222> (1)..(2)
<223> ANB
<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(12)
35 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
<220>
<221> base_modificada
<222> (11)..(12)
<223> ANB
40 <400> 1
gcattggtat tc 12
<210> 2
<211> 12
<212> ARN
45 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
<400> 2
gaaauaccaau gc 12
50 <210> 3
<211> 12
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
55 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(2)
<223> OMe-ARN
60 <220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(3)
<223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
<220>
65 <221> base_modificada
<222> (10)..(12)

<223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (11)..(12)
 5 <223> OMe-ARN
 <400> 3
 gaauaccaau gc 12
 <210> 4
 <211> 12
 10 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 <220>
 15 <221> base_modificada
 <222> (1)..(12)
 <223> OMe-ARN
 <220>
 <221> base_modificada
 20 <222> (1)..(12)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <400> 4
 gaauaccaau gc 12
 <210> 5
 25 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(2)
 <223> ANB
 <220>
 35 <221> base_modificada
 <222> (1)..(13)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <220>
 <221> base_modificada
 40 <222> (11)..(13)
 <223> ANB
 <400> 5
 gcattggtat tca 13
 <210> 6
 45 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(3)
 <223> ANB
 <220>
 55 <221> base_modificada
 <222> (1)..(14)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <220>
 <221> base_modificada
 60 <222> (12)..(14)
 <223> ANB
 <400> 6
 agcattgta ttca 14
 <210> 7
 65 <211> 13
 <212> ARN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 <220>
 5 <221> base_modificada
 <222> (1)..(3)
 <223> OMe-ARN
 <220>
 <221> base_modificada
 10 <222> (1)..(4)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <220>
 <221> base_modificada
 15 <222> (11)..(13)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)..(13)
 20 <223> OMe-ARN
 <400> 7
 ugaauaccaa ugc 13
 <210> 8
 25 <211> 14
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(3)
 <223> OMe-ARN
 <220>
 35 <221> base_modificada
 <222> (1)..(4)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <220>
 <221> base_modificada
 40 <222> (11)..(14)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)..(14)
 45 <223> OMe-ARN
 <400> 8
 ugaauaccaa ugc 14
 <210> 9
 <211> 12
 50 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 <220>
 55 <221> base_modificada
 <222> (1)..(12)
 <223> OMe-ARN
 <220>
 <221> base_modificada
 60 <222> (1)..(3)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)..(12)
 65 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <400> 9

gaauaccaau gc 12
 <210> 10
 <211> 21
 <212> ARN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 <220>
 <221> base_modificada
 10 <222> (1)..(3)
 <223> OMe-ARN
 <220>
 <221> base_modificada
 15 <222> (1)..(3)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (19)..(21)
 20 <223> OMe-ARN
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (19)..(21)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 25 <400> 10
 uucgcaccag aauaccaaug c 21
 <210> 11
 <211> 9
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 <220>
 <221> base_modificada
 35 <222> (1)..(9)
 <223> ANP
 <400> 11
 tggcgcgaa 9
 <210> 12
 40 <211> 12
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(12)
 <223> ANP
 <400> 12
 50 gaauaccaau gc 12
 <210> 13
 <211> 10
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(10)
 60 <223> ANP
 <400> 13
 gaauaccaau 10
 <210> 14
 <211> 8
 65 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 <220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (1)..(8)
 <223> ANP
 <400> 14
 gaauacca 8
 <210> 15
 10 <211> 13
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(3)
 <223> ANB
 <220>
 20 <221> base_modificada
 <222> (1)..(4)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <220>
 <221> base_modificada
 25 <222> (11)..(13)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)..(13)
 30 <223> ANB
 <400> 15
 ugaauaccaa ugc 13
 <210> 16
 <211> 13
 35 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 <220>
 40 <221> base_modificada
 <222> (1)..(3)
 <223> ANB
 <220>
 <221> base_modificada
 45 <222> (1)..(13)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)..(13)
 50 <223> ANB
 <400> 16
 ugaauaccaa ugc 13
 <210> 17
 <211> 13
 55 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 <220>
 60 <221> base_modificada
 <222> (1)..(3)
 <223> OMe-ARN
 <220>
 <221> base_modificada
 65 <222> (1)..(13)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)..(13)
 <223> OMe-ARN
 5 <400> 17
 ugaauaccaa ugc 13
 <210> 18
 <211> 31
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 <220>
 <221> base_modificada
 15 <222> (1)..(3)
 <223> OMe-ARN
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(4)
 20 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)..(31)
 <223> OMe-ARN
 25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (28)..(31)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <400> 18
 30 ugaauaccaa ugc uacgcau acgcaccacc a 31
 <210> 19
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(2)
 40 <223> ANB
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(13)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (11)..(13)
 <223> ANB
 <400> 19
 50 tgtctctgcc tgg 13
 <210> 20
 <211> 13
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(3)
 60 <223> OMe-ARN
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(4)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 65 <220>
 <221> base_modificada

<222> (11)..(13)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (12)..(13)
 <223> OMe-ARN
 <400> 20
 ccaggcagag aca 13
 <210> 21
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(5)
 <223> ANB
 <220>
 20 <221> base_modificada
 <222> (1)..(20)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <220>
 <221> base_modificada
 25 <222> (16)..(20)
 <223> ANB
 <400> 21
 ttattgtctc tgcctggact 20
 <210> 22
 30 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(5)
 <223> OMe-ARN
 <220>
 40 <221> base_modificada
 <222> (1)..(6)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <220>
 <221> base_modificada
 45 <222> (15)..(20)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (16)..(20)
 50 <223> OMe-ARN
 <400> 22
 aguccaggca gagacaauaa 20
 <210> 23
 <211> 13
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 <220>
 60 <221> base_modificada
 <222> (1)..(2)
 <223> ANB
 <220>
 <221> base_modificada
 65 <222> (1)..(13)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos

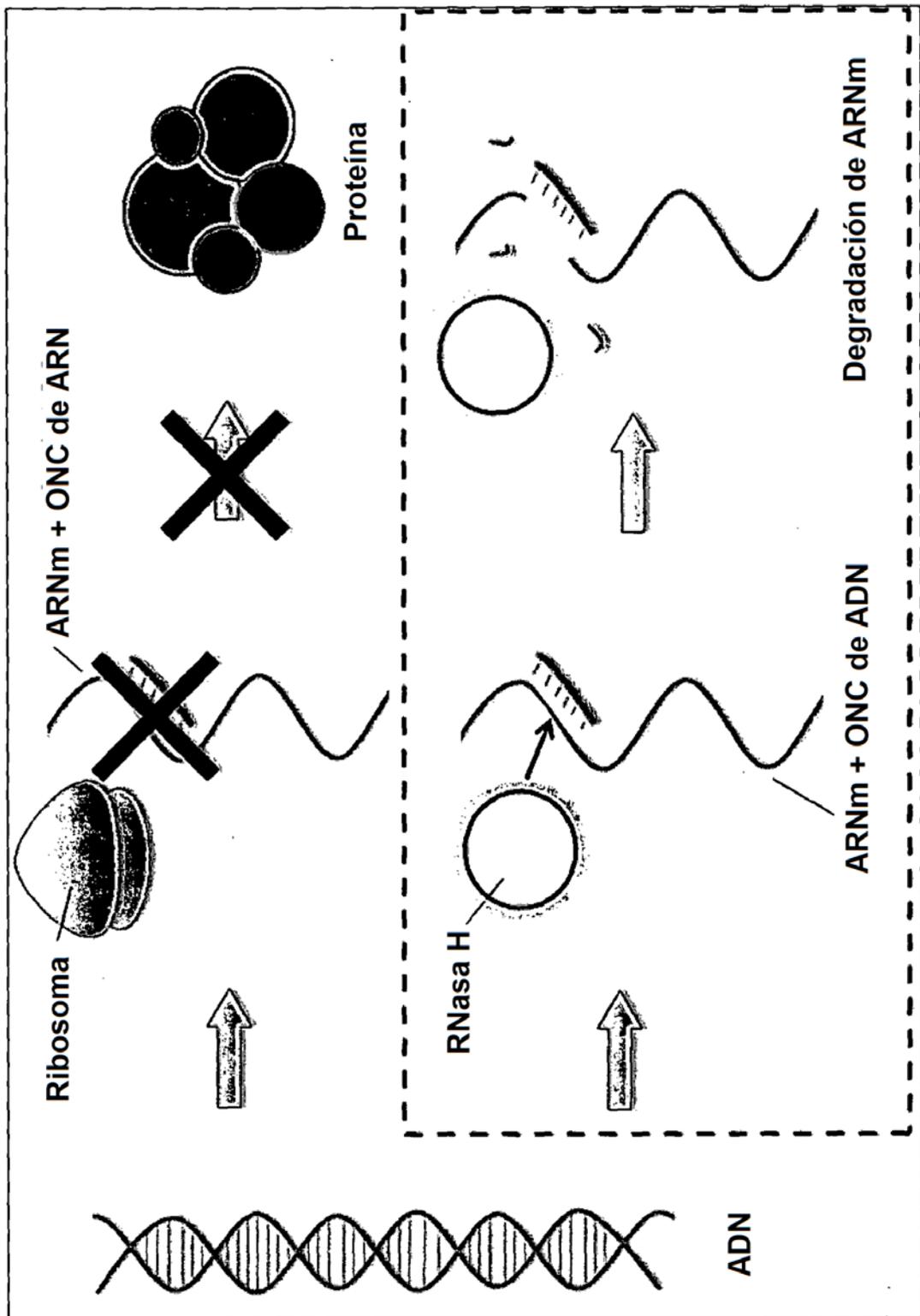
<220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 <220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (1)..(3)
 <223> OMe-ARN
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(4)
 10 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)..(15)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(15)
 <223> OMe-ARN
 <400> 27
 20 ggagugugac caugg 15
 <210> 28
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(2)
 30 <223> N-metil amidaANU
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(13)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (11)..(13)
 <223> N-metil amidaANU
 <400> 28
 40 gcattggtat tca 13
 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(5)
 50 <223> ANB
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(20)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (16)..(20)
 <223> ANB
 <400> 29
 60 tccagcattg gtattcagtg 20
 <210> 30
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(5)
 <223> ANB
 5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(29)
 <223> Enlaces fosforotioato entre ácidos nucleicos
 <220>
 10 <221> base_modificada
 <222> (25)..(29)
 <223> ANB
 <400> 30
 tccagcattg gtattcagtg tgatgacac 29
 15 <210> 31
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Secuencia oligonucleotídica sintetizada artificialmente
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(9)
 <223> ANP
 25 <400> 31
 tggtagcga 9

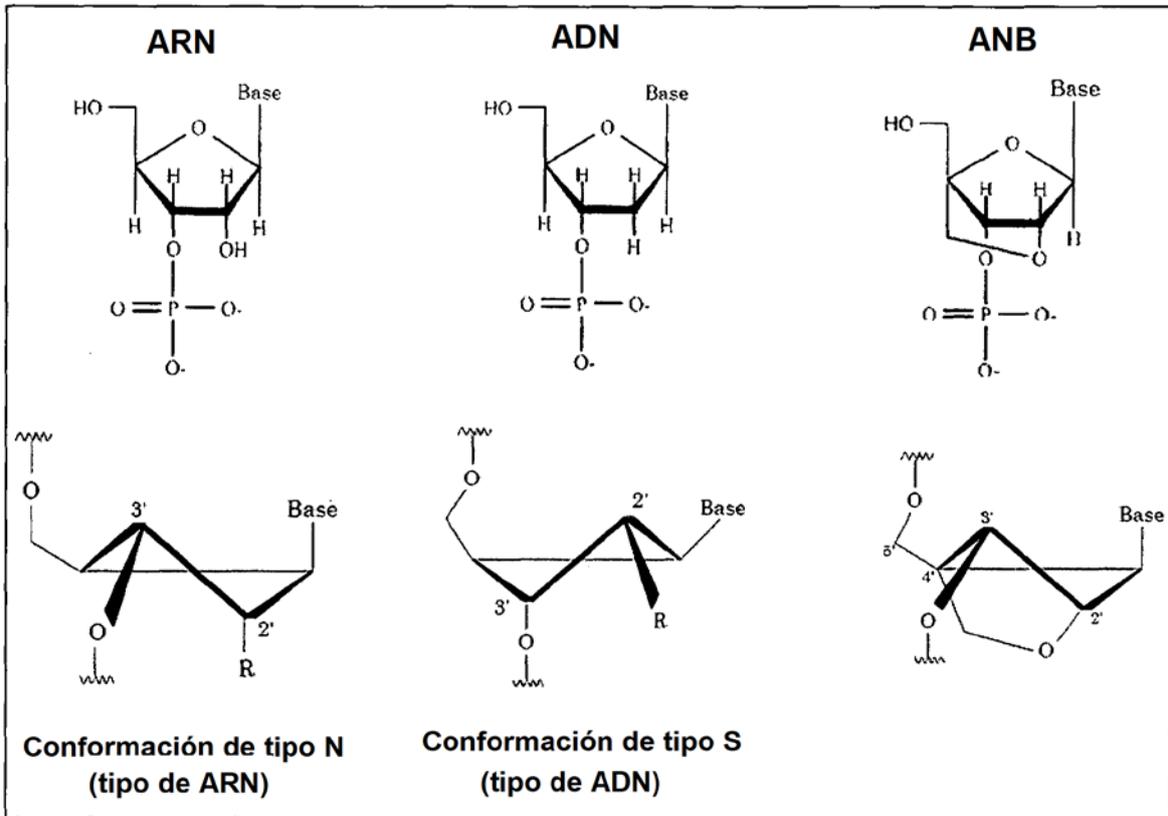
REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en la reducción del nivel de un producto de transcripción en una célula, que comprende:
- 5 un complejo de ácido nucleico bicatenario que comprende una primera cadena de ácido nucleico hibridada con una segunda cadena de ácido nucleico, en el que:
- (a) la primera cadena de ácido nucleico (i) comprende nucleótidos y análogos de nucleótidos, y el número total de nucleótidos y análogos de nucleótidos en la primera cadena de ácido nucleico es de 12 a 25, (ii) comprende al menos 4 nucleótidos de ADN o nucleótidos de ADN modificados consecutivos que son reconocidos por la ARNasa H cuando la primera cadena de ácido nucleico está hibridada con el producto de transcripción, (iii) se hibrida con el producto de transcripción y (iv) comprende una región ala 5' de uno o más análogos de nucleótidos ubicados en posición 5' con respecto a los al menos 4 nucleótidos de ADN o nucleótidos de ADN modificados consecutivos que son reconocidos por la ARNasa H y/o una región ala 3' de uno o más análogos de nucleótidos ubicados en posición 3' con respecto a los al menos 4 nucleótidos de ADN o nucleótidos de ADN modificados consecutivos que son reconocidos por la ARNasa H; y
- (b) la segunda cadena de ácido nucleico (i) comprende al menos 4 nucleótidos de ARN consecutivos y (ii) comprende adicionalmente una región ala 5' de uno o más nucleótidos fosforotioados o análogos de nucleótidos fosforotioados ubicados en posición 5' con respecto a los al menos 4 nucleótidos de ARN consecutivos y que tiene un efecto de supresión de la descomposición por enzimas, en la que dichos análogos de nucleótidos son nucleótidos unidos, y/o una región ala 3' de uno o más nucleótidos fosforotioados o análogos de nucleótidos fosforotioados ubicados en posición 3' con respecto a los al menos 4 nucleótidos de ARN consecutivos y que tiene un efecto de supresión de la descomposición por enzimas, en las que dichos análogos de nucleótidos son nucleótidos unidos, en la que los al menos 4 nucleótidos de ARN consecutivos son escindidos por la ARNasa H cuando la segunda cadena de ácido nucleico está hibridada con la primera cadena de ácido nucleico, y en la que la segunda cadena de ácido nucleico comprende adicionalmente un resto funcional que tiene una función de entrega dirigida.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que los al menos 4 nucleótidos de ARN consecutivos de la segunda cadena de ácido nucleico son nucleótidos de ARN naturales o nucleótidos de ARN 2'-O-metilados.
3. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la primera cadena de ácido nucleico comprende la región ala 5' y la región ala 3', y en la que la región ala 5' comprende al menos 2 análogos de nucleótidos y la región ala 3' comprende al menos 2 análogos de nucleótidos.
4. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que
- (i) el número total de nucleótidos y análogos de nucleótidos en la primera cadena de ácido nucleico y el número total de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ADN, análogos de nucleótidos y nucleótidos de ANP en la segunda cadena de ácido nucleico son iguales; o
- (ii) el número total de nucleótidos y análogos de nucleótidos en la primera cadena de ácido nucleico y el número total de nucleótidos de ARN, nucleótidos de ADN, análogos de nucleótidos y nucleótidos de ANP en la segunda cadena de ácido nucleico son diferentes.
5. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la primera cadena de ácido nucleico comprende al menos un análogo de nucleótido que es o son nucleótidos unidos.
6. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que al menos uno de los nucleótidos y/o al menos uno de los análogos de nucleótidos en la primera cadena de ácido nucleico está fosforotioado.
7. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 5-6, en la que el complejo de ácido nucleico bicatenario comprende adicionalmente una tercera cadena de ácido nucleico hibridada con la segunda cadena de ácido nucleico.
8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la tercera cadena de ácido nucleico comprende nucleótidos de ANP.
9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en la que la tercera cadena de ácido nucleico comprende adicionalmente un resto funcional que tiene una función de entrega dirigida.

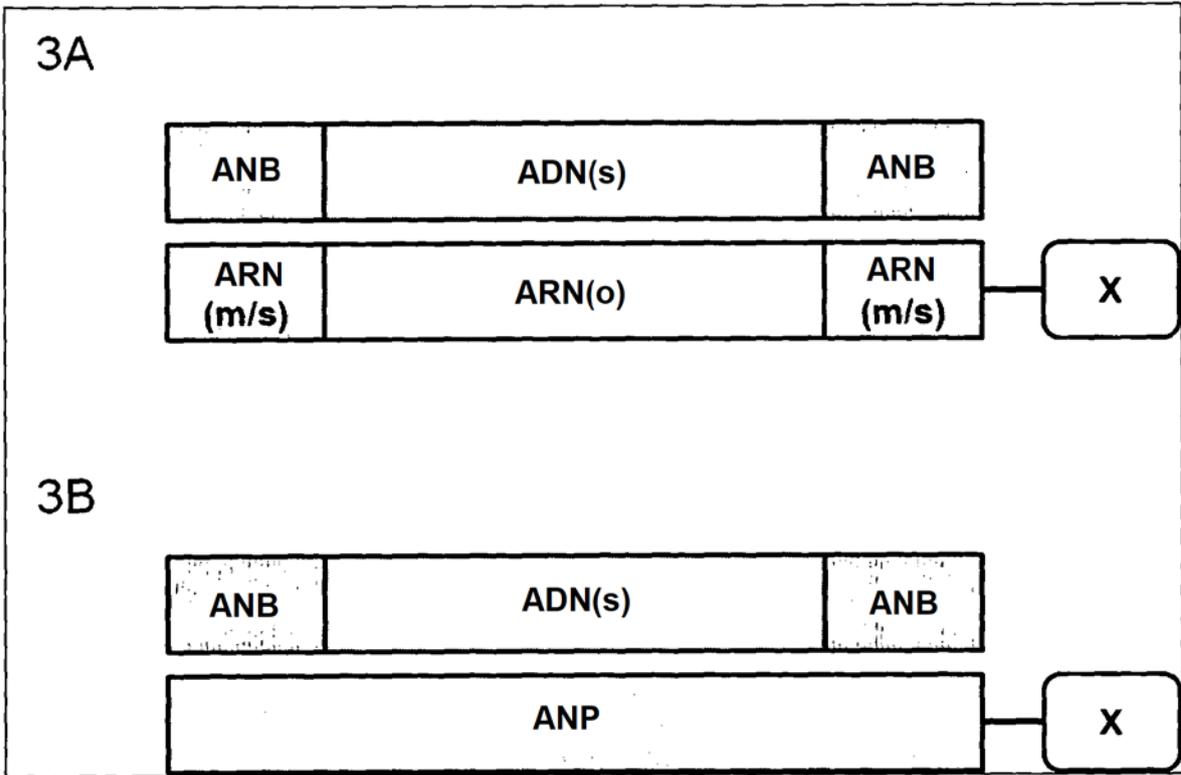
[Fig. 1]



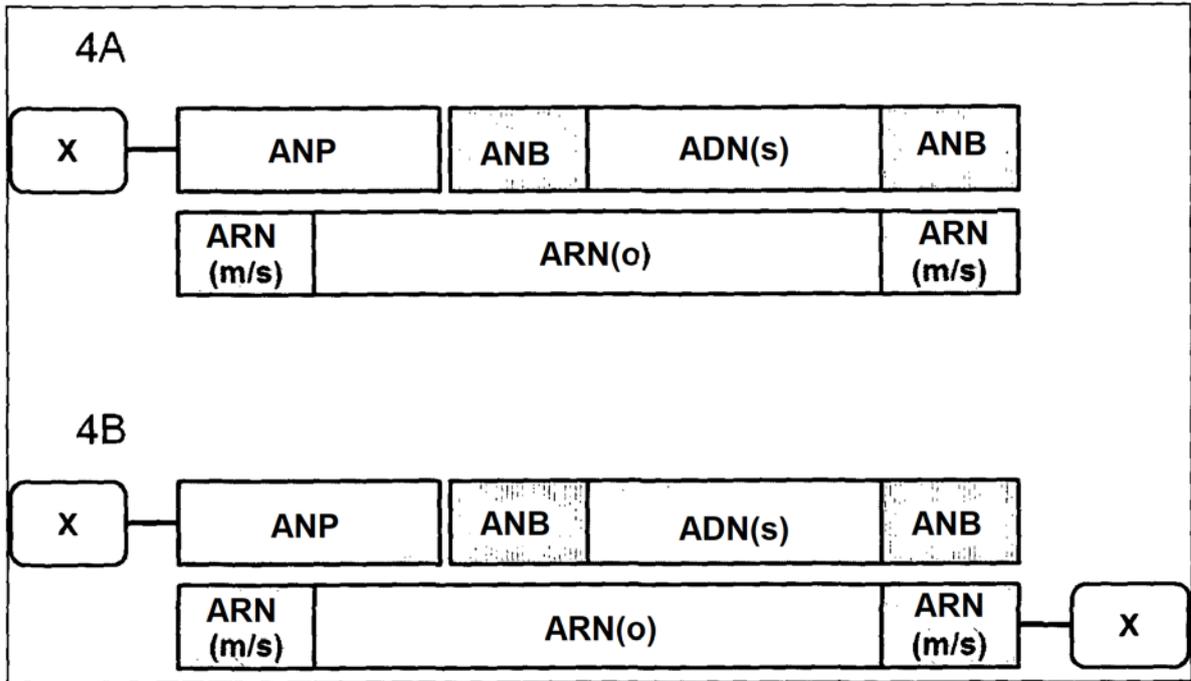
[Fig. 2]



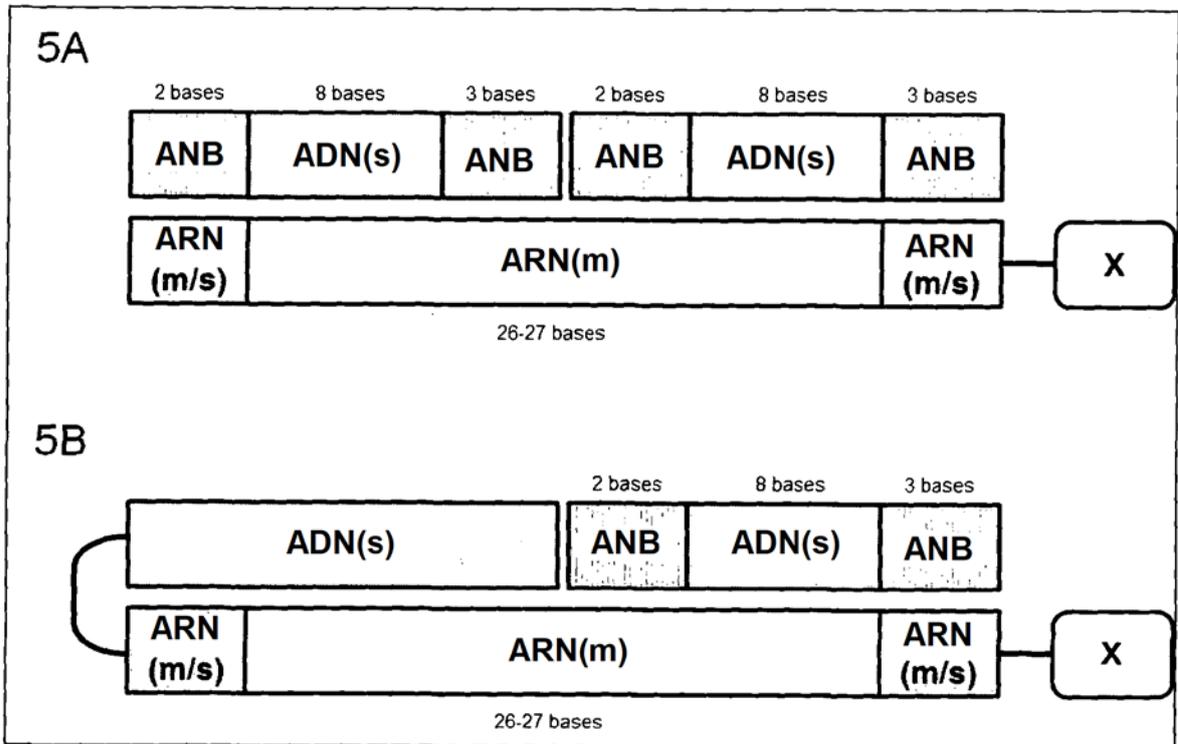
[Fig. 3]



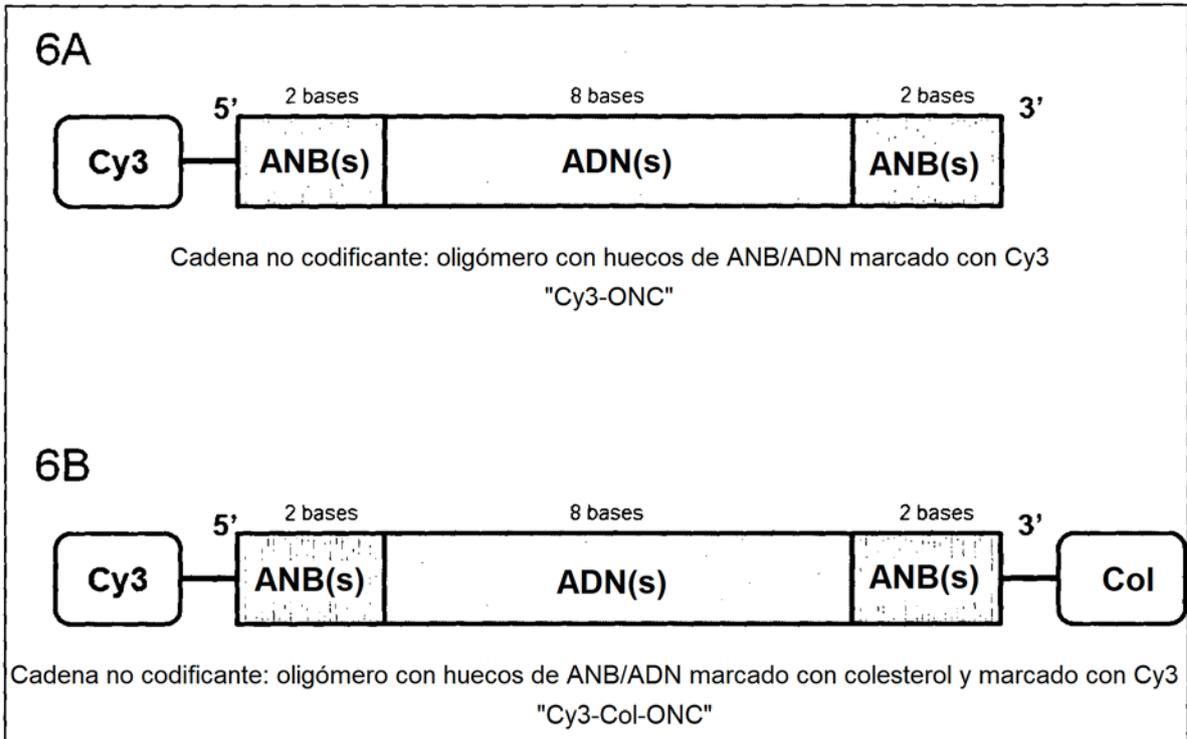
[Fig. 4]



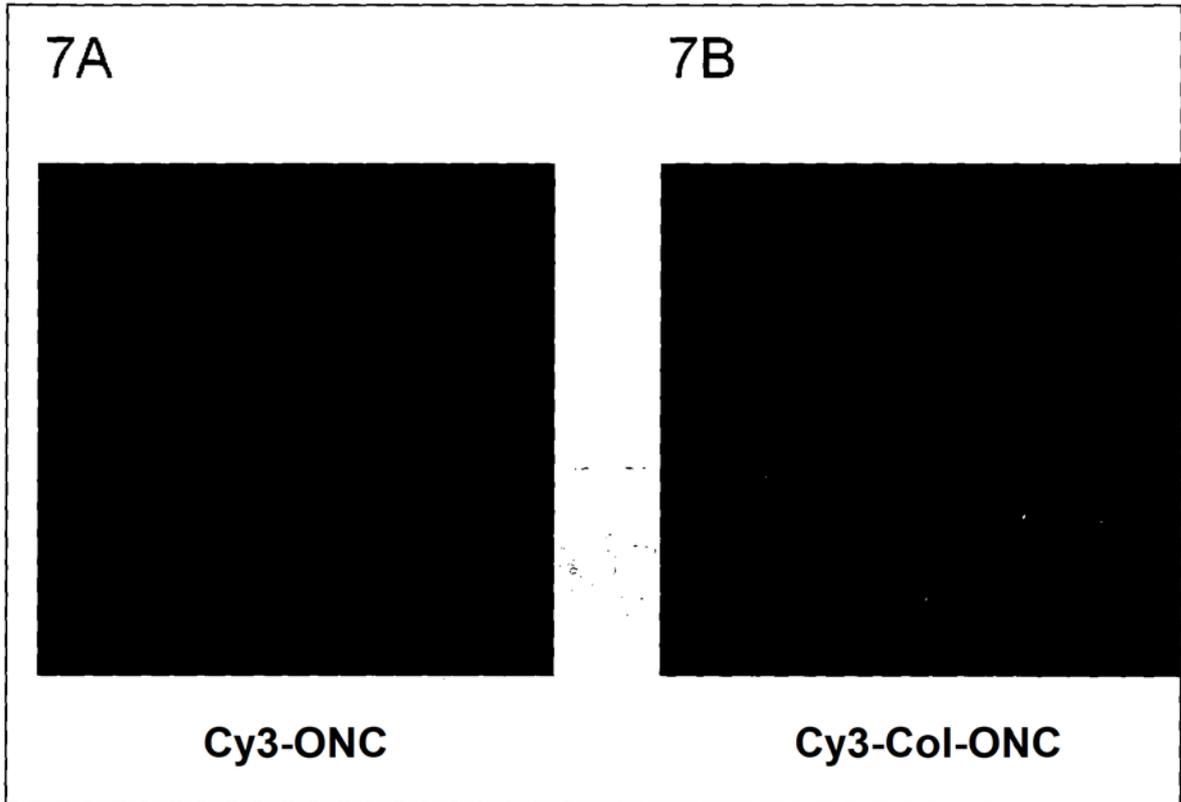
[Fig. 5]



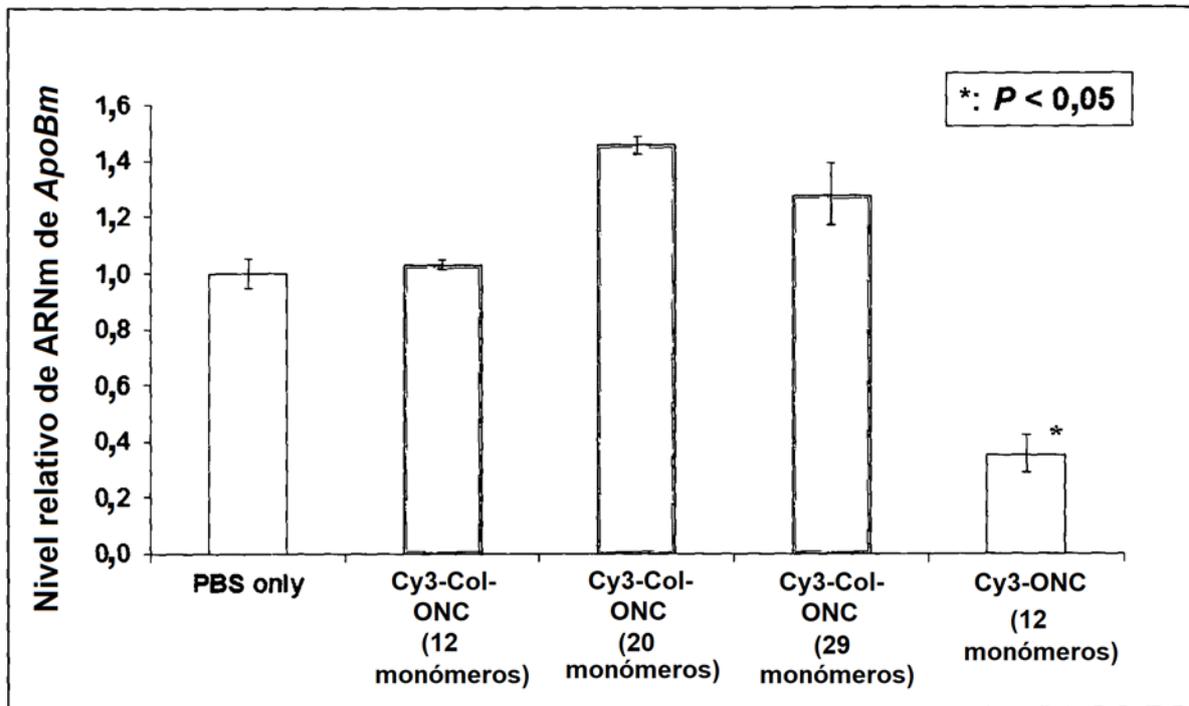
[Fig. 6]



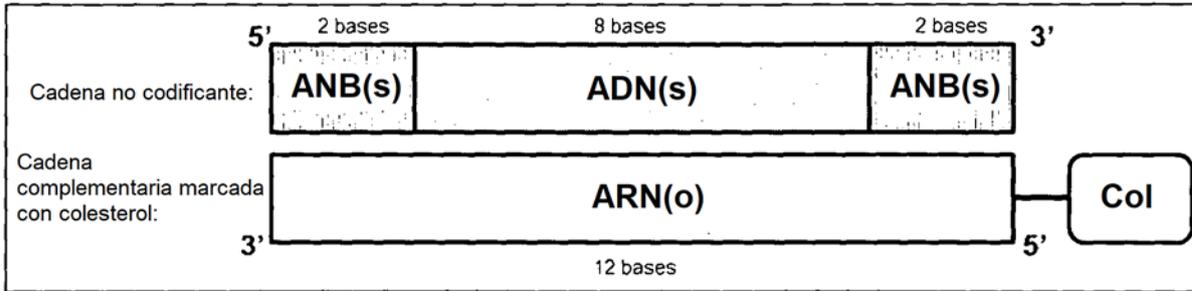
[Fig. 7]



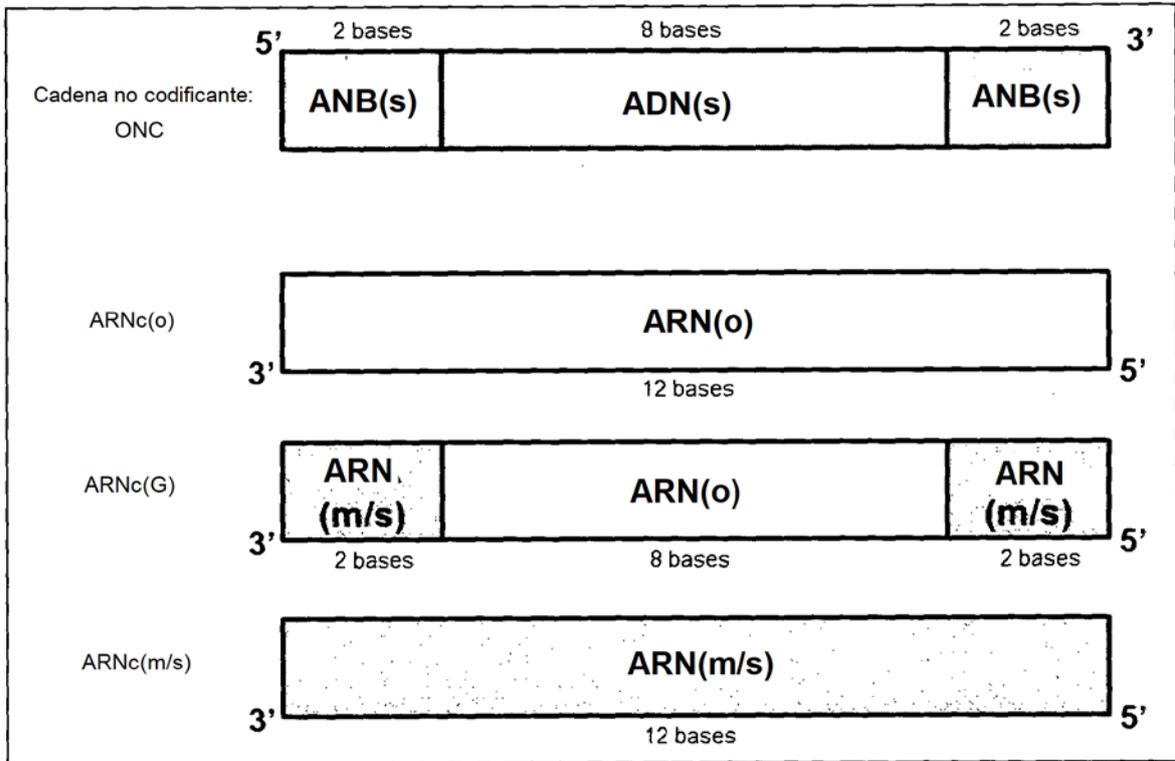
[Fig. 8]



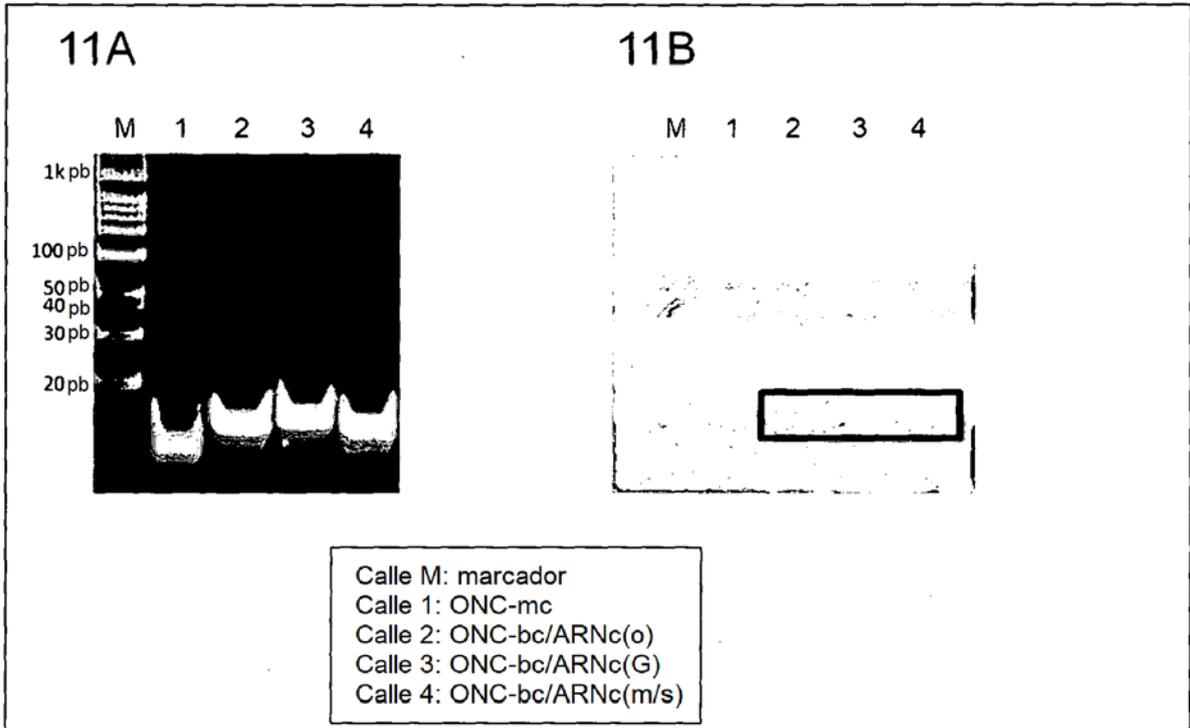
[Fig. 9]



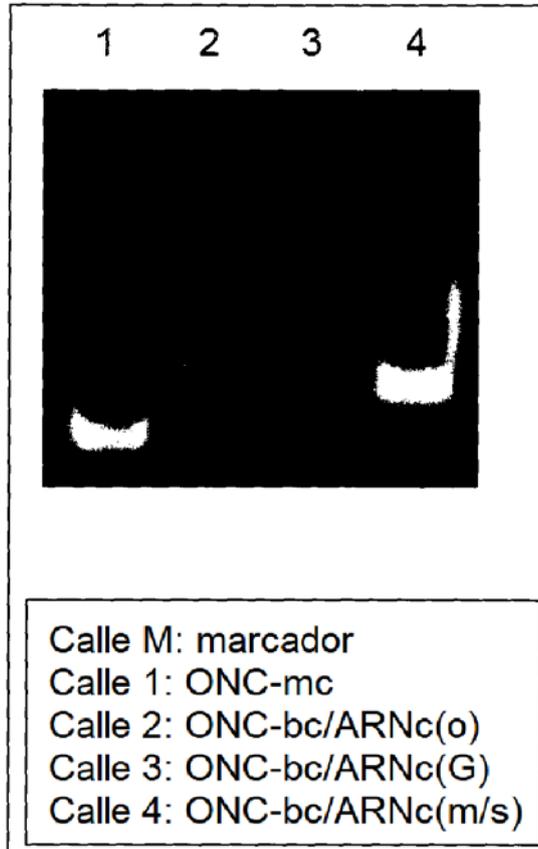
[Fig. 10]



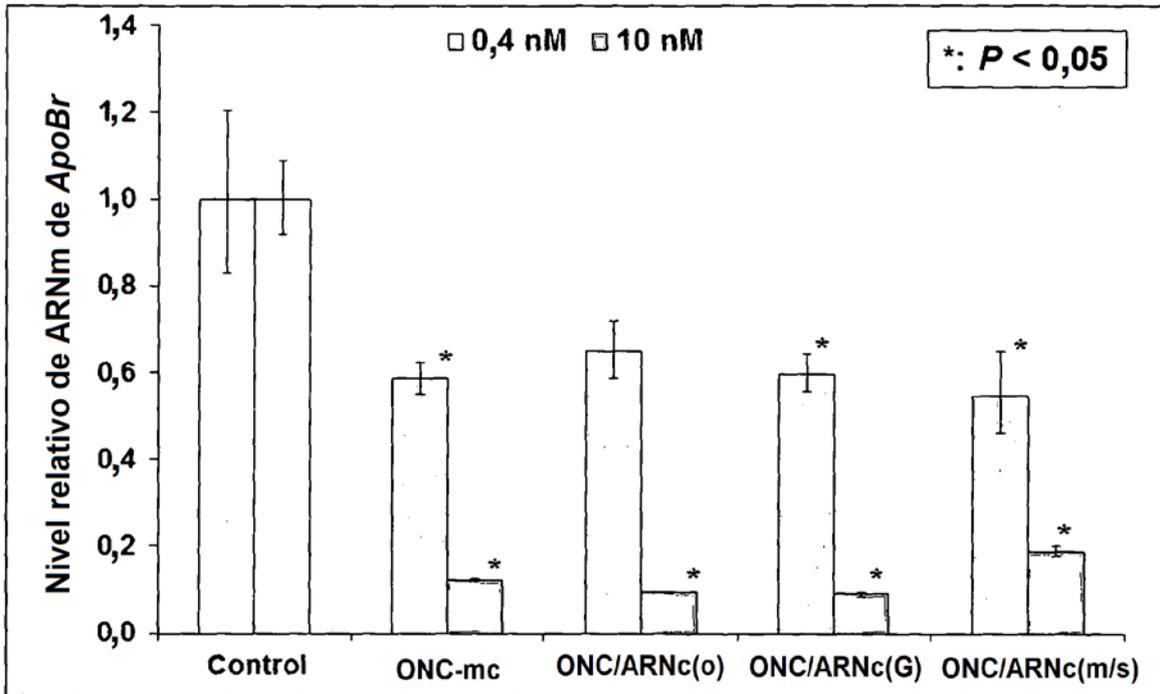
[Fig. 11]



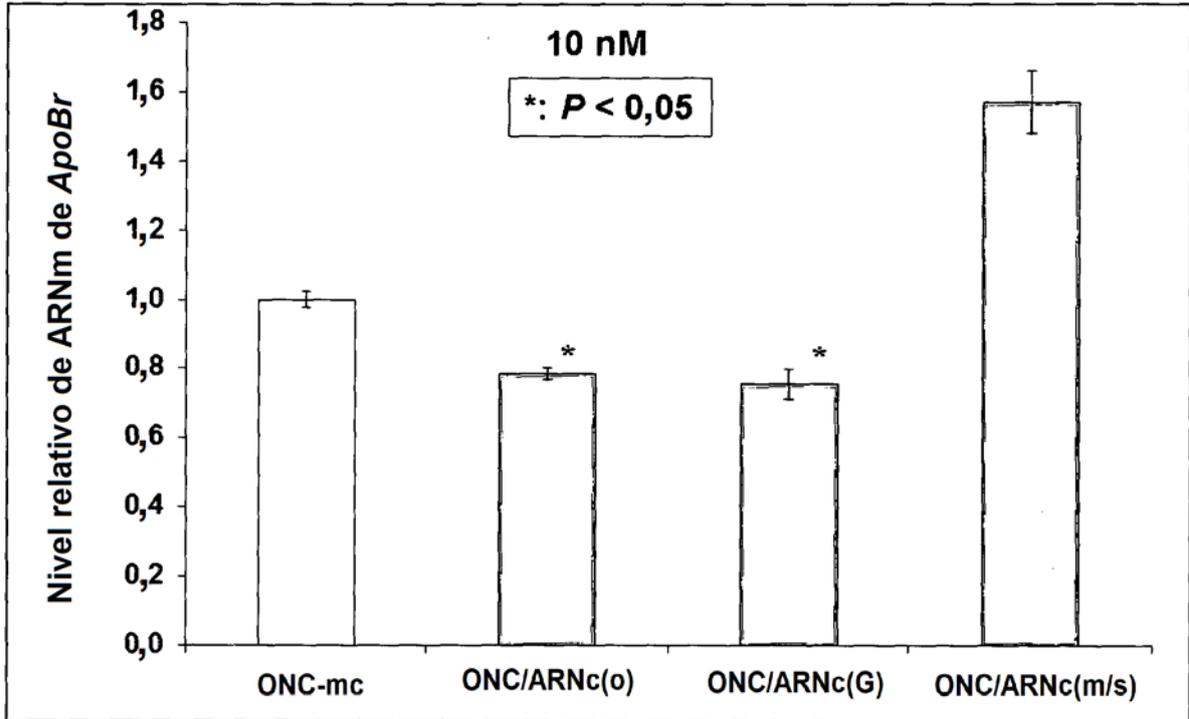
[Fig. 12]



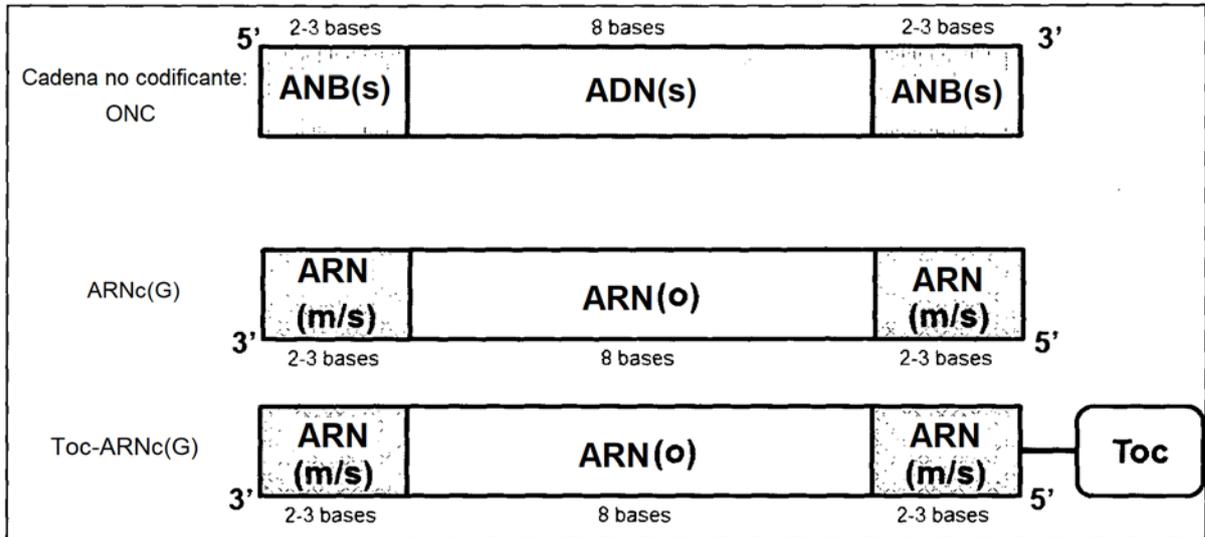
[Fig. 13]



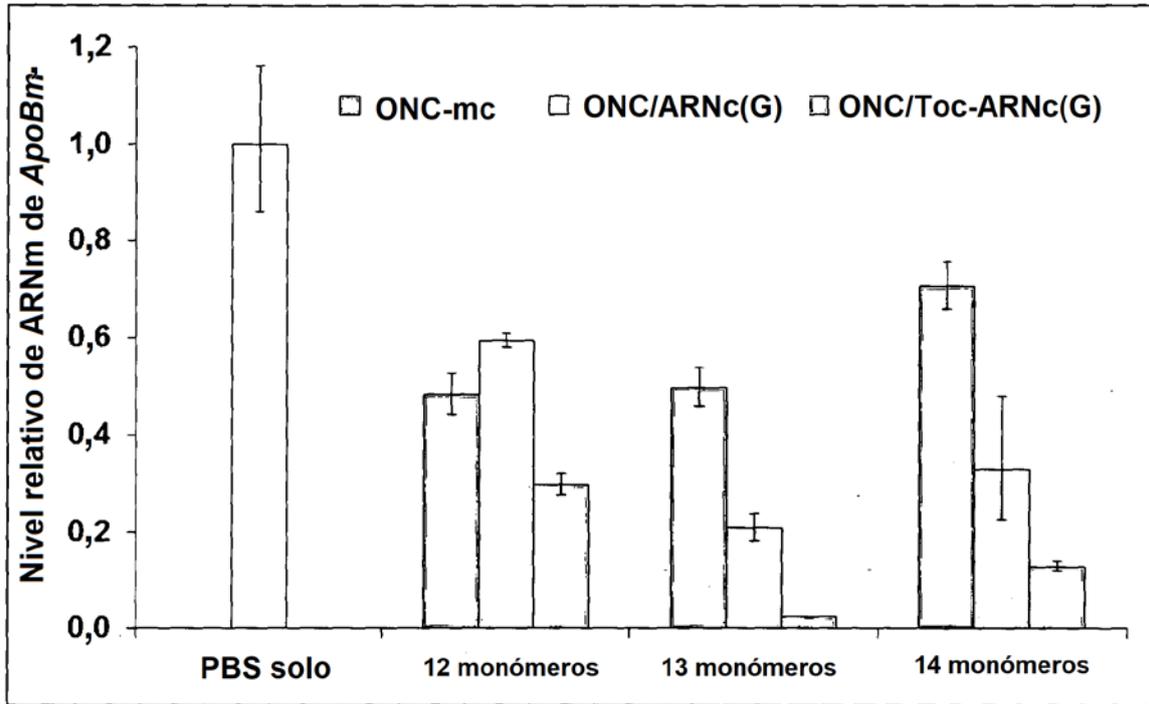
[Fig. 14]



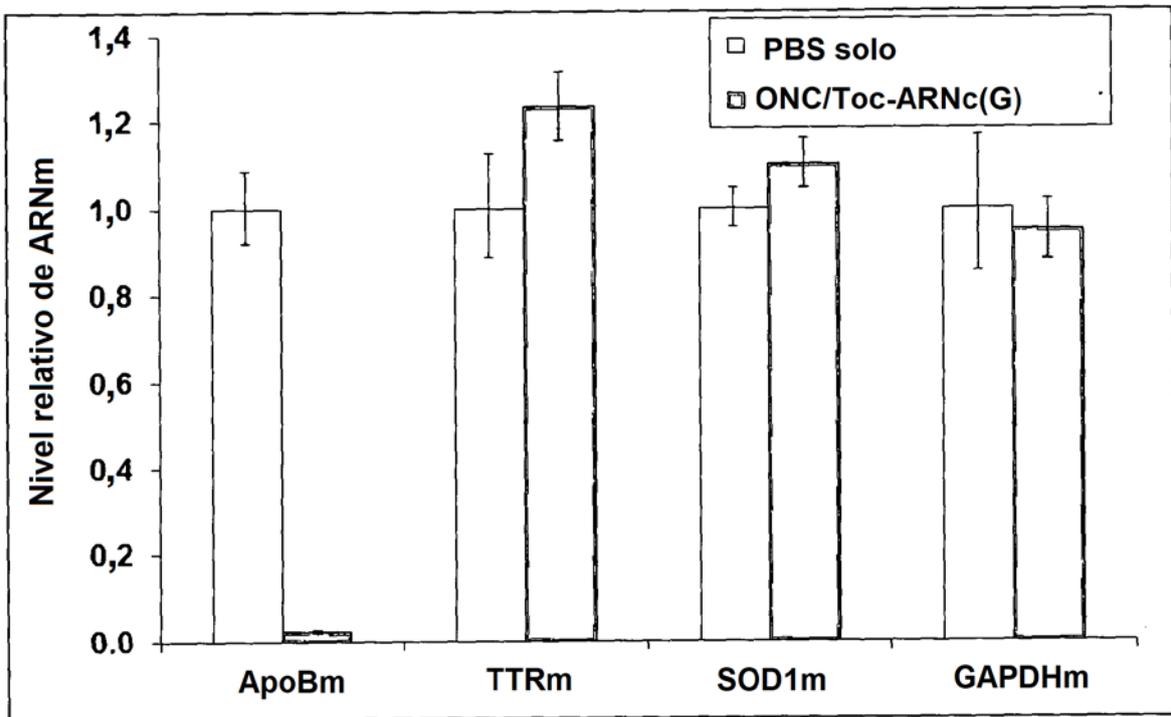
[Fig. 15]



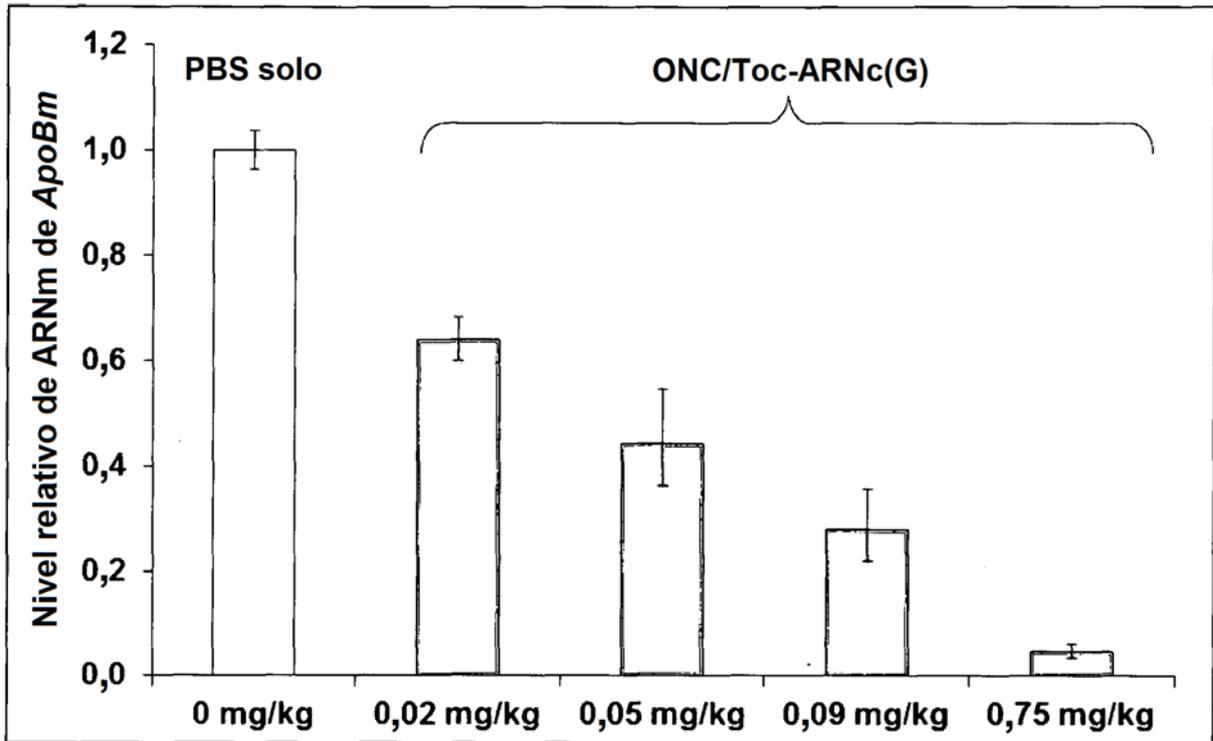
[Fig. 16]



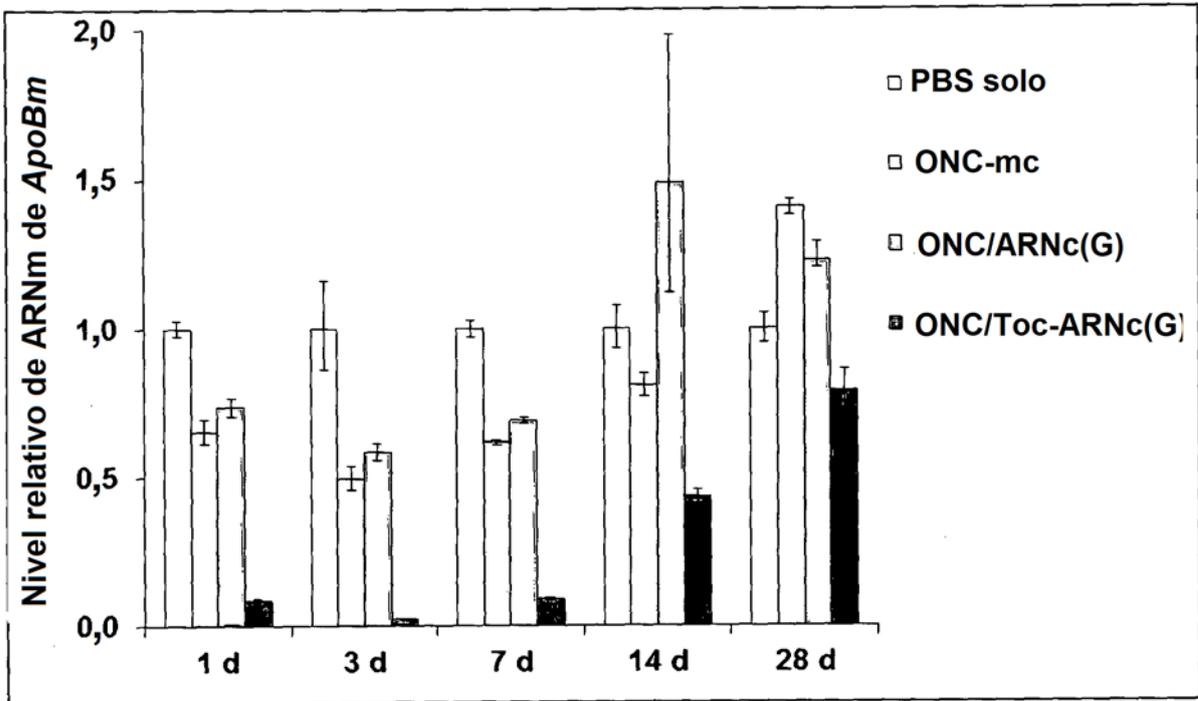
[Fig. 17]



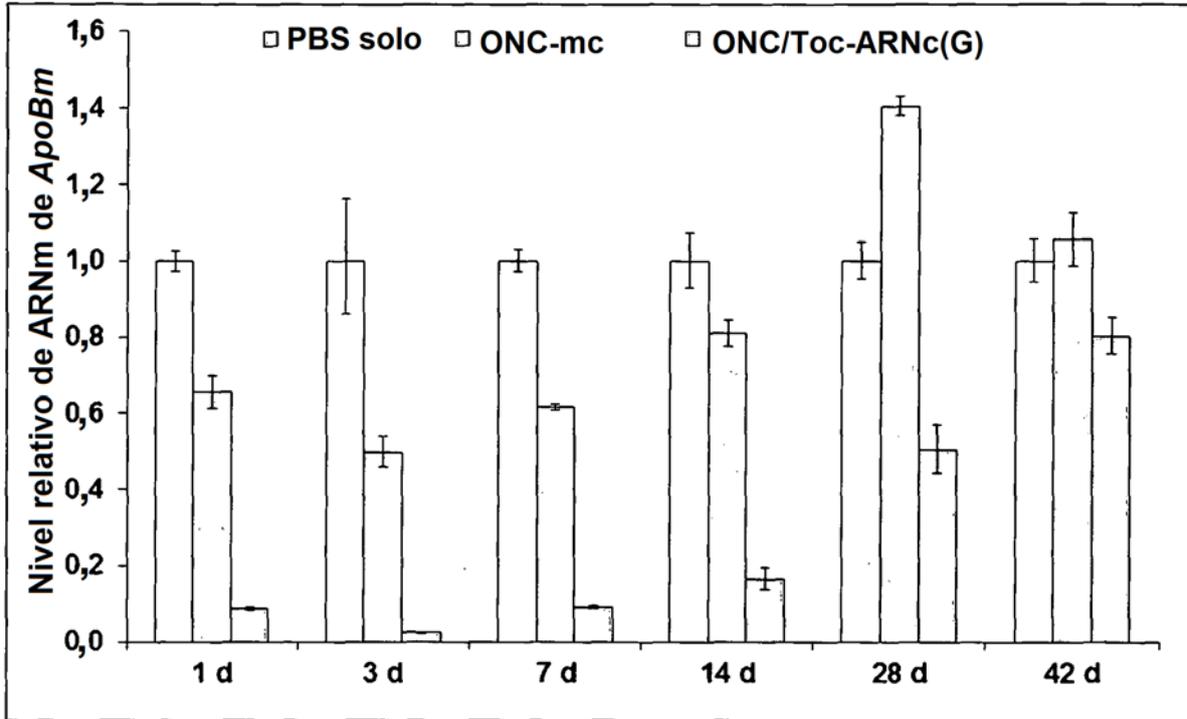
[Fig. 18]



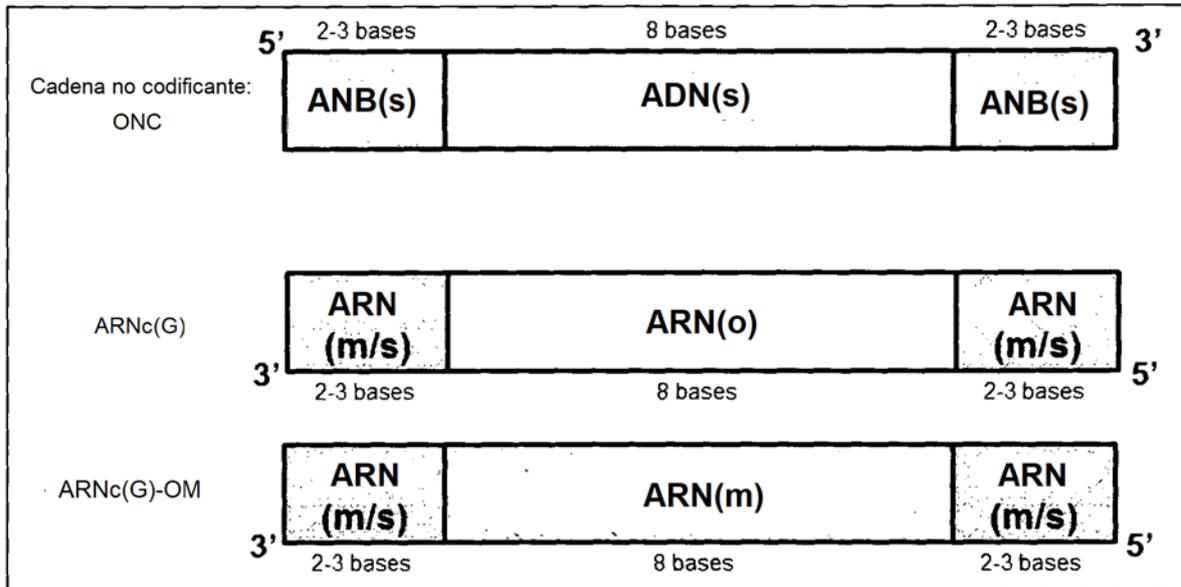
[Fig. 19A]



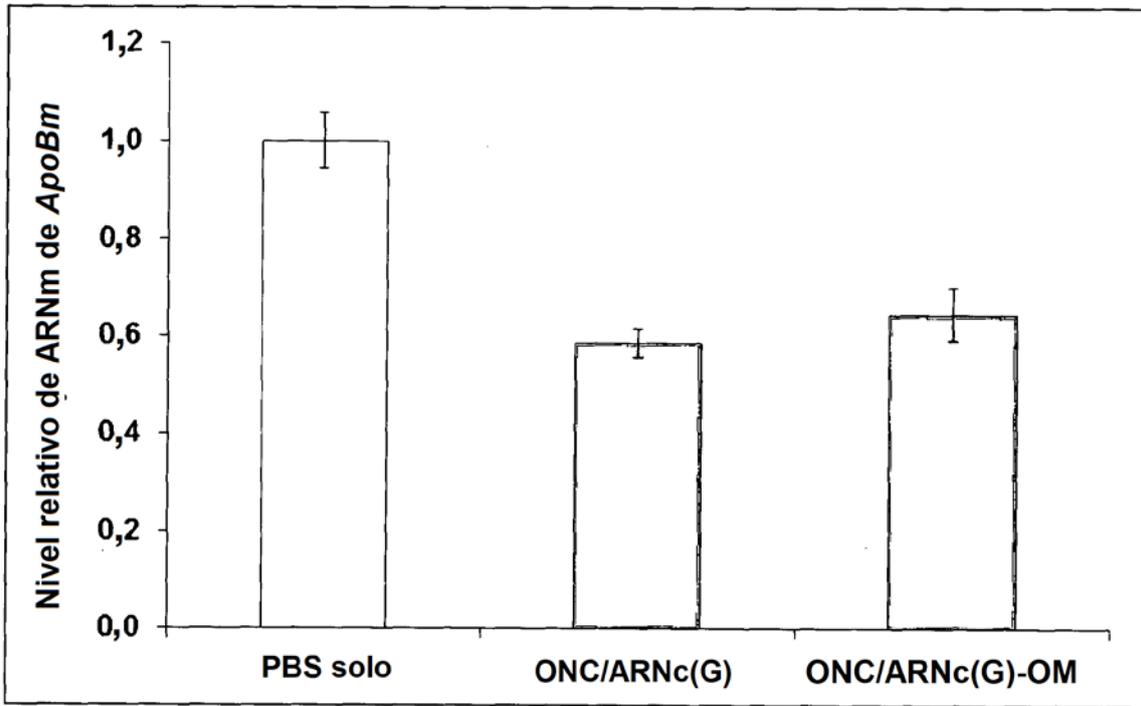
[Fig. 19B]



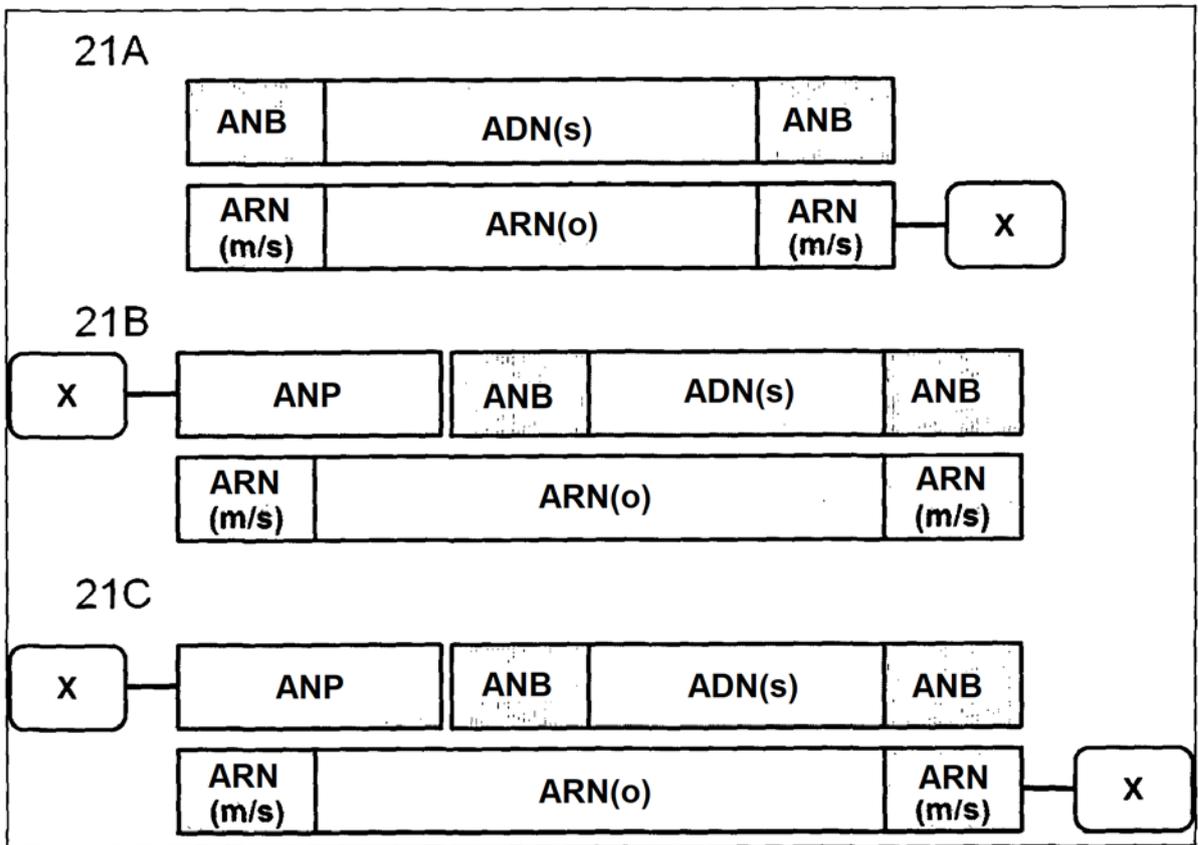
[Fig.20A]



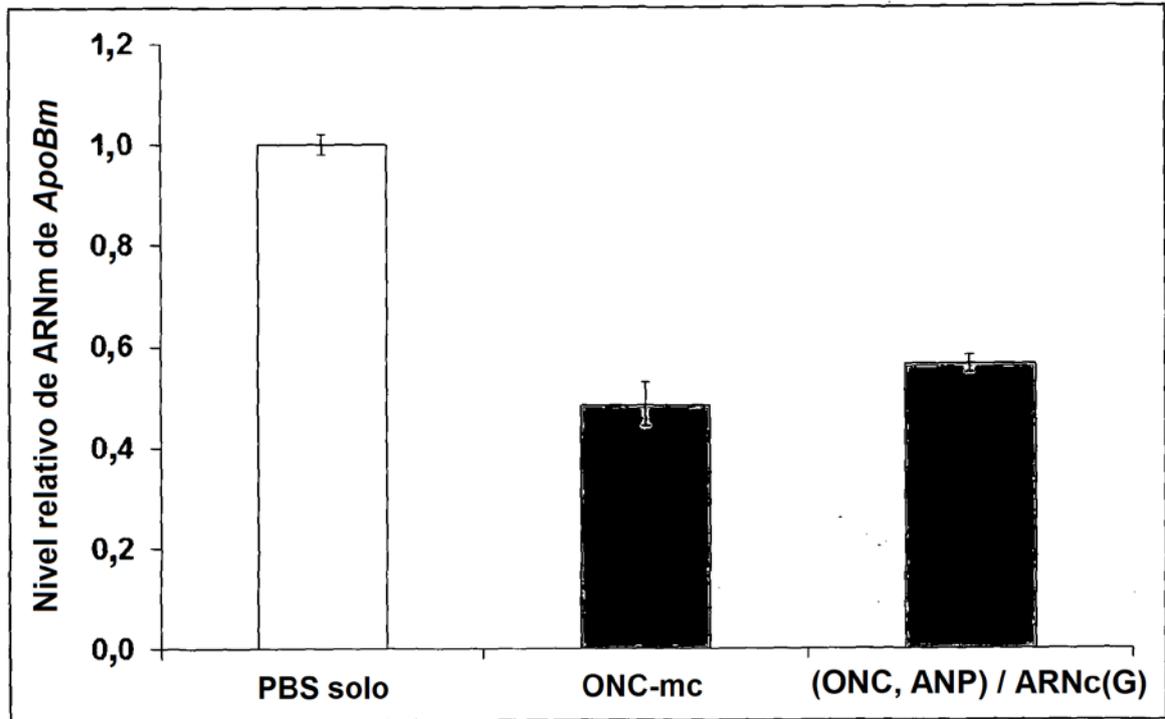
[Fig.20B]



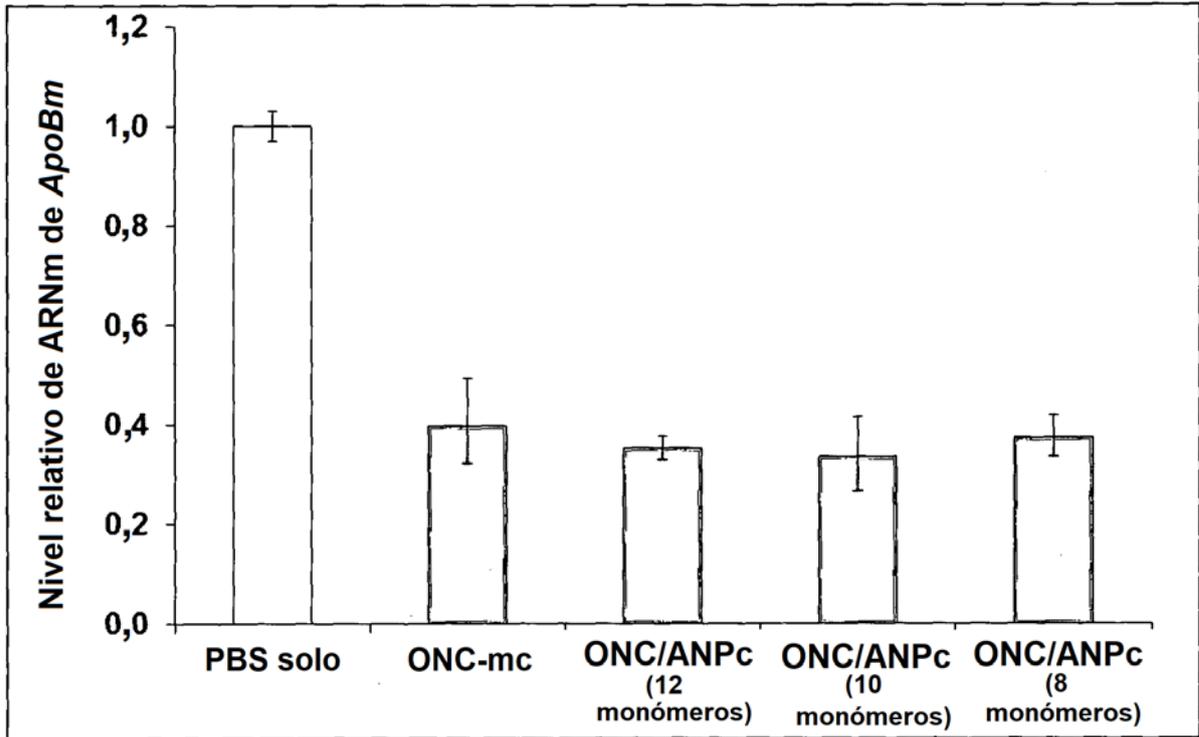
[Fig.21]



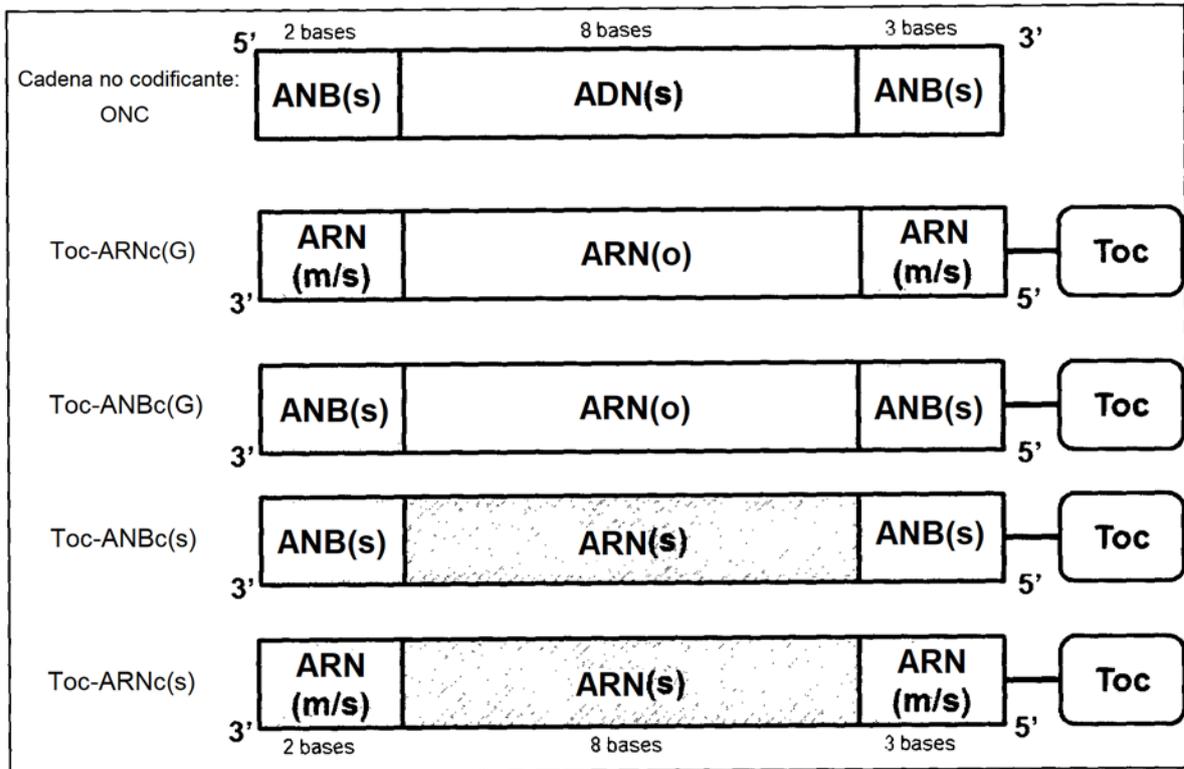
[Fig. 22]



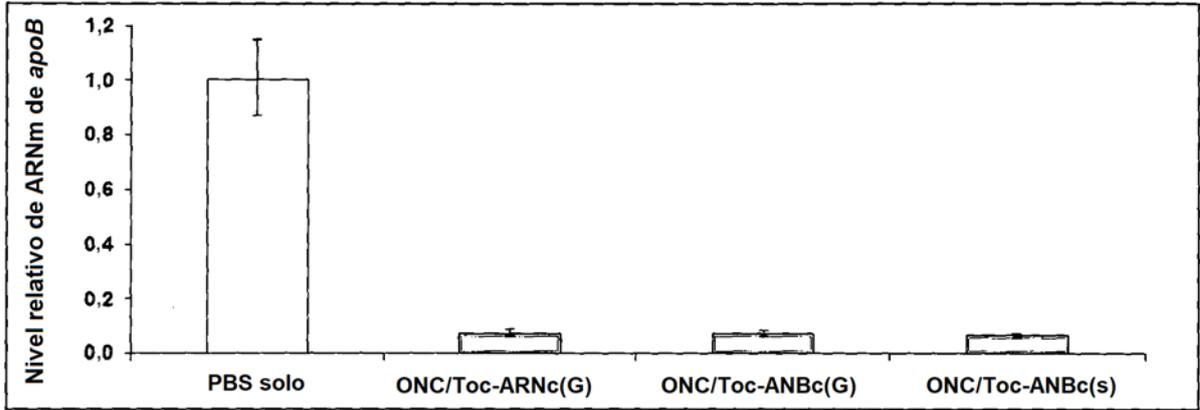
[Fig.23]



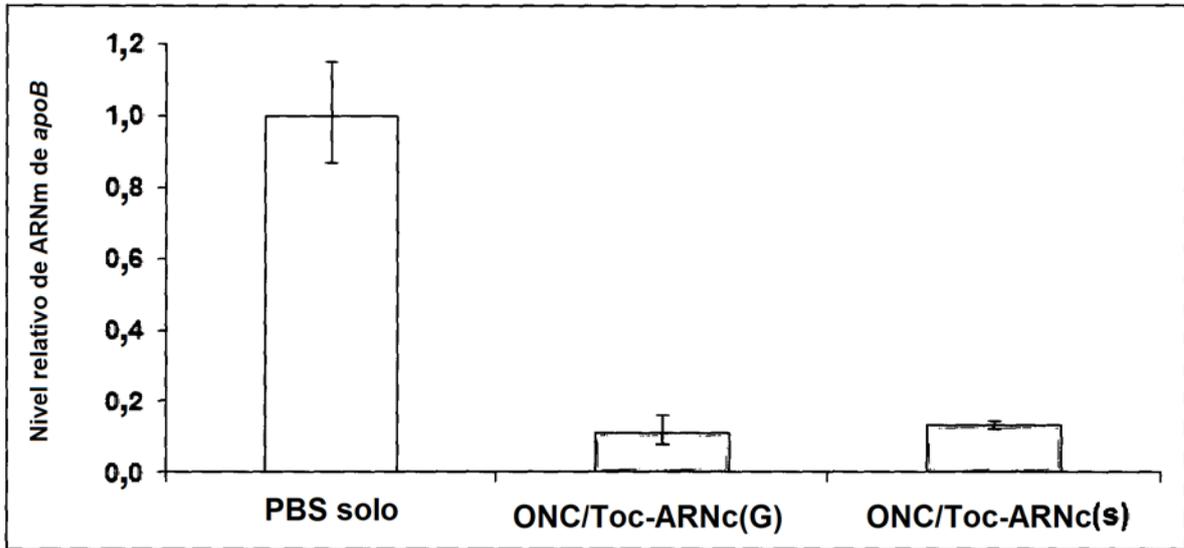
[Fig.24]



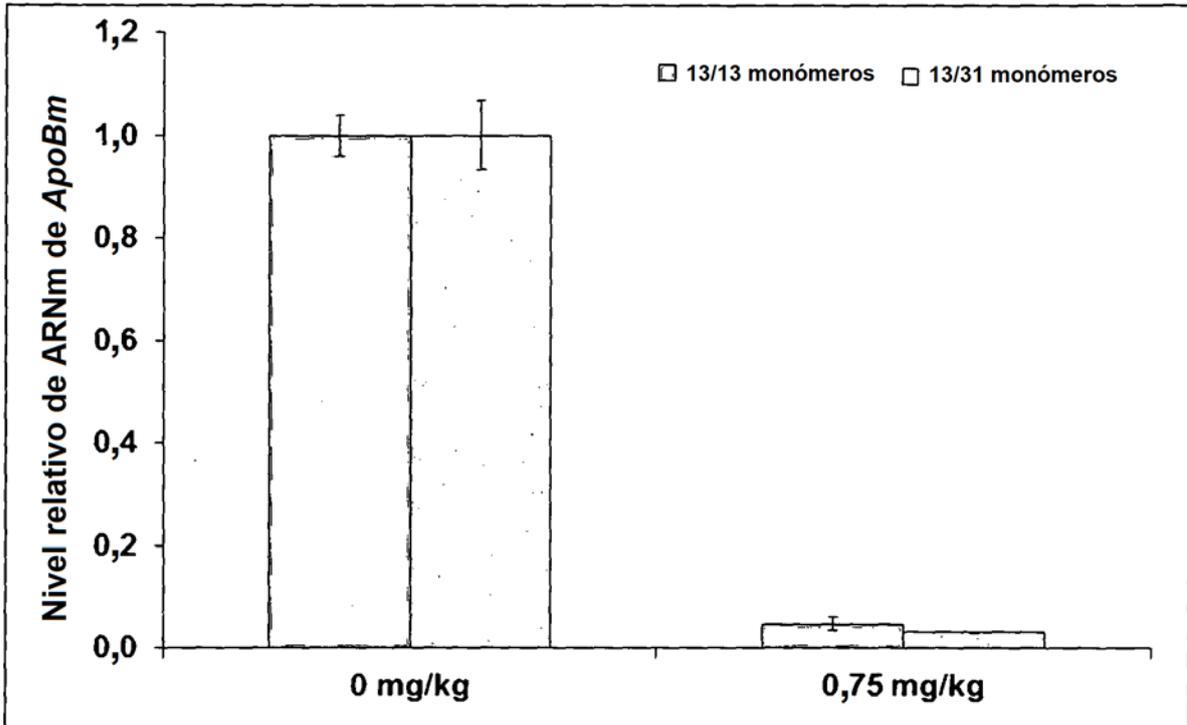
[Fig.25A]



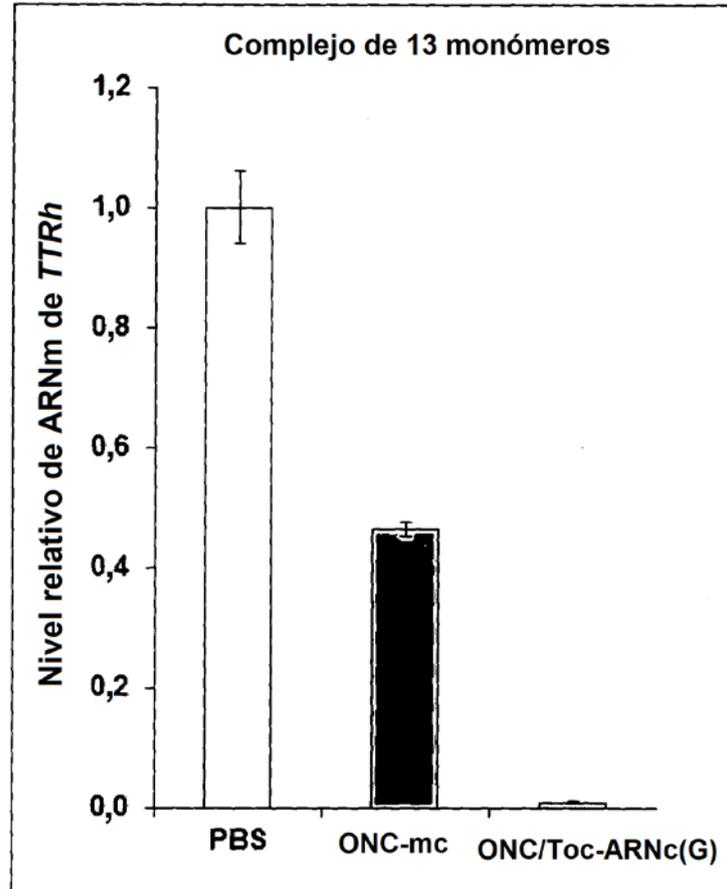
[Fig.25B]



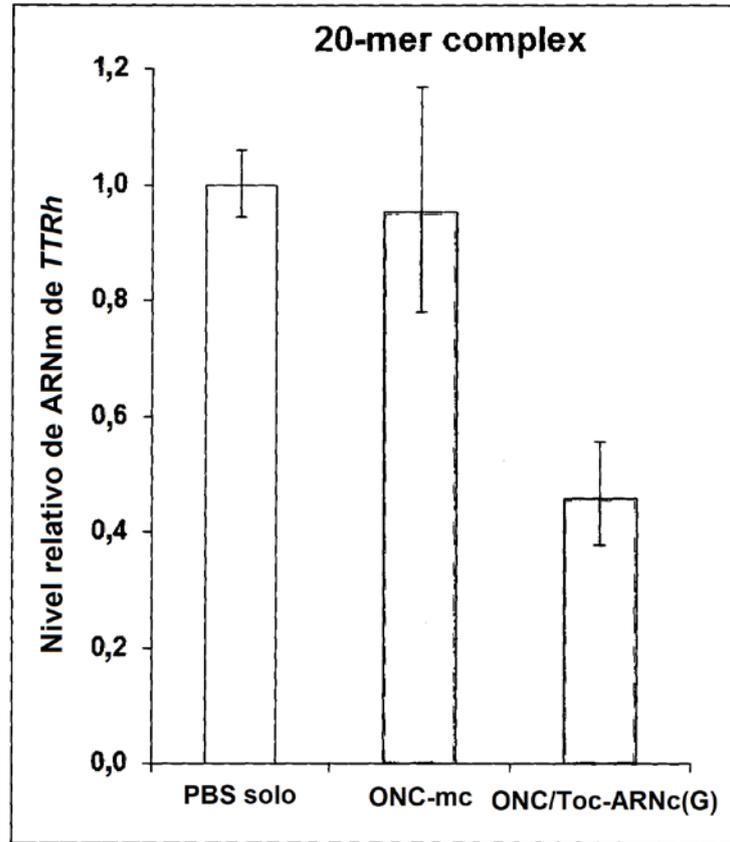
[Fig.26]



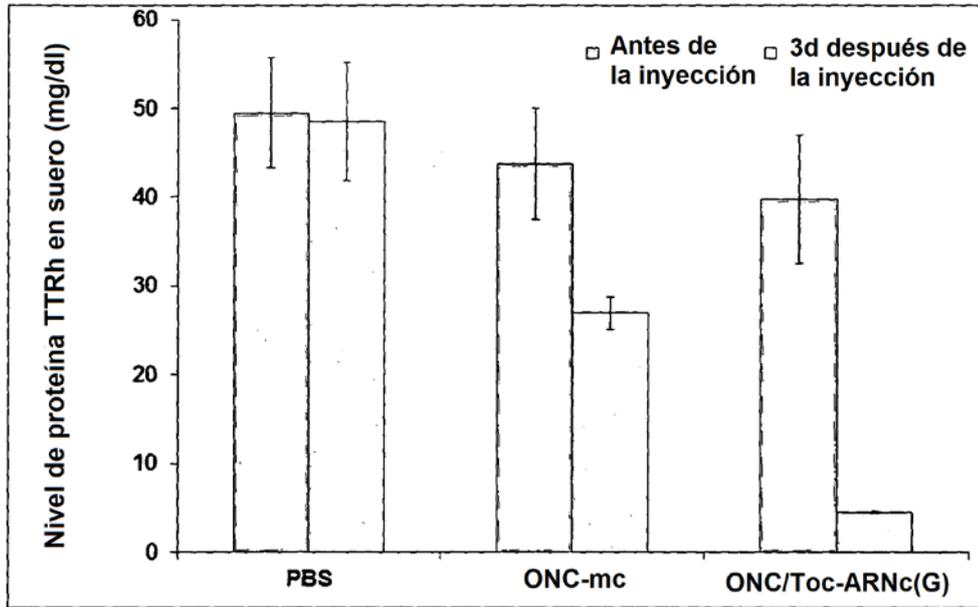
[Fig.27A]



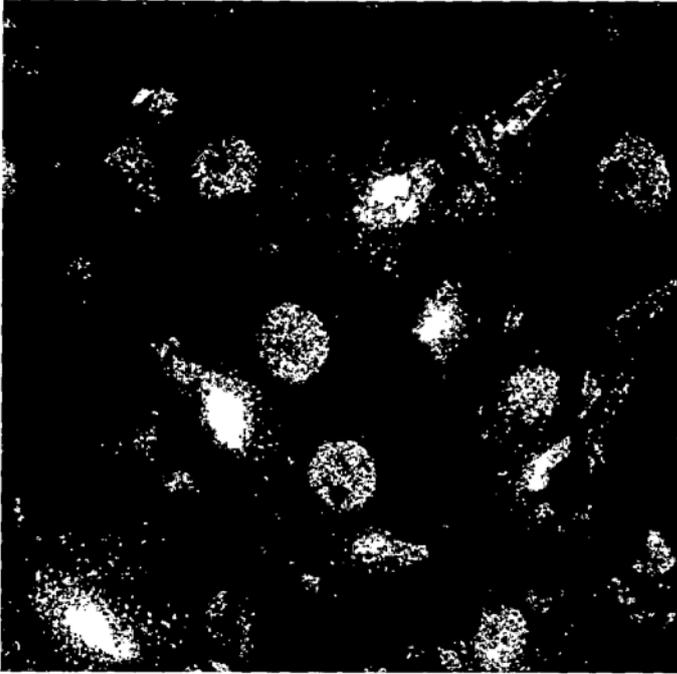
[Fig.27B]



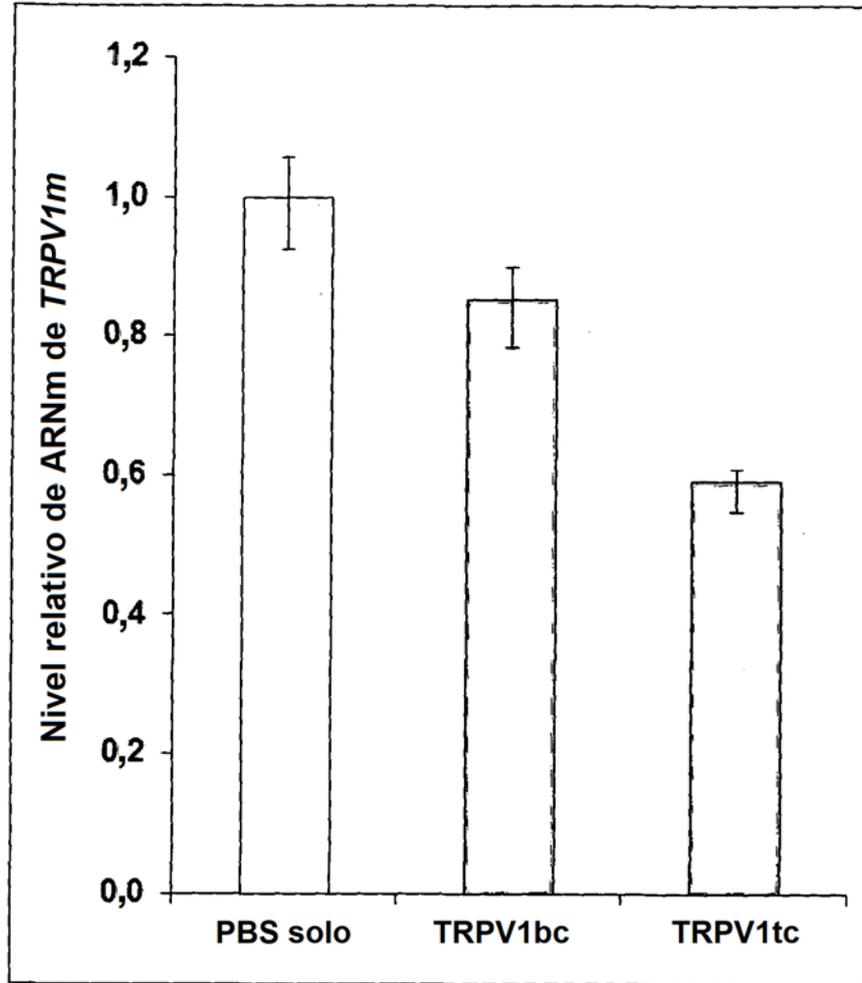
[Fig.28]



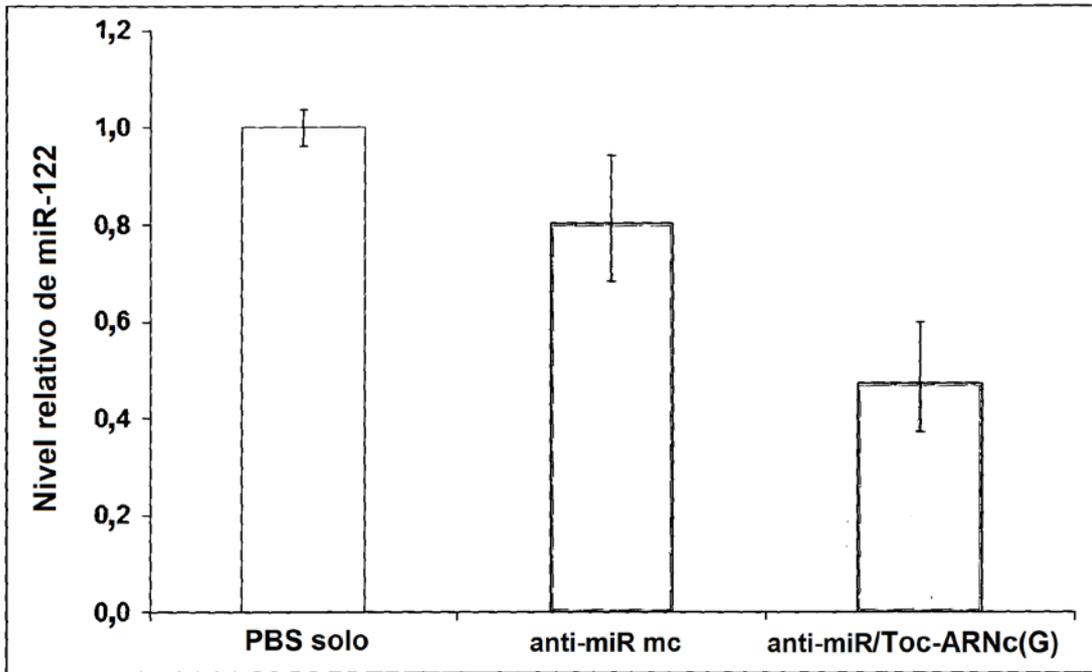
[Fig.29]



[Fig.30]



[Fig.31]



[Fig.32]

