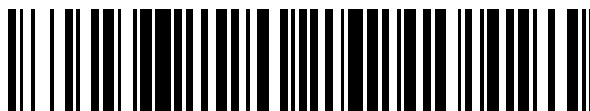


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 003**

51 Int. Cl.:

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: **25.11.2010** **PCT/US2010/058123**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2011** **WO11066475**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2010** **E 10785571 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019** **EP 2504435**

54 Título: **Compuestos de ARNip que comprenden sustituciones terminales**

30 Prioridad:

26.11.2009 US 264668 P

17.01.2010 US 295721 P

09.08.2010 US 372072 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
07.05.2020

73 Titular/es:

QUARK PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)

7999 Gateway Boulevard, Suite 310

Newark, CA 94560, US

72 Inventor/es:

AVKIN-NACHUM, SHARON

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 759 003 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos de ARNip que comprenden sustituciones terminales

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de ARNip modificados, composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos y estos compuestos para su uso en métodos para la inhibición de la expresión génica. Los compuestos y composiciones exhiben propiedades beneficiosas que incluyen la actividad de silenciamiento de genes diana y son útiles en el tratamiento de sujetos que padecen enfermedades o afecciones y/o síntomas asociados con dichas enfermedades o afecciones o en riesgo de contraer enfermedades o afecciones en las que la expresión génica tiene consecuencias adversas.

15 Antecedentes de la invención

Las publicaciones de patentes PCT núms. WO 2008/104978 y WO 2009/044392 del solicitante de la presente invención describen nuevas estructuras de ARNip.

20 Ui-Tei y otros (Nucleic Acids Research, vol. 36 (2008), páginas 2136-2151) describen la sustitución de ribonucleótidos en ARNip con sus desoxirribonucleótidos cognados.

Huang y otros (Nucleic Acids Research, vol. 37, (2009), páginas 7560-7569) describen mutaciones puntuales en las posiciones internas de la hebra no codificante de los ARNip.

25 Du y otros (Nucleic Acids Research, vol. 33, (2005), páginas 1671-1677) describen falta de coincidencia entre la hebra no codificante de un ARNip y su sitio diana, y recomienda la formación de un par de bases por balanceo G:U.

El documento WO 2005/001043 describe métodos y composiciones para mejorar la eficacia y especificidad del ARNip y recomienda disminuir la fuerza del par de bases entre el terminal 5' de la hebra no codificante y el terminal 3' de la hebra codificante, mediante introducción, por ejemplo, de pares de bases con falta de coincidencia en el dúplex.

30 Ui-Tei y otros (Nucleic Acids Research, vol. 32, (2004), páginas 936-948) describen pautas para la selección de secuencias de ARNip altamente eficaces para la interferencia de ARN, y más específicamente cómo seleccionar una secuencia diana en un gen, de manera que pueda predecirse que el ARNip dirigido a esta secuencia seleccionada es altamente eficaz.

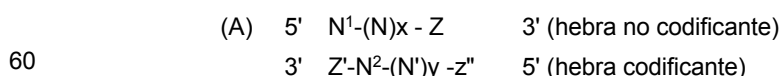
Se mantiene la necesidad de agentes terapéuticos de ARNip activos y eficaces que exhiban una mayor actividad de silenciamiento, mayor estabilidad y/o efectos reducidos fuera de la diana.

40 Resumen de la invención

Los compuestos de ARN bicatenarios (ARNbc) descritos en la presente descripción poseen estructuras y modificaciones que pueden, por ejemplo, aumentar la actividad, aumentar la estabilidad, reducir la inmunogenicidad, mejorar la carga en el complejo RISC y/o minimizar la toxicidad; las nuevas modificaciones de los ARNip se aplican beneficiosamente al ARN bicatenario útil para prevenir o atenuar la expresión génica diana.

En la presente descripción se proporcionan compuestos oligonucleotídicos bicatenarios (dúplex) útiles para la regulación negativa de la expresión génica. La presente descripción se basa en parte en la observación inesperada de que una molécula de ácido nucleico bicatenario, que comprende una hebra codificante y una hebra no codificante complementaria y que tiene una falta de coincidencia entre el nucleótido terminal 5' de la hebra no codificante y el nucleótido del ARN diana, muestra actividad potente en la regulación negativa de genes diana. En modalidades preferidas, el ARNbc comprende una adenosina, desoxiadenosina o una desoxiuridina, sustituida en la posición 1 (terminal 5') de la hebra no codificante en lugar de una citidina o guanina.

55 De acuerdo con un aspecto descrito, se modifican las moléculas de ácido nucleico bicatenario que tienen la estructura (A) que se expone más abajo:



en donde cada uno de N^2 , N y N' es un ribonucleótido no modificado o modificado, o un resto no convencional;
en donde cada uno de $(\text{N})_x$ y $(\text{N}')_{\text{y}}$ es un oligonucleótido en el cual cada N o N' consecutivo se une al N o N' adyacente por un enlace covalente;
en donde cada uno de x e y es independientemente un entero entre 17 y 39;

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

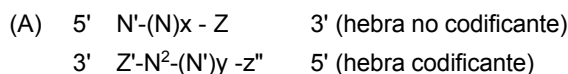
en donde N¹ está unido covalentemente a (N)x y y no coincide con el ARN diana o es un resto de ADN complementario al ARN diana;

en donde N¹ es un resto seleccionado del grupo que consiste en uridina natural o modificada, desoxirribouridina, ribotimidina, desoxirribotimidina, adenosina o desoxiadenosina;

en donde z'' puede estar presente o ausente, pero si está presente es un resto de caperuza unida covalentemente en el terminal 5' de N²-(N')y; y

en donde cada uno de Z y Z' independientemente está presente o ausente, pero si está presente es independientemente de 1-5 nucleótidos consecutivos, restos no nucleotídicos consecutivos o una combinación de los mismos unidos covalentemente en el terminal 3' de la hebra en la que está presente.

Más específicamente, la invención se dirige a una molécula de ácido nucleico bicatenario que tiene la estructura que se expone más abajo:



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

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

en donde cada uno de x=y=18;

en donde la secuencia de (N)x tiene complementariedad con una secuencia consecutiva en un ARN diana; y la secuencia of N²-(N')y es completamente complementaria a la secuencia de N'-(N)x;

en donde N¹ está enlazado covalentemente a (N)x y con falta de coincidencia con el ARN diana;

en donde:

cuando el nucleótido de apareamiento en el ARN diana es adenosina, la uridina en la posición 1 de la hebra no codificante se sustituye con un N¹ seleccionado de adenosina o desoxiadenosina; o

cuando el nucleótido de apareamiento en el ARN diana es citidina, la guanosina en la posición 1 de la hebra no codificante se sustituye con un N¹ seleccionado de adenosina, desoxiadenosina, o desoxiuridina; o

cuando el nucleótido de apareamiento en el ARN diana es guanosina, la citidina en la posición 1 de la hebra no codificante se sustituye con un N¹ seleccionado de adenosina o desoxiadenosina; o cuando el nucleótido de apareamiento en el ARN

diana es uridina, la adenosina en la posición 1 de la hebra no codificante se sustituye con un N¹ que es desoxiuridina;

en donde z'' puede estar presente o ausente, pero si está presente es un resto de caperuza unido covalentemente en el terminal 5' de N²-(N')y; y

en donde cada uno de Z y Z' independientemente está presente o ausente, pero si está presente es independientemente de 1-5 nucleótidos consecutivos, restos no nucleotídicos consecutivos o una combinación de los mismos unidos covalentemente en el terminal 3' de la hebra en la que está presente.

La secuencia de (N')y es completamente complementaria a la secuencia de (N)x. La secuencia de N²-(N')y es complementaria a la secuencia de N¹-(N)x. En algunas modalidades (N)x comprende una no codificante que es completamente complementaria a aproximadamente 17 a aproximadamente 18 nucleótidos consecutivos en un ARN diana. En otras modalidades (N)x comprende una secuencia no codificante que es sustancialmente complementaria a aproximadamente 17 a aproximadamente 18 nucleótidos consecutivos en un ARN diana.

En algunas modalidades, N¹ y N² forman un par de bases de Watson-Crick. En algunas modalidades N¹ y N² forman un par de bases distintas de las de Watson-Crick. En algunas modalidades, se forma un par de bases entre un ribonucleótido y un desoxirribonucleótido.

x=y=18.

N¹ está unido covalentemente a (N)x y tiene falta de coincidencia con el ARN diana.

En algunas modalidades una uridina en la posición 1 de la hebra no codificante se sustituye con un N¹ seleccionado de adenosina o desoxiadenosina.

En algunas modalidades la guanosina en la posición 1 de la hebra no codificante se sustituye con un N¹ seleccionado de adenosina, desoxiadenosina o desoxiuridina.

En algunas modalidades la citidina en la posición 1 de la hebra no codificante se sustituye con un N¹ seleccionado de adenosina o desoxiadenosina.

En algunas modalidades la adenosina en la posición 1 de la hebra no codificante se sustituye con un N¹ que es desoxiuridina.

En algunas modalidades, N¹ y N² forman un par de bases entre uridina o desoxiuridina y adenosina o desoxiadenosina. En otras modalidades, N¹ y N² forman un par de bases entre desoxiuridina y adenosina.

- 5 En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico bicatenario es un ARNip, ANip o un ARNmi. La siguiente tabla proporciona ejemplos de N1 y N2 correspondiente.

10	Nucleótido diana	nucleótido 5' terminal de AS con coincidencia completa con la diana	N1 (posición 5' terminal de AS)	N2 (posición 3' terminal de SEN)
	A	U	rA, dA	rU, dU, rT, dT
	C	G	rA, dA	rU, dU, rT, dT
15	C	G	dU	rA, dA
	G	C	rA, dA	rU, dU, rT, dT
	U	A	dU	rA, dA

- 20 En algunas modalidades de la estructura (A), N¹ comprende adenosina. En ciertas modalidades de la estructura (A), N² comprende un ribonucleótido modificado con 2'OMe azúcar. En algunas modalidades de la estructura (A), N¹ comprende adenosina y N² comprende una ribouridina o ribouridina modificada.

En algunas modalidades, Z y Z' están ausentes. En otras modalidades, uno de Z o Z' está presente.

- 25 En algunas modalidades, cada uno de N y N' es un ribonucleótido no modificado. En algunas modalidades, al menos uno de N o N' comprende un ribonucleótido modificado químicamente o un resto no convencional. En algunas modalidades, el resto no convencional se selecciona de un nucleótido espejo, un resto abásico de ribosa y un resto abásico de desoxirribosa. En algunas modalidades, el resto no convencional es un nucleótido espejo, preferentemente un resto de L-ADN. En algunas modalidades, al menos uno de N o N' comprende un ribonucleótido modificado con azúcar 2'OMe.

La secuencia de (N')y es completamente complementaria a la secuencia de (N)x.

- 35 En algunas modalidades (N)x comprende una secuencia no codificante que es completamente complementaria a aproximadamente 17 a aproximadamente 18 nucleótidos consecutivos en un ARNm diana. En otras modalidades (N)x comprende una secuencia no codificante que es sustancialmente complementaria a aproximadamente 17 a aproximadamente 18 nucleótidos consecutivos en un ARNm diana. x=y=18.

- 40 De acuerdo con ciertas modalidades preferidas, se proporcionan compuestos de ARNip que comprenden uno o más nucleótidos modificados, en donde el nucleótido modificado posee una modificación en el resto de azúcar, en el resto de la base o en el resto del enlace internucleotídico.

El motivo de la estructura (A) es útil con cualquier par de oligonucleótidos (hebras codificante y no codificante) para un gen de mamífero o no. En algunas modalidades, el gen de mamífero es un gen de ser humano.

- 45 En algunas modalidades, un compuesto de ARNip modificado que tiene la estructura (A) exhibe propiedades beneficiosas que incluyen la actividad mejorada (por ejemplo, IC50 reducida, silenciamiento aumentado, ARNm residual reducido) cuando se compara con un compuesto de control, es decir, un compuesto de ARNip en donde el oligonucleótido codificante es completamente complementario (que incluye la base nucleotídica 5' terminal hibridada, por ejemplo, A-U, U-A, C-G, G-C) a una secuencia de nucleótidos en un ARNm diana. En algunas modalidades, la actividad se potencia en al menos 5%, en al menos 10%, en al menos 20%, en al menos 25% o más cuando se compara con un compuesto de control.

- 55 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para generar una molécula de ARN bicatenario que consiste en una hebra codificante y una hebra no codificante que comprende las etapas de

- a) seleccionar una secuencia consecutiva de 17 a 25 nucleótidos en un ARN diana y sintetizar una hebra codificante que comprenda la complementariedad con la secuencia consecutiva de 17 a 25 nucleótidos del ARNm diana en donde el nucleótido 5' terminal de la hebra no codificante,
 60 si es uridina, se sustituye con adenosina o desoxiadenosina; o
 si es guanosina, se sustituye con adenosina, desoxiadenosina, o desoxiuridina; o
 si es citidina, se sustituye con adenosina o desoxiadenosina; o
 si es adenosina, se sustituye con una desoxiuridina;

b) sintetizar una hebra codificante de 17 a 25 nucleótidos que tiene complementariedad con la hebra no codificante, en donde el nucleótido 3' terminal de la hebra codificante forma un par de bases de Watson Crick con el nucleótido 5' terminal de la hebra guía; e

5 c) hibridar las hebras codificante y no codificante; lo que genera de esta manera una molécula de ARN bicatenario.

De acuerdo con un aspecto, la presente descripción describe un método para generar una molécula de ARN bicatenario que consiste en una hebra codificante y una hebra no codificante que exhiben actividad de ARNi mejorada cuando se compara con una molécula de ARN bicatenario no modificada que comprende las etapas de

10 a) seleccionar una secuencia consecutiva de 17 a 25 nucleótidos en un ARNm diana y sintetizar una hebra codificante que comprende la secuencia consecutiva de 17 a 25 nucleótidos del ARNm diana en donde el nucleótido 3' terminal está sustituido con adenosina, adenosina modificada, desoxiadenosina o desoxiadenosina modificada;

15 b) sintetizar una hebra no codificante de 17 a 25 nucleótidos que tiene complementariedad con la hebra codificante en donde el nucleótido 5' terminal comprende ribouridina, ribouridina modificada, desoxirribouridina o desoxirribouridina modificada y pares de bases con el nucleótido 3' terminal de la hebra acompañante;

20 c) hibridar la hebra codificante con la hebra no codificante; lo que genera de esta manera una molécula de ARN bicatenario que tiene una actividad de ARNi mejorada.

En algunas modalidades, la molécula de ARN bicatenario modificada exhibe una actividad de ARNi mejorada cuando se compara con un dúplex de ARNip no modificado, es decir, un dúplex que tiene una coincidencia completa con el ARNm diana.

25 De acuerdo con otro aspecto, la presente descripción describe un método para generar una molécula de ARN bicatenario que consiste en una hebra codificante y una hebra no codificante que exhiben actividad de ARNi mejorada cuando se compara con una molécula de ARN bicatenario no modificada que comprende las etapas de

30 a) seleccionar una secuencia consecutiva de 17 a 25 nucleótidos en un ARNm diana y sintetizar una hebra codificante que comprende la secuencia consecutiva de 17 a 25 nucleótidos del ARNm diana en donde el nucleótido 3' terminal está sustituido con adenosina, adenosina modificada, desoxiadenosina o desoxiadenosina modificada;

35 b) sintetizar una hebra no codificante de 17 a 25 nucleótidos que tiene complementariedad con la hebra codificante en donde el nucleótido 5' terminal comprende ribouridina, ribouridina modificada, desoxirribouridina o desoxirribouridina modificada y pares de bases con el nucleótido 3' terminal de la hebra codificante;

40 c) hibridar la hebra codificante con la hebra no codificante; lo que genera de esta manera una molécula de ARN bicatenario que tiene una actividad de ARNi mejorada.

En algunas modalidades, la etapa a) incluye seleccionar una secuencia de 17 a 25 nucleótidos consecutivos, o secuencia de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos en un ARN diana en una célula diana en donde el nucleótido 3' terminal es distinto de adenosina.

45 En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la estructura (A), en una cantidad eficaz para inhibir la expresión génica de mamíferos o no mamíferos; y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, el gen de mamífero es un gen de ser humano. En algunas modalidades, el gen que no es de mamífero está implicado en una enfermedad de mamíferos, preferentemente una enfermedad de seres humanos.

50 Además se proporcionan compuestos para usar en métodos para tratar o prevenir la incidencia o gravedad de una enfermedad o afección y/o para reducir el riesgo o la gravedad de una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesite, en donde la enfermedad o afección y/o un síntoma y/o riesgo asociado con esto está asociado con la expresión de un gen mamífero o no. En una modalidad preferida, el sujeto es un ser humano.

55 En algunas modalidades, la enfermedad o afección se selecciona del grupo de pérdida de audición, insuficiencia renal aguda (ARF), función de injerto retardado (DGF) después del trasplante de riñón, glaucoma, afecciones isquémicas oculares que incluyen neuropatía óptica isquémica anterior, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), neuropatía óptica isquémica (ION), síndrome del ojo seco, síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) y otras lesiones pulmonares y respiratorias agudas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), falla primaria del injerto, lesión por isquemia-reperfusión, lesión por reperfusión, edema de reperfusión, disfunción de aloinjerto, respuesta de reimplante pulmonar y/o disfunción primaria del injerto (PGD) después del trasplante de órganos, en particular en el trasplante de pulmón, trasplante de órganos, que incluyen el trasplante de pulmón, hígado, corazón, páncreas y riñón, nefro y neurotoxicidad, lesión de la médula espinal, lesión cerebral, enfermedad o afección neurodegenerativa, úlceras por presión, mucositis oral, afecciones fibróticas, que incluyen fibrosis hepática, fibrosis pulmonar; y cáncer. Dichos

métodos implican administrar a un mamífero que necesita dicho tratamiento una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de uno o más de dichos compuestos, que inhiben o reducen la expresión o actividad de al menos uno de dichos genes.

5 Los compuestos, métodos, materiales y ejemplos que se describirán ahora son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes; pueden usarse materiales y métodos similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción en la práctica o en las pruebas de la invención. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.

10 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un diagrama de las moléculas de ARNbc como se proporcionan en la presente descripción. En una modalidad, el nucleótido G o C 5' terminal de la hebra no codificante está sustituido con U, dU, rA, dA, rT, dT; o el nucleótido U 5' terminal de la hebra no codificante está sustituido con dU, rA, dA, rT, dT; o el nucleótido A 5' terminal de la hebra no codificante se sustituye con U, dU, dA, rT, dT. En una modalidad, el nucleótido 5' terminal de la hebra no codificante no coincide con el ARNm diana. En otra modalidad, el nucleótido 5' terminal de la hebra no codificante es un desoxirribonucleótido complementario al ARNm diana.

Las Figuras 2-10 muestran gráficos de barras de actividad (% residual de la diana restante) de moléculas de ARNbc con diferentes nucleótidos en la posición 1 de la hebra no codificante con dianas que se han modificado para incluir individualmente los cuatro ribonucleótidos en la posición 19 (posición 1 de AS).

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención se refiere en general a compuestos de oligonucleotídicos que regulan negativamente la expresión de diversos genes, particularmente a pequeños ARN interferentes (ARNip), específicamente a compuestos de ARNip modificados y al uso de estos compuestos de ARNip modificados en la preparación de composiciones farmacéuticas y en el tratamiento de un sujeto que padece diversas afecciones médicas.

30 Los compuestos y composiciones exhiben propiedades beneficiosas que incluyen la actividad potente de silenciamiento de genes diana y son útiles en el tratamiento de sujetos que padecen enfermedades o afecciones y/o síntomas asociados con dichas enfermedades o afecciones o en riesgo de contraer enfermedades o afecciones en las que la expresión génica tiene consecuencias adversas.

35 Por consiguiente, en ciertos aspectos se proporcionan compuestos de ARNip modificado y composiciones farmacéuticas que los comprenden, útiles en la regulación negativa de la expresión génica.

En otro aspecto, la presente descripción describe un método para tratar a un sujeto que padece o es susceptible a un trastorno microvascular, enfermedad o trastorno ocular, discapacidad auditiva (que incluye la pérdida auditiva), un trastorno respiratorio (que incluye pulmonar), enfermedad o trastorno neurodegenerativo, lesión de la médula espinal, condiciones relacionadas con la lesión cerebral y la angiogénesis y la apoptosis que comprenden administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende al menos un ARN interferente pequeño de la invención que se dirige a un gen de mamífero o no, en una cantidad suficiente para regular negativamente la expresión del gen.

45 En ciertas modalidades, los compuestos en cuestión son útiles para inhibir la expresión de un gen diana para el tratamiento de *entre otros*, trastornos respiratorios, trastornos microvasculares o trastornos oculares. Las enfermedades y afecciones particulares a tratar son ARDS; COPD; ALI; enfisema; neuropatía diabética, nefropatía y retinopatía; DME y otras afecciones diabéticas; glaucoma; AMD; retinopatía BMT; afecciones isquémicas que incluyen derrame cerebral; OIS; trastornos neurodegenerativos tales como Parkinson, Alzheimer, ALS; trastornos renales: ARF, DGF, rechazo al trasplante; trastornos de la audición; lesiones de la médula espinal; mucositis oral; cáncer, síndrome de ojo seco y úlceras por presión.

Definiciones

55 Por conveniencia, determinados términos empleados en la descripción, ejemplos y reivindicaciones se describen en la presente.

Cabe señalar que tal como se usan en la presente, las formas singulares "un", "uno", "una", y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Cuando se describen los aspectos o modalidades de la invención en términos de grupos de Markush u otra agrupación de alternativas, aquellos con experiencia en la materia reconocerán que la invención se describe también de este modo en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo.

65 Un "inhibidor" es un compuesto que es capaz de reducir (parcial o completamente) la expresión de un gen o la actividad del producto de dicho gen en un grado suficiente para conseguir un efecto biológico o fisiológico deseado. El término "inhibidor" como se usa en la presente se refiere a un inhibidor de ARNip. Un "inhibidor de ARNip" es un compuesto que

es capaz de reducir la expresión de un gen o la actividad del producto de ese gen en un grado suficiente para conseguir un efecto biológico o fisiológico deseado. El término "inhibidor de ARNip" como se usa en la presente se refiere a uno o más de un ARNip, ARNhp, NAip, ARNhp sintético; ARNmi. La inhibición también puede denominarse regulación negativa o, para el ARNi, silenciamiento.

El término "inhibir" como se usa en la presente se refiere a la reducción de la expresión de un gen o de la actividad del producto de dicho gen en un grado suficiente para conseguir un efecto biológico o fisiológico deseado. La inhibición es completa o parcial.

Como se usa en la presente, el término "inhibición" de un gen diana significa la inhibición de la expresión génica (transcripción o traducción) o de la actividad polipeptídica del producto de un gen diana. "Producto génico" como se usa en la presente, se refiere a un producto de un gen tal como un transcrito de ARN o un polipéptido. Los términos "transcripción de ARN", "secuencia de polinucleótidos de ARNm", "secuencia de ARNm" y "ARNm" se usan indistintamente.

Como se usa en la presente, los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" pueden usarse de manera intercambiable y se refieren a las secuencias de nucleótidos que comprenden el ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). Los términos deben entenderse también que incluyen, como equivalentes, análogos ya sea de ARN o ADN formados a partir de análogos de nucleótidos. A lo largo de esta descripción, las secuencias de ARNm se exponen en representación de los genes correspondientes.

"Oligonucleótido" u "oligómero" se refiere a una secuencia de desoxirribonucleótido o de ribonucleótido de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 nucleótidos. Cada nucleótido de ADN o ARN puede ser, independientemente, natural o sintético, y o modificado o sin modificar. Las modificaciones incluyen cambios en el resto de azúcar, el resto de la base y los enlaces entre nucleótidos en el oligonucleótido. Los compuestos de la presente invención abarcan moléculas que comprenden desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos modificados, ribonucleótidos modificados, análogos de nucleótidos, análogos de nucleótidos modificados, restos no convencionales y abásicos y combinaciones de los mismos.

Sustancialmente complementaria se refiere a la complementariedad mayor que aproximadamente 84%, con otra secuencia. Por ejemplo, en una región dúplex que consiste de 19 pares de bases una falta de coincidencia resulta en 94.7% de complementariedad, dos faltas de coincidencia resultan en aproximadamente 89.5% de complementariedad y 3 faltas de coincidencia resultan en aproximadamente 84.2% de complementariedad, rindiendo la región dúplex sustancialmente complementaria. De acuerdo con sustancialmente idéntica se refiere a la identidad mayor que aproximadamente 84%, con otra secuencia.

"Nucleótido" está destinado a abarcar desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos, que pueden ser naturales o sintéticos y modificados o no modificados. Los nucleótidos incluyen análogos de nucleótidos conocidos, que son sintéticos, naturales y no naturales. Los ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, 2'-O-metil ribonucleótidos, y ácidos péptido-nucleicos (PNA). Las modificaciones incluyen los cambios en el resto de azúcar, el resto de la base y/o las uniones entre ribonucleótidos en el oligoribonucleótido. Como se usa en la presente, el término "ribonucleótido" abarca ribonucleótidos naturales y sintéticos, no modificados y modificados y análogos de ribonucleótidos que son sintéticos, de origen natural y no naturales. Las modificaciones incluyen cambios en el resto de azúcar, el resto de la base y/o los enlaces entre ribonucleótidos en el oligonucleótido.

Los nucleótidos se seleccionan de bases modificadas sintéticas o de origen natural. Las bases de origen natural incluyen adenina, guanina, citosina, timina y uracilo. Las bases modificadas de nucleótidos incluyen inosina xantina, hipoxantina, 2- aminoadenina, 6-metilo, 2-propilo y otras adeninas de alquilo, 5-halouracilo, 5-halocitosina, 6-azacitosina y 6-azatimina, pseudouracilo, desoxypseudouracilo, 4-tiuracilo, ribo-2-tiouridina, ribo-4-tiouridina, 8-haloadenina, 8-aminoadenina, 8-tioladenina, 8-tiolalquil adeninas, 8-hidroxil adenina y otras adeninas 8-sustituidas, 8-haloguaninas, 8-aminoguanina, 8-tiolguanina, 8-tiolalquilguaninas, 8-hidroxilguanina y otras guaninas sustituidas, otras aza y deaza adeninas, otras aza y deaza guaninas, 5-metilribouridina, 5-trifluorometiluracilo, 5-metilribocitosina, y 5-trifluorocitosina. En algunas modalidades uno o más nucleótidos en un oligómero se sustituye con inosina.

En algunas modalidades, el compuesto de ARNip comprende además al menos un ribonucleótido modificado seleccionado del grupo que consiste en un ribonucleótido que tiene una modificación del azúcar, una modificación de base o una modificación de la unión internucleotídica y puede contener ADN y nucleótidos modificados tales como LNA (ácido nucleico bloqueado), ENA (ácido nucleico con puente de etileno), PNA (ácido péptidonucleico), arabinósido, nucleótido de fosfonocarboxilato o fosfinocarboxilato (nucleótido de PACE) o nucleótidos con un azúcar de 6 carbonos.

El desoxirribonucleótido modificado incluye, por ejemplo, 5'OMe ADN (5-metil-desoxirriboguanosina-3'-fosfato) que puede ser útil como nucleótido en la posición 5' terminal (posición número 1); PACE (desoxirriboadenosina 3' fosfonoacetato, desoxirribocitidina 3' fosfonoacetato, desoxirriboguanosina 3' fosfonoacetato, desoxirribotimidina 3' fosfonoacetato).

Los ácidos nucleicos con puente incluyen LNA (ácido nucleico adenosina 3' monofosfato con puente de 2'-O, 4'-C-metileno, ácido nucleico 5-metil-citidina 3' monofosfato con puente de 2'-O, 4'-C-metileno, ácido nucleico guanosina 3'

monofosfato con puente de 2'-O, 4'-C-metileno, 5-metil-uridina (o timidina) 3' monofosfato); y ENA (ácido nucleico adenosina 3' monofosfato con puente de 2'-O, 4'-C-etileno, ácido nucleico 5-metil-citidina 3' monofosfato con puente de 2'-O, 4'-C-etileno, 2'-O, ácido nucleico guanosina 3' monofosfato con puente de 4'-C-etileno, 5-metil-uridina (o timidina) 3'monofosfato).

Todos los análogos de, o modificaciones a, un nucleótido / oligonucleótido pueden emplearse con la presente invención, siempre que el análogo o la modificación sustancialmente no afecte adversamente las propiedades, por ejemplo la función, del nucleótido / oligonucleótido. Las modificaciones aceptables incluyen modificaciones del resto del azúcar, modificaciones del resto de la base, modificaciones en las uniones internucleotídicas y combinaciones de los mismos.

Una modificación del azúcar incluye una modificación en el resto 2' del residuo de azúcar y abarca amino, fluoro, alcoxi (por ejemplo metoxi), alquilo, amino, fluoro, cloro, bromo, CN, CF, imidazol, caboxilato, tioato, alquilo inferior C1 a C10, alquilo inferior sustituido, alcarilo o aralquilo, OCF₃, OCN, O-, S-, o N-alquilo; O-, S, o N-alqueno; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂, N₃; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino o sililo sustituido entre otros, descritos en las patentes europeas EP 0 586 520 B1 o EP 0 618 925 B1.

En una modalidad, el compuesto de ARNip modificado comprende al menos un ribonucleótido que comprende una modificación 2' en el resto de azúcar ("modificación 2' del azúcar"). En ciertas modalidades, el compuesto de ARNip comprende 2'O-alquilo o 2'-fluoro o 2'O-alilo o cualquier otra modificación 2', opcionalmente en posiciones alternas. Son posibles además otras modificaciones estabilizadoras (por ejemplo, modificaciones terminales). En algunas modalidades, un 2'O-alquilo preferido es la modificación 2'O-metilo (metoxi) del azúcar.

En algunas modalidades, la cadena principal de los oligonucleótidos está modificada y comprende entidades de fosfato-D-ribosa, pero puede además contener entidades de tiofosfato-D-ribosa, triéster, tioato, cadena principal con puente 2'-5' (denominado además 5'-2'), PACE y similares.

Como se usa en la presente, los términos "análogo de nucleótido sin apareamiento" significa un análogo de nucleótido que comprende un resto sin apareamiento de la base que incluye pero no se limita a: 6 des amino adenosina (Nebularina), 4-Me-indol, 3-nitropirrol, 5-nitroindol, Ds, Pa, N3-Me riboU, N3-Me riboT, N3-Me dC, N3-Me-dT, N1-Me-dG, N1-Me-dA, N3-etil-dC, N3-Me dC. En algunas modalidades, el análogo de nucleótido de apareamiento sin base es un ribonucleótido. En otras modalidades, el análogo de nucleótido de apareamiento sin base es un desoxirribonucleótido. Además, los análogos de los polinucleótidos pueden prepararse en donde la estructura de uno o más nucleótidos se altera fundamentalmente y se adaptan mejor como reactivos terapéuticos o experimentales. Un ejemplo de un análogo de nucleótido es un ácido péptido nucleico (PNA) en donde la desoxirribosa (o ribosa) de la cadena principal de fosfato en el ADN (o ARN se sustituye con una cadena principal de poliamida el cual es similar al encontrado en los péptidos. Se demostró que los análogos de PNA son resistentes a la degradación enzimática y tienen mejor estabilidad in vivo e in vitro. Otras modificaciones incluyen las cadenas principales de polímeros, cadenas principales cíclicas, cadenas principales acíclicas, cadenas principales de tiofosfato-D-ribosa, cadenas principales de triéster, cadenas principales de tioato, cadenas principales con puentes 2'-5', ácidos nucleicos artificiales, ácidos morfolino nucleicos, ácido glicol nucleico (GNA), ácido treosa nucleico (TNA), arabinósido, y nucleósido espejo (por ejemplo, beta-L-desoxinucleósido en lugar de beta-D-desoxinucleósido). Ejemplos de compuestos de ARNip que comprenden nucleótidos LNA se describen en Elmen y otros, (NAR 2005, 33(1):439-447).

En algunas modalidades los compuestos de la presente invención pueden sintetizarse mediante el uso de uno o más nucleótidos invertidos por ejemplo timidina invertida o adenina invertida (ver, por ejemplo, Takei, y otros, 2002, JBC 277(26):23800-06).

Otras modificaciones incluyen modificaciones 3' terminal conocidas además como restos de caperuza. Dichas modificaciones terminales se seleccionan de un nucleótido, un nucleótido modificado, un lípido, un péptido, un azúcar y un resto abásico invertido. Dichas modificaciones se incorporan, por ejemplo, en el terminal 3' de las hebras codificante y/o no codificante.

Lo que a veces se denomina en la presente invención como un "nucleótido abásico" o un "análogo de nucleótido abásico" se denomina más adecuadamente un pseudonucleótido o un resto no convencional. Un nucleótido es una unidad monomérica de ácido nucleico, que consiste en un azúcar de ribosa o de desoxirribosa, un fosfato y una base (adenina, guanina, timina o citosina en el ADN; adenina, guanina, uracilo o citosina en el ARN). Un nucleótido modificado comprende una modificación en uno o más del azúcar, el fosfato y/o la base. El pseudonucleótido abásico carece de una base, y por lo tanto no es estrictamente un nucleótido.

El término "resto de caperuza" como se usa en la presente incluye un resto abásico de ribosa, resto abásico de desoxirribosa, modificaciones de restos abásicos de ribosa y desoxirribosa abásica que incluyen modificaciones de 2'O alquilo; restos abásicos de ribosa y desoxirribosa abásica invertidas y modificaciones de los mismos; C6-imino-Pi; un nucleótido espejo que incluye L-ADN y L-ARN; 5'O-Me nucleótido; y análogos de nucleótidos que incluyen 4',5'-metilen nucleótido; 1-(β-D-eritrofuranosil) nucleótido; 4'-tionucleótido, nucleótido carbocíclico; 5'-amino-alquil fosfato; 1,3-diamino-2-propil fosfato, 3-aminopropil fosfato; 6-aminohexil fosfato; 12-aminododecil fosfato; hidroxipropil fosfato; 1,5-anhidrohexitol nucleótido; alfa-nucleótido; treo-pentofuranosil nucleótido; 3',4'-seco nucleótido acíclico; 3,4-dihidroxibutil

nucleótido; 3,5-dihidroxipentil nucleótido, resto abásico invertido 5'-5'; 1,4-butanodiol fosfato; 5'-amino; y restos de metilfosfonato y 5'-mercapto con puente y sin puente.

Ciertos restos de caperuza preferidas son restos abásicos de ribosa o desoxirribosa abásica; restos abásicos de ribosa o desoxirribosa abásica invertidas; C6-amino-Pi; un nucleótido espejo que incluye L-ADN y L-ARN.

Un "resto hidrocarbonado o derivado de este" se refiere a restos de alquilo de cadena lineal o ramificada y restos *per se* o que comprende además un grupo funcional que incluye alcoholes, fosfodiéster, fosforotioato, fosfonoacetato e incluye además aminas, ácidos carboxílicos, ésteres, aldehídos de amidas. "Resto hidrocarbonado" y "resto de alquilo" se usan indistintamente.

"Grupo funcional terminal" incluye grupos halógeno, alcohol, amina, carboxílico, éster, amida, aldehído, cetona, éter.

El término "resto no convencional", como se usa en la presente, se refiere al resto abásico de ribosa, un resto abásico de desoxirribosa, un desoxirribonucleótido, un desoxirribonucleótido modificado, un nucleótido espejo, un análogo de nucleótido de apareamiento sin base y un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace 2'-5' de fosfato internucleotídico; ácidos nucleicos con puente que incluyen ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y ácidos nucleicos con puente de etileno (ENA).

El resto de desoxirribosa abásico incluye, por ejemplo, desoxirribosa-3'-fosfato abásica; 1,2-didesoxi-D-ribofuranosa-3-fosfato; 1,4-anhidro-2-desoxi-D-ribito 1-3-fosfato.

El resto de desoxirribosa abásico invertido incluye desoxirriboabásica invertida; 3',5' desoxiabásica 5'-fosfato invertida.

Un nucleótido "espejo" es un nucleótido con quiralidad inversa a la de nucleótidos de origen natural o comúnmente empleados, es decir, una imagen especular (L- nucleótido) de los de origen natural (D- nucleótido), también denominados como L-ARN en el caso de un ribonucleótido espejo, y de "spiegelmer". El nucleótido puede ser un ribonucleótido o un desoxirribonucleótido y comprenden además al menos un azúcar, base y o modificación de la cadena principal. Ver la patente de Estados Unidos núm. 6,586,238. Además, la patente de Estados Unidos núm. 6,602,858 describe catalizadores de ácidos nucleicos que comprenden al menos una sustitución de L- nucleótidos. El nucleótido espejo incluye, por ejemplo, L-ADN (L-desoxirriboadenosina-3'-fosfato (dA espejo); L-desoxirribocitidina-3'-fosfato (dC espejo); L-desoxirriboguanosina-3'-fosfato (dG espejo); L- desoxirribotimidina-3'-fosfato (dT espejo) y L-ARN (L-riboadenosina-3'-fosfato (rA espejo); L-ribocitidina-3'-fosfato (rC espejo); L-riboguanosina-3'-fosfato (rG espejo); L-ribouridina-3'-fosfato (dU espejo).

De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona compuestos inhibidores de ARNip modificados que comprenden ribonucleótidos no modificados, ribonucleótidos modificados y/o restos no convencionales. En algunas modalidades, el compuesto de ARNip modificado comprende al menos un nucleótido modificado seleccionado del grupo que consiste en una modificación del azúcar, una modificación de la base y una modificación de la unión internucleotídica y puede contener nucleótidos modificados tales como LNA (ácido nucleico bloqueado) que incluye ENA (ácido nucleico con puente de etileno; PNA (ácido péptido nucleico); arabinósido; PACE (fosfonoacetato y derivados del mismo), o nucleótidos con un azúcar de seis carbonos o un resto no convencional seleccionado de un resto abásico de ribosa, un resto abásico de desoxirribosa, un desoxirribonucleótido modificado o no modificado, un nucleótido espejo y un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace internucleotídico 2'-5' fosfato. En algunas modalidades, un ribonucleótido modificado es un ribonucleótido modificado con 2'OMe azúcar.

En algunas modalidades, el ARNip es de extremo romo en el terminal 3' del compuesto, es decir, el ARNip tiene un extremo romo en el extremo definido por el terminal 3' de la hebra codificante o acompañante y el terminal 5' de la hebra no codificante o guía.

En otras modalidades, al menos una de las dos hebras tiene un saliente 3' de al menos un nucleótido en el terminal 3'; el saliente comprende al menos un desoxirribonucleótido. Al menos una de las hebras puede opcionalmente tener un saliente de al menos un nucleótido en el terminal 3'. El saliente consiste en aproximadamente 1 a aproximadamente 5 nucleótidos.

En diversas modalidades, los salientes se seleccionan independientemente de un nucleótido, un no nucleótido y una combinación de los mismos. En ciertas modalidades, cada saliente, si está presente, se selecciona independientemente de un ribonucleótido, desoxirribonucleótido, resto abásico de desoxirribosa, resto abásico de desoxirribosa, C3-amino-Pi, C4-amino-Pi, C5-amino-Pi, C6-amino-Pi, un nucleótido espejo.

En algunas modalidades, cada uno de Z y/o Z' incluye independientemente un resto de alquilo C2, C3, C4, C5 o C6, opcionalmente un resto C3 [propano, -CH₂)₃-] o un derivado del mismo que incluye propanol (C3-OH), propanodiol y derivado fosfodiéster de propanodiol ("C3Pi"). En modalidades preferidas, cada uno de Z y/o Z' incluye dos restos hidrocarbonados y en algunos ejemplos es C3Pi-C3OH o C3Pi-C3Pi. Cada C3 se conjuga covalentemente a un C3 adyacente a través de un enlace covalente, preferentemente un enlace a base de fosfo. En algunas modalidades, el enlace a base de fosfo es un enlace de fosforotioato, un fosfonoacetato o un fosfodiéster.

En algunas modalidades, el saliente C3-C3 está unido covalentemente al terminal 3' de (N)x o (N)y a través de un enlace covalente, por ejemplo, un enlace fosfodiéster. En algunas modalidades, el enlace entre un primer C3 y un segundo C3 es un enlace fosfodiéster. En algunas modalidades, el saliente no nucleotídico 3' es C3Pi-C3Pi. En algunas modalidades, el saliente no nucleotídico 3' es C3Pi-C3Ps. En algunas modalidades, el saliente no nucleotídico 3' es C3Pi-C3OH (OH es hidroxilo). En algunas modalidades, el saliente no nucleotídico 3' es C3Pi-C3OH.

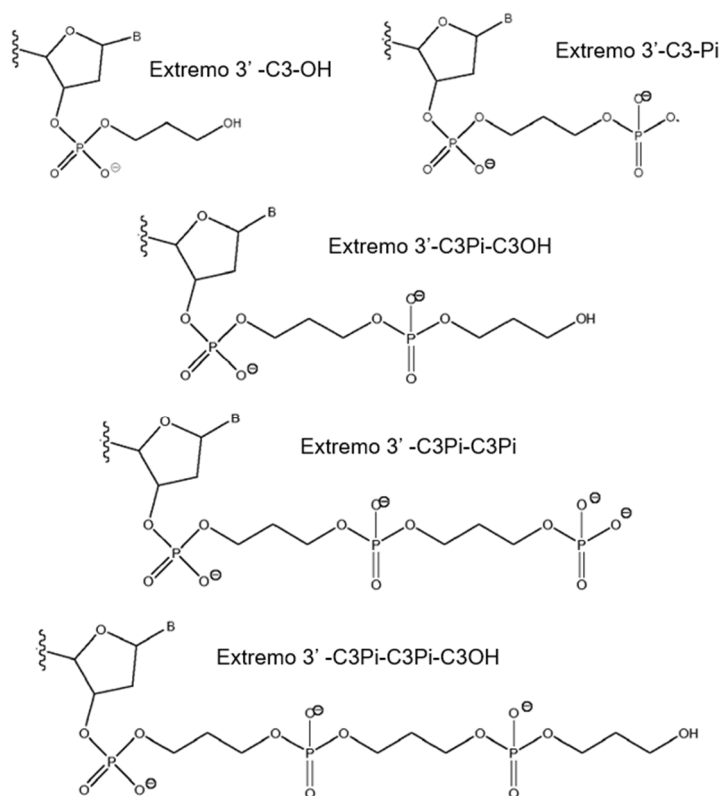
En diversas modalidades, el resto alquilo comprende un derivado alquilo que incluye un resto alquilo C3, alquilo C4, alquilo C5 o alquilo C6 que comprende un grupo hidroxilo terminal, un amino terminal o fosfato terminal. En algunas modalidades, el resto alquilo es un resto alquilo C3 o derivado alquilo C3. En algunas modalidades, el resto alquilo C3 comprende propanol, propilfosfato, propilfosforotioato o una combinación de los mismos.

El resto alquilo C3 está unido covalentemente al terminal 3' de (N)y y/o al terminal 3' de (N)x a través de un enlace fosfodiéster. En algunas modalidades, el resto de alquilo comprende propanol, propilfosfato, propilfosforotioato.

En algunas modalidades, cada uno de Z y Z' se selecciona independientemente de propanol, propilfosfato, propilfosforotioato, combinaciones de los mismos o múltiplos de los mismos, en particular 2 o 3 de propanol, propilfosfato, propilfosforotioato de propilo unidos covalentemente o combinaciones de los mismos.

En algunas modalidades, cada uno de Z y Z' se selecciona independientemente de propilfosfato, propilfosforotioato de propilo, propilfosfopropanol; fosfo-propil fosforotioato de propilo; propilfosfopropil fosfato; (propil fosfato)₃, (propil fosfato)₂-propanol, (propil fosfato)₂-propilfosforotioato. Cualquier resto conjugado con propano o propanol puede incluirse en Z o Z'.

Las estructuras ilustrativas de los restos no nucleotídicos 3' terminal son las siguientes:



En modalidades adicionales, cada uno de Z y/o Z' comprende una combinación de un resto abásico y un desoxirribonucleótido o ribonucleótido no modificado o una combinación de un resto hidrocarbonado y un desoxirribonucleótido o ribonucleótido no modificado o una combinación de un resto abásico (desoxirribo o ribo) y un resto hidrocarbonado. En tales modalidades, cada uno de Z y/o Z' comprende C3Pi-rAb o C3Pi-dAb.

La longitud del dúplex de ARN es de aproximadamente 18 a aproximadamente 40 ribonucleótidos, preferentemente 19 a 23 ribonucleótidos. En algunos aspectos, la longitud de cada hebra (oligómero) se selecciona independientemente del grupo que consiste en aproximadamente 18 a aproximadamente 40 bases, preferentemente 18 a 23 bases y con mayor preferencia 19, 20 o 21 ribonucleótidos.

La hebra no codificante del compuesto de ARNip modificado y el ácido nucleico diana son sustancialmente complementarios, es decir, tienen uno, dos o hasta tres faltas de coincidencia entre dicha hebra no codificante y el ácido nucleico diana.

La complementariedad entre la hebra no codificante y la hebra codificante del compuesto de ARNip modificado de la presente invención es perfecta.

Los compuestos de ARNip de la presente invención poseen un resto terminal unido covalentemente en el terminal 5' de la cadena no codificante que no es coincidente en un nucleótido en un ARNm diana. En varios aspectos, el resto en el terminal 5' de la hebra no codificante se selecciona del grupo que consiste en ribouridina, desoxirribouridina, ribouridina modificada, desoxirribouridina modificada, pseudouracilo, desoxipseudouracilo, desoxirribotimidina, desoxirribotimidina modificada, ribocitosina, ribocitosina modificada, desoxirribocitosina, desoxirribocitosina modificada, 5-metilribocitosina, 5-metilribocitosina modificada, 5-metilribouridina, ribo-2-tiouridina, ribo-4-tiouridina, resto abásico de ribosa y resto abásico de desoxirribosa.

En algunas modalidades, los compuestos de ARNip modificado de la invención exhiben una actividad mejorada, en comparación con un compuesto de ARNip en donde la hebra no codificante que incluye el nucleótido 5' terminal es completamente complementaria a una secuencia consecutiva en un ARNm diana.

Las estructuras de ARNip de la presente invención se aplican de manera beneficiosa al ARN bicatenario útil para inhibir o atenuar la expresión génica de mamíferos y no mamíferos.

Oligonucleótidos ARNip

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto que tiene una estructura (A) que se expone más abajo:



en donde cada uno de N^2 , N y N' es un ribonucleótido no modificado o modificado, o un resto no convencional; en donde cada uno de (N)x y (N')y es un oligonucleótido en el cual cada N o N' consecutivo se une al N o N' adyacente por un enlace covalente;

en donde cada uno de x y y es 18;

en donde la secuencia de $N^2-(N')$ y es completamente complementaria a la secuencia de $N'-(N)x$ y (N)x tiene complementariedad con una secuencia consecutiva en un ARN diana;

en donde N^1 está unido covalentemente a (N)x y con falta de coincidencia con el ARN diana;

en donde N^1 es un resto seleccionado del grupo que consiste en desoxirribouridina natural o modificada, adenosina o desoxiadenosina;

en donde z'' puede estar presente o ausente, pero si está presente es un resto de caperuza unido covalentemente en el terminal 5' de $N^2-(N')y$; y

en donde cada uno de Z y Z' independientemente está presente o ausente, pero si está presente es independientemente de 1-5 nucleótidos consecutivos, restos no nucleotídicos consecutivos o una combinación de los mismos unidos covalentemente en el terminal 3' de la hebra en la que está presente.

En algunas modalidades, N^1 está unido covalentemente a (N)x y con falta de coincidencia con el ARN diana.

En algunas modalidades, N^1 y N^2 juntos forman un par de bases de Watson-Crick. En otras modalidades, N^1 y N^2 juntos forman un par de bases distinto de Watson-Crick.

En ciertas modalidades, N^1 se selecciona del grupo que consiste en desoxirribouridina y desoxirribouridina modificada.

En algunos aspectos N^2 es un ribonucleótido modificado o un ribonucleótido no modificado. En ciertos aspectos N^2 se selecciona del grupo que comprende riboguanina, riboguanina modificada, desoxiguanina, desoxiguanina modificada, ribouridina, ribouridina modificada, desoxirribouridina, desoxirribouridina modificada, adenosina, adenosina modificada, desoxiadenosina, desoxiadenosina modificada, ribocitosina, ribocitosina modificada, desoxirribocitosina y desoxirribocitosina modificada.

En algunos aspectos, N^2 se selecciona del grupo que consiste en riboguanina, riboguanina modificada, desoxiguanina, ribouridina, desoxirribouridina, adenosina, desoxiadenosina, ribocitosina y desoxirribocitosina. En otros aspectos N^2 se selecciona del grupo que consiste en ribouridina, ribouridina modificada, desoxirribouridina, desoxirribouridina modificada, adenosina, adenosina modificada, desoxiadenosina, desoxiadenosina modificada, ribocitosina, ribocitosina modificada, desoxirribocitosina y desoxirribocitosina modificada. Aún en otros aspectos N^2 se selecciona del grupo que consiste en

ribouridina, ribouridina modificada, desoxirribouridina, desoxirribouridina modificada, adenosina, adenosina modificada, desoxiadenosina, desoxiadenosina modificada, ribocitosina, ribocitosina modificada, desoxirribocitosina y desoxirribocitosina modificada.

5 En ciertos aspectos N¹ se selecciona del grupo que consiste en ribocitosina, ribocitosina modificada, desoxirribocitosina, desoxirribocitosina modificada, 5-metilribocitosina y 5-metilribocitosina modificada y N² se selecciona del grupo que consiste en riboguanina, riboguanina modificada, desoxiguanina, ribouridina, desoxirribouridina, adenosina, desoxiadenosina, ribocitosina y desoxirribocitosina.

10 En algunos aspectos N¹ se selecciona del grupo que consiste en ribouridina, desoxirribouridina, ribouridina modificada, desoxirribouridina modificada, pseudouracilo, desoxipseudouracilo, 5-metilribouridina, ribo-2-tiouridina y ribo-4-tiouridina y N² se selecciona del grupo que consiste en ribouridina, ribouridina modificada, desoxirribouridina, desoxirribouridina modificada, adenosina, adenosina modificada, desoxiadenosina, desoxiadenosina modificada, ribocitosina, ribocitosina modificada, desoxirribocitosina y desoxirribocitosina modificada.

15 En ciertos aspectos N¹ es desoxirribotimidina o desoxirribotimidina modificada y N² se selecciona del grupo que consiste en ribouridina, ribouridina modificada, desoxirribouridina, desoxirribouridina modificada, adenosina, adenosina modificada, desoxiadenosina, desoxiadenosina modificada, ribocitosina, ribocitosina modificada, desoxirribocitosina y desoxirribocitosina modificada.

20 En ciertas modalidades de la estructura (A), N² comprende un ribonucleótido modificado con 2'OMe azúcar.

En algunas modalidades, Z y Z' están ausentes. En otras modalidades, uno de Z o Z' está presente.

25 En diversas modalidades, Z y Z' se seleccionan independientemente de un nucleótido, un no nucleótido y una combinación de los mismos. En ciertas modalidades, cada uno de Z y Z', si está presente, se selecciona independientemente de un ribonucleótido, desoxirribonucleótido, resto abásico de desoxirribosa, resto abásico de desoxirribosa, C3-amino-Pi, C4-amino-Pi, C5-amino-Pi, C6-amino-Pi, un nucleótido espejo. En algunas modalidades, Z está presente. En otras modalidades, Z' está presente. En modalidades adicionales, tanto Z como Z' están presentes. En algunas modalidades, Z y Z' están presentes y son idénticos. En modalidades adicionales, Z y Z' están presentes y son diferentes. En algunas modalidades, Z y Z' son independientemente 1, 2, 3, 4 o 5 restos no nucleotídicos o una combinación de 2, 3, 4 o 5 restos no nucleotídicos y nucleotídicos. En algunas modalidades, cada uno de Z y/o Z' comprende 2 restos no nucleotídicos unidos covalentemente al terminal 3' de la hebra de ARNip a través de un enlace fosfodiéster. En algunas modalidades, Z y Z' están presentes y cada uno comprende independientemente uno o más restos alquilo y/o derivados del mismo. En algunas modalidades, N² comprende riboadenosina y N¹ comprende uridina (ribouridina).

Un resto no nucleotídico se selecciona del grupo que consiste en un resto abásico, un resto abásico invertido, un resto de alquilo o derivado del mismo, y un fosfato inorgánico. En algunas modalidades, un resto no nucleotídico es un resto de alquilo o derivado del mismo. En algunas modalidades, el resto de alquilo comprende un grupo funcional terminal que incluye alcohol, una amina terminal, un fosfato terminal o un resto fosforotioato terminal.

40 En algunas modalidades Z está presente y comprende uno o más restos no nucleotídicos seleccionados del grupo que consiste en un resto abásico, un resto abásico invertido, un resto hidrocarbonado o derivado de la misma, y un fosfato inorgánico. En algunas modalidades, Z y Z' están presentes y comprenden uno o más restos de alquilo y/o derivados del mismo.

45 En modalidades adicionales Z' está presente y comprende uno o más restos no nucleotídicos seleccionados del grupo que consiste en un resto abásico, un resto abásico invertido, un resto hidrocarbonado y un fosfato inorgánico. En algunas modalidades, Z' está presente y comprende uno o más restos de alquilo y/o derivados del mismo.

50 En modalidades adicionales, x=y=18 y Z o Z' están presentes y comprenden independientemente dos restos no nucleotídicos.

55 En modalidades adicionales, x=y=18 y Z y Z' están presentes y cada uno comprenden independientemente dos restos no nucleotídicos.

En algunas modalidades, cada uno de Z y Z' incluye un resto abásico, por ejemplo, un resto de desoxirriboabásica (denominado en la presente "dAb") o resto riboabásico (denominado en la presente como "rAb"). En algunas modalidades, cada uno de Z y/o Z' comprende dos restos abásicos unidos covalentemente y es, por ejemplo, dAb-dAb o rAb-rAb o dAb-rAb o rAb-dAb. Cada resto se conjuga covalentemente a un resto adyacente a través de un enlace covalente, preferentemente un enlace a base de fosfo. En algunas modalidades, el enlace a base de fosfo es un enlace de fosforotioato, un fosfonoacetato o un fosfodiéster.

60 En algunas modalidades, cada uno de Z y/o Z' incluye independientemente un resto de alquilo, opcionalmente propano[(CH₂)₃] o un derivado del mismo que incluye propanol (C3-OH) y derivado fosfo de propanodiol ("C3-3'Pi"). En algunas modalidades, cada uno de Z y/o Z' incluye dos restos hidrocarbonados y en algunos ejemplos es C3-C3. Cada

C3 se conjuga covalentemente a un C3 adyacente a través de un enlace covalente, preferentemente un enlace a base de fosfo. En algunas modalidades, el enlace a base de fosfo es un enlace de fosforotioato, un fosfonoacetato o un fosfodiéster.

5 En una modalidad específica, $x=y=18$ y Z comprende C3Pi-C3OH o C3Pi-C3Pi. En una modalidad específica, $x=y=18$ y Z comprende C3Pi-C3OH o C3Pi-C3Pi. En algunas modalidades, el saliente C3-C3 está unido covalentemente al terminal 3' de (N)x o (N')y a través de un enlace covalente, por ejemplo, un enlace de fosfodiéster. En algunas modalidades, el enlace entre un primer C3 y un segundo C3 es un enlace fosfodiéster.

10 En diversas modalidades, el resto de alquilo es un resto de alquilo C3 a alquilo C6, que comprende un grupo hidroxilo terminal, un amino terminal o fosfato terminal. En algunas modalidades, el resto de alquilo es un resto de alquilo C3. En algunas modalidades, el resto alquilo C3 comprende propanol, propilfosfato, propilfosforotioato o una combinación de los mismos.

15 El resto alquilo C3 está enlazado covalentemente al terminal 3' de (N')y y/o al terminal 3' de (N)x a través de un enlace fosfodiéster. En algunas modalidades, el resto alquilo comprende propanol, propilfosfato, propilfosforotioato.

En algunas modalidades, cada uno de Z y Z' se selecciona independientemente de propanol, propilfosfato, propilfosforotioato, combinaciones de los mismos o múltiplos de los mismos.

20 En algunas modalidades, cada uno de Z y Z' se selecciona independientemente de propilfosfato, propilfosforotioato de propilo, propilfosfopropanol; fosfo-propil fosforotioato de propilo; propilfosfopropil fosfato; (propil fosfato)₃, (propil fosfato)₂-propanol, (propil fosfato)₂-propilfosforotioato. Cualquier resto conjugado con propano o propanol puede incluirse en Z o Z'.

25 En modalidades adicionales, cada uno de Z y/o Z' comprende una combinación de un resto abásico y un desoxirribonucleótido o ribonucleótido no modificado o una combinación de un resto hidrocarbonado y un desoxirribonucleótido o ribonucleótido no modificado o una combinación de un resto abásico (desoxirribo o ribo) y un resto hidrocarbonado. En tales modalidades, cada uno de Z y/o Z' comprende C3-rAb o C3-dAb.

30 En modalidades preferidas $x=y=18$, Z' está ausente, Z está presente y comprende dos restos de alquilo unidas covalentemente entre sí a través de un enlace fosfodiéster, N² comprende riboadenosina y N¹ comprende uridina.

35 En algunas modalidades, N y N' comprenden un nucleótido no modificado. En algunas modalidades, al menos uno de N o N' comprende un ribonucleótido modificado químicamente o un resto no convencional. En algunas modalidades, el resto no convencional se selecciona del grupo que consiste en un nucleótido espejo, un resto abásico de ribosa, un resto abásico de desoxirribosa, un desoxirribonucleótido, un desoxirribonucleótido modificado, un nucleótido espejo, un análogo de nucleótido de apareamiento sin base, un ácido nucleico con puente y un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace fosfato internucleotídico 2'-5'. En algunas modalidades, el resto no convencional es un nucleótido espejo, preferentemente un resto de L-ADN. En algunas modalidades, al menos uno de N o N' se modifica en uno o más del azúcar, la base o el conector. En ciertas modalidades, al menos uno de N o N' comprende un ribonucleótido modificado con 2'OMe azúcar.

45 (N)x y (N')y son completamente complementarias. En ciertas modalidades (N)x es completamente complementaria a una secuencia diana. En otras modalidades (N)x es sustancialmente complementaria a una secuencia diana. De acuerdo con ciertas modalidades preferidas, la presente invención proporciona compuestos de ARNip modificados que comprenden uno o más nucleótidos modificados, en donde el nucleótido modificado posee una modificación en el resto de azúcar, en el resto de la base o en el resto del enlace internucleotídico.

50 En ciertas modalidades del compuesto de acuerdo con la estructura (A), los ribonucleótidos alternos en cada uno de (N)x y N'y son ribonucleótidos modificados con 2'-OMe azúcar. En algunas modalidades de la estructura (A) en (N)x, los nucleótidos no están modificados o (N)x comprende ribonucleótidos alternos modificados con 2'OMe azúcar y ribonucleótidos no modificados; y el ribonucleótido ubicado en la posición media de N¹-(N)x está modificado o no modificado preferentemente no modificado; en donde (N')y comprende ribonucleótidos no modificados que comprenden además un nucleótido modificado en una posición terminal o penúltima.

60 En modalidades particulares, $x=y=18$, N¹ comprende ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar, (N)x comprende ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar y el ribonucleótido ubicado en el medio de N¹-(N)x no está modificado. En algunas modalidades, al menos un nucleótido en uno o ambos terminales 5' y 3' de (N')y están unidos por un enlace fosfodiéster 2'-5'. En algunas modalidades, N¹ está unido al terminal 5' de (N)x por un enlace fosfodiéster 2'-5'. En algunas modalidades, al menos un nucleótido en uno o ambos terminales 5' y 3' de (N')x están unidos por un enlace fosfodiéster 2'-5'. En algunas modalidades, N² está unido al terminal 3' de (N)y por un enlace fosfodiéster 2'-5'. En ciertas modalidades $x=y=18$; en (N)x los nucleótidos alternan entre ribonucleótidos modificados y ribonucleótidos no modificados, cada ribonucleótido modificado es un ribonucleótido modificado con 2'OMe azúcar y el ribonucleótido ubicado en el medio de N¹-(N)x está sin modificar; N² está unido al terminal 3' de (N)y por un enlace fosfodiéster 2'-5' y al menos dos nucleótidos en el terminal 3' de (N')y están unidos por dos enlaces fosfodiéster 2'-5'. En otras modalidades preferidas $x=y=18$; en (N)x

- los nucleótidos alternan entre ribonucleótidos modificados y ribonucleótidos no modificados, cada ribonucleótido modificado es un ribonucleótido modificado con 2'OMe azúcar y el ribonucleótido ubicado en el medio de N¹-(N)x está sin modificar; y al menos tres nucleótidos consecutivos en el terminal 5' de (N')y se unen por tres enlaces fosfodiéster 2'-5'. En una modalidad adicional, el nucleótido ubicado en la posición media de N²-(N)y, es decir, el nucleótido en la posición 10, es un ribonucleótido modificado con 2'OMe azúcar. En otra modalidad preferida, en (N)x los nucleótidos alternan entre ribonucleótidos modificados con 2'-OMe azúcar y ribonucleótidos no modificados, y en (N')y cuatro nucleótidos consecutivos en el terminal 5' están unidos por tres enlaces fosfodiéster 2'-5' y el nucleótido 5' terminal o dos o tres nucleótidos consecutivos en el 5' terminal comprenden la modificación de 3'-OMe azúcar.
- En ciertas modalidades preferidas, x=y=18 y en (N')y el nucleótido en al menos una posición comprende un nucleótido espejo, un desoxirribonucleótido y un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace internucleotídico 2'-5'.
- En ciertas modalidades, x=y=18 y (N')y comprende un nucleótido espejo. En diversas modalidades, el nucleótido espejo es un nucleótido de L-ADN. En ciertas modalidades, el L-ADN es L-desoxirribocitidina. En algunas modalidades (N')y comprende L-ADN en la posición 17. En otras modalidades (N')y comprende L-ADN en las posiciones 16 y 17. En ciertas modalidades (N')y comprende nucleótidos de L-ADN en la posición 1 y en una o ambas de las posiciones 16 y 17.
- Aún en otras modalidades (N')y comprende un ADN en la posición 14 y L-ADN en una o ambas de las posiciones 16 y 17. En esa estructura, la posición 1 puede comprender además un L-ADN o un resto abásico no convencional.
- De acuerdo con diversas modalidades en N²-(N')y, N² está unido al terminal 3' de (N)y por un enlace fosfodiéster 2'-5' y en (N')y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 ribonucleótidos consecutivos en el terminal 3' están unidos por enlaces internucleotídicos 2'-5'. En una modalidad, N² está unido al terminal 3' de (N)y por un enlace fosfodiéster 2'-5' y tres nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')y están unidos por tres enlaces fosfodiéster 2'-5', en donde uno o más de los nucleótidos 2'-5' que forman los enlaces fosfodiéster 2'-5' comprenden además una modificación de 3'-OMe azúcar. En algunas modalidades, N² comprende una modificación de 2'-OMe azúcar. En modalidades adicionales, el nucleótido 3' terminal de (N')y comprende una modificación de 2'-OMe azúcar. En ciertas modalidades, x=y=18 y en (N')y dos o más nucleótidos consecutivos en las posiciones 14, 15, 16, 17 y 18 comprenden un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace internucleotídico 2'-5'. En diversas modalidades, el nucleótido que forma el enlace internucleotídico 2'-5' comprende una desoxirribosa nucleótido 3' o un metoxi nucleótido 3'. En algunas modalidades, los nucleótidos en las posiciones 16 y 17 en (N')y están unidos por un enlace internucleotídico 2'-5'. En otras modalidades, los nucleótidos en las posiciones 15-16, 16-17 o 15-17 en (N')y están unidos por un enlace internucleotídico 2'-5'.
- En ciertas modalidades (N')y comprende un L-ADN en la posición 2 y enlaces internucleotídicos 2'-5' en las posiciones 15-16, 16-17, o 15-17.
- En una modalidad, el nucleótido 3' terminal o dos o tres nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')y son L-desoxirribonucleótidos.
- En otras modalidades en N²-(N')y, N² es un nucleótido modificado con azúcar 2' y en (N')y (N')y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 ribonucleótidos consecutivos en cualquier extremo o 1 a 7 nucleótidos modificados en cada uno de los extremos 5' y 3' son independientemente nucleótidos modificados con azúcar 2'. En algunas modalidades la modificación de azúcar 2' comprende la presencia de un resto amino, un fluoro, un alcoxi o un alquilo. En ciertas modalidades la modificación de azúcar 2' comprende un resto metoxi (2'-OMe). En una serie de modalidades, tres, cuatro o cinco nucleótidos consecutivos en el terminal 5' de (N')y comprenden la modificación 2'-OMe. En otra modalidad, N² y dos nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')y comprenden la modificación 2'-OMe.
- En algunas modalidades en (N')y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 ribonucleótidos consecutivos en 1 o 7 nucleótidos modificados en cada uno de los terminales 5' y 3' son independientemente nucleótidos bicíclicos. En diversas modalidades, el nucleótido bicíclico es un ácido nucleico bloqueado (LNA) o una especie de LNA, por ejemplo, el ácido nucleico con puente de 2'-O, 4'-C-etileno (ENA) es una especie de LNA.
- En diversas modalidades (N')y comprende nucleótidos modificados en el terminal 5' o en ambos extremos 3' y 5'.
- En algunas modalidades, al menos dos nucleótidos en el 5' de (N')y están unidos por modificaciones de la cadena principal de P-etoxi. En algunas modalidades, N² en el 3' de (N')y se une por las modificaciones de la cadena principal de P-etoxi. En ciertas modalidades x=y=18 y en donde en (N)x los nucleótidos alternan entre ribonucleótidos modificados y ribonucleótidos no modificados, cada ribonucleótido modificado es un ribonucleótido modificado con 2'OMe azúcar y el ribonucleótido ubicado en la posición media de N¹-(N)x está sin modificar; N1 es un ribonucleótido modificado con 2'OMe azúcar y tres nucleótidos consecutivos en el terminal 3' están unidos por dos modificaciones de la cadena principal de P-etoxi o cuatro nucleótidos consecutivos en el terminal 5' de (N')y están unidos por tres modificaciones de la cadena principal de P-etoxi. En una modalidad adicional, N² en el 3' de (N')y se une por la modificación de la cadena principal de P-etoxi.
- En algunas modalidades en (N')y 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7, ribonucleótidos consecutivos en cada uno de los terminales 5' y 3' son independientemente nucleótidos espejo, los nucleótidos se unen por un enlace fosfodiéster 2'-5', por nucleótidos modificados con azúcar 2' o por nucleótido bicíclico. En una modalidad, la modificación en los terminales 5' y 3' de (N')y

es idéntica. En una modalidad, cuatro nucleótidos consecutivos en el terminal 5' de (N')y están unidos por tres enlaces fosfodiéster 2'-5' y dos o tres nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')y están unidos por dos enlaces fosfodiéster 2'-5'. En una modalidad adicional N² en el 3' de (N')y se une en el terminal 3' de (N')y por un enlace fosfodiéster 2'-5'. En otra modalidad, la modificación en el terminal 5' de (N')y es diferente de la modificación en el terminal 3' de (N')y. En una modalidad específica, los nucleótidos modificados en el terminal 5' de (N')y son nucleótidos espejo y los nucleótidos modificados en el terminal 3' de (N')y están unidos por un enlace fosfodiéster 2'-5'. En otra modalidad específica, tres nucleótidos consecutivos en el terminal 5' de (N')y son nucleótidos de LNA y dos nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')y están unidos por dos enlaces fosfodiéster 2'-5'. En (N)x los nucleótidos alternan entre ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar y ribonucleótidos no modificados, y el ribonucleótido ubicado en el medio de N¹-(N)x no está modificado.

En diversas modalidades, N² está unido en el terminal 3' de (N')y por un enlace fosfodiéster 2'-5' y dos o tres nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')x están unidos por uno o dos enlaces fosfodiéster 2'-5'. En algunas modalidades, N² está unido en el terminal 3' de (N')y por un enlace fosfodiéster 2'-5' y dos o tres nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')x están unidos por uno o dos enlaces fosfodiéster 2'-5' y uno o dos o tres nucleótidos consecutivos en el terminal 3' comprenden la modificación de 3'-OMe azúcar. En una modalidad adicional, N² comprende una modificación de 3'-OMe azúcar.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un compuesto en donde x=y=18 y en donde en (N)x los nucleótidos alternan entre ribonucleótidos modificados y ribonucleótidos no modificados, cada ribonucleótido modificado es un ribonucleótido modificado con 2'OMe azúcar y el ribonucleótido ubicado en el medio de N¹-(N)x está sin modificar; dos nucleótidos en el terminal 3' de (N')y están unidos por dos enlaces fosfodiéster 2'-5' y tres nucleótidos en el terminal 5' de (N')y son LNA tal como ENA. En una modalidad adicional N² está unido en el terminal 3' de (N')y por un enlace fosfodiéster 2'-5'.

En otra modalidad, cinco nucleótidos consecutivos en el terminal 5' de (N')y comprenden la modificación de 2'OMe azúcar y dos nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')y son L-ADN.

Aún en otra modalidad, la presente invención proporciona un compuesto en donde x=y=18 en donde (N)x consiste en ribonucleótidos no modificados; dos nucleótidos consecutivos en el terminal 3' de (N')y están unidos por enlaces fosfodiéster 2'-5' y tres nucleótidos consecutivos en el terminal 5' de (N')y son LNA tal como ENA. En una modalidad adicional N² está unido en el terminal 3' de (N')y por un enlace fosfodiéster 2'-5'.

De acuerdo con otras modalidades en (N')y el nucleótido 5' o 3' terminal, o 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos consecutivos en cualquiera de los terminales o de 1 a 4 nucleótidos en cada uno de los terminales 5' y 3' son independientemente nucleótidos de fosfonocarboxilato o fosfinocarboxilato (nucleótidos PACE). En algunas modalidades, los nucleótidos PACE son desoxirribonucleótidos. En algunas modalidades preferidas en (N')y, 1 o 2 nucleótidos consecutivos en cada uno de los terminales 5' y 3' son nucleótidos PACE.

En algunas modalidades, ninguna hebra de los compuestos de ARNip modificados de la invención se fosforila en los terminales 3' y 5'. En otras modalidades, las hebras codificante y no codificante se fosforilan en el terminal 3'. Aún en otra modalidad más, la hebra no codificante se fosforila en la posición del terminal 5' terminal mediante el uso de grupos fosfato escindibles o no escindibles. Aún en otra modalidad más, cualquiera o ambas hebras codificante y no codificante se fosforilan en la posición del terminal 3' mediante el uso de grupos fosfato escindibles o no escindibles.

La estructura (A) es útil con cualquier par de oligonucleótidos (hebras codificante y no codificante) para un gen de mamífero o no mamífero. En algunas modalidades, el gen de mamífero es un gen de ser humano. Se proporcionan ejemplos de pares de secuencias de oligonucleótidos en las publicaciones de patentes PCT núms. WO 2006/023544, WO 2007/084684, WO 2008/050329, WO 2007/141796, WO 2009/044392, WO 2008/106102, WO 2008/152636, WO 2009/001359, WO/2009/090639 cedidas al titular de la presente invención.

A menos que se indique lo contrario, en modalidades preferidas de las estructuras discutidas en la presente descripción, el enlace covalente entre cada N y N' consecutivos es un enlace fosfodiéster. A menos que se indique lo contrario, en modalidades preferidas de las estructuras discutidas en la presente descripción el enlace covalente entre N¹ y (N)x y entre N² y (N')y es un enlace fosfodiéster. En algunas modalidades, al menos uno de los enlaces covalentes es un enlace de fosforotioato.

Para todas las estructuras anteriores, la secuencia de oligonucleótidos de (N)x es completamente complementaria a la secuencia de oligonucleótidos de (N')y. En ciertas modalidades (N)x es completamente complementaria a un ARNm de mamífero o ARN microbiano o ARN viral. En otras modalidades (N)x es sustancialmente complementaria a un ARNm de mamífero o ARN microbiano o ARN viral.

En algunas modalidades, un compuesto de ARNip modificado que tiene la estructura (A) exhibe propiedades beneficiosas que incluyen al menos una actividad mejorada en comparación con un compuesto de ARNip en donde N¹ es complementaria a un nucleótido en un ARNm diana.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención de acuerdo con la estructura (A), en una cantidad eficaz para inhibir la expresión génica de mamíferos o no mamíferos, y un portador farmacéuticamente aceptable, y su uso para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades y trastornos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, el gen de mamífero es un gen de ser humano.

5 En algunas modalidades, el gen que no es de mamífero está implicado en una enfermedad de mamíferos, preferentemente una enfermedad de seres humanos.

La presente invención se refiere además a los compuestos de ARNip de la invención para usar en métodos para tratar o prevenir la incidencia o gravedad de cualquiera de las enfermedades o afecciones descritas en la presente descripción o para reducir el riesgo o la gravedad de una enfermedad o afección descritas en la presente descripción en un sujeto que lo necesita, en donde la enfermedad o afección y/o un síntoma o riesgo asociado con las mismas está asociado con la expresión de un gen mamífero o no mamífero. En una modalidad preferida, el sujeto es un ser humano.

Síntesis de ARNip

Con el uso de algoritmos públicos y patentados, se generan las secuencias codificantes y no codificantes de ARNip potenciales y N¹ y/o N² de los ARNip se sustituyen para generar los compuestos de ARNip modificados de acuerdo con la estructura (A).

Las moléculas de ARNip de acuerdo con las especificaciones anteriores se preparan esencialmente como se describe en la presente descripción. Los compuestos de ARNip modificados de la presente invención pueden sintetizarse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica para la síntesis de oligonucleótidos ribonucleicos (o desoxirribonucleicos). La síntesis se realiza comúnmente en un sintetizador disponible comercialmente (disponible, *entre otros*, de Applied Biosystems). La síntesis de oligonucleótidos se describe, por ejemplo, en Beaucage e Iyer, Tetrahedron 1992; 48:2223-2311; Beaucage e Iyer, Tetrahedron 1993; 49: 6123-6194 y Caruthers, y otros, Métodos Enzymol. 1987; 154: 287-313; la síntesis de los tioatos, se describe, entre otros, en Eckstein, Ann. Rev. Biochem. 1985; 54: 367-402, la síntesis de las moléculas de ARN se describe en Sproat, en Humana Press 2005 Editado por Herdewijn P.; Kap. 2: 17-31 y los procesos corriente abajo respectivos se describen, entre otros, en Pingoud y otros, en IRL Press 1989 editado por Oliver R.W.A.; Kap. 7: 183-208.

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

En algunas modalidades los oligonucleótidos de la presente invención se sintetizan por separado y unidos entre sí posterior a la síntesis, por ejemplo, por ligación (Moore y otros, 1992, Science 256, 9923; Draper y otros, publicación de patente internacional núm. WO 93/23569; Shabarova y otros, 1991, NAR 19, 4247; Bellon y otros, 1997, Nucleosides & Nucleotides, 16, 951; Bellon y otros, 1997, Bioconjugate Chem. 8, 204), or por hibridación a continuación de la síntesis y/o desprotección.

El solapamiento de pares de fragmentos sintetizados químicamente pueden ligarse mediante el uso de métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo., ver patente de Estados Unidos núm. 6,121,426). Las hebras se sintetizan separadamente y luego se hibridan entre sí en el tubo. Después, los ARNip de doble cadena se separan por HPLC de los oligonucleótidos de hebra simple que no hibridan (por ejemplo debido al exceso de uno de ellos) por HPLC. En relación con los compuestos de ARNip modificados de la presente invención, dos o más de tales secuencias pueden sintetizarse y unirse entre sí para su uso en la presente invención.

Los compuestos de ARNip de la presente invención poseen un resto terminal unido covalentemente en el terminal 5' de la cadena no codificante que no es coincidente en un nucleótido en un ARNm diana. En diversos aspectos, el resto en el terminal 5' de la cadena no codificante se selecciona del grupo que consiste en ribouridina, desoxirribouridina, ribouridina modificada, desoxirribouridina modificada, pseudouracilo, desoxypseudouracilo, desoxiribotimidina, desoxirribotimidina modificada, ribocitosina, ribocitosina modificada, desoxitocitosina, desoxitocitosina modificada, 5-metilribocitosina, 5-metilribocitosina modificada, 5-metilribouridina, ribo-2-tiouridina, ribo-4-tiouridina, resto abásico de ribosa y resto abásico de desoxirribosa y el resto en el terminal 3' de la hebra codificante se selecciona de un ribonucleótido o un ribonucleótido modificado o un resto no convencional. Las estructuras de ARNip de la presente invención se aplican de manera beneficiosa al ARN bicatenario útil para inhibir o atenuar la expresión génica de mamíferos y no mamíferos.

Composiciones farmacéuticas

Si bien es posible que los compuestos de la presente invención puedan administrarse como productos químicos en bruto, es preferible presentarlos como una composición farmacéutica. En consecuencia, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más de los compuestos de ARNip modificados de la invención; y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende dos o más compuestos de ARNip modificados de la invención.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de la invención unido covalentemente o no covalentemente a uno o más compuestos de la invención en una cantidad eficaz para inhibir un gen diana; y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades los compuestos de ARNip modificados se procesan intracelularmente por complejos celulares endógenos para producir uno o más oligorribonucleótidos de la invención.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y uno o más de los compuestos de ARNip modificados de la invención en una cantidad eficaz para regular negativamente la expresión en una célula en un mamífero de un gen diana, el compuesto que comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria a la secuencia de un ARNm diana.

En algunas modalidades, los compuestos de ARNip modificados de acuerdo con la presente invención son el componente activo principal en una composición farmacéutica. En otras modalidades, los compuestos de ARNip modificados de acuerdo con la presente invención son uno de los componentes activos de una composición farmacéutica que contiene dos o más ARNip, dicha composición farmacéutica comprende además uno o más compuestos de ARNip que se dirigen a uno o más genes diana.

La presente descripción proporciona además un proceso para preparar una composición farmacéutica, que comprende: proporcionar uno o más compuestos de ARNip modificado de doble cadena de la invención; y mezclar dicho compuesto con un portador farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad preferida, el compuesto de ARNip modificado usado en la preparación de una composición farmacéutica se mezcla con un portador en una dosis farmacéuticamente eficaz. En algunas modalidades, el compuesto de ARNip modificado de la presente invención se conjuga a un esteroide o a un lípido o a otra molécula adecuada, por ejemplo al colesterol.

Interferencia del ARN

Recientemente se han publicado varios documentos de solicitudes PCT relacionadas con el fenómeno del ARNi. Estos incluyen: Publicación PCT WO 00/44895; publicación PCT WO 00/49035; publicación PCT WO 00/63364; publicación PCT WO 01/36641; publicación PCT WO 01/36646; publicación PCT WO 99/32619; publicación PCT WO 00/44914; publicación PCT WO 01/29058; y publicación PCT WO 01/75164.

La interferencia del ARN (ARNi) se basa en la capacidad de las especies de ARNbc de entrar a un complejo de proteínas citoplasmáticas, donde este se dirige después al ARN celular complementario y lo degrada específicamente. La respuesta de la interferencia del ARN caracteriza un complejo de endonucleasas que contiene un ARNip, comúnmente denominado como un complejo silenciador inducido por ARN (RISC), que media la escisión del ARN de cadena simple que tiene la secuencia complementaria a la hebra no codificante del dúplex de ARNip. La escisión del ARN diana puede ocurrir en el medio de la región complementaria a la hebra no codificante del dúplex de ARNip (Elbashir y otros, *Genes Dev.*, 2001, 15(2):188-200). En más detalle, los ARNbc más largos se digieren en fragmentos de ARNbc cortos (17-29 pb) (denominados además como ARN inhibidores cortos o "ARNip") por ARNasas tipo III (DICER, DROSHA, etc., Bernstein y otros, *Nature*, 2001, 409(6818):363-6; Lee y otros, *Nature*, 2003, 425(6956):415-9). El complejo de proteína RISC reconoce estos fragmentos y el ARNm complementario. El proceso completo se culmina por la escisión de la endonucleasa del ARNm diana (McManus & Sharp, *Nature Rev Genet*, 2002, 3(10):737-47; Paddison & Hannon, *Curr Opin Mol Ther*, 2003, 5(3):217-24). (Para obtener información adicional sobre estos términos y mecanismos propuestos, ver, por ejemplo, Bernstein y otros, *RNA* 2001, 7 (11):1509-21; Nishikura, *Cell* 2001, 107 (4):415-8 y publicación PCT WO 01/36646).

La selección y síntesis del ARNip correspondiente a los genes conocidos se ha informado ampliamente; ver por ejemplo Ui-Tei y otros, *J Biomed Biotechnol*. 2006; 2006: 65052; Chalk y otros, *BBRC*. 2004, 319(1): 264-74; Sioud & Leirdal, *Met. Mol Biol.*; 2004, 252:457-69; Levenkova y otros, *Bioinform.* 2004, 20(3):430-2; Ui-Tei y otros, *Nuc. Acid Res.* 2004, 32(3):936-48. Para ejemplos de uso de, y producción de, ARNip modificados ver Braasch y otros, *Biochem.*, 2003, 42(26):7967-75; Chiu y otros, *RNA*, 2003, 9(9):1034-48; publicaciones PCT WO 2004/015107 (Atugen); WO 02/44321 (Tuschl y otros), y las patentes de Estados Unidos núms. 5,898,031 y 6,107,094.

ARNip e interferencia del ARN

La interferencia del ARN (ARNi) es un fenómeno que involucra el silenciamiento postranscripcional gen-específico dependiente del ARN bicatenario (bc). Los intentos iniciales de estudiar este fenómeno y manipular experimentalmente las células de mamíferos se frustraron mediante un mecanismo de defensa antiviral activo y no específico que se activó en respuesta a largas moléculas de ARNbc (Gil y otros, *Apoptosis*, 2000. 5:107-114). Después, se descubrió que los dúplex sintéticos de ARN de 21 nucleótidos podían mediar el ARNi específico del gen en células de mamíferos, sin estimular los mecanismos genéricos de defensa antivirales (ver Elbashir y otros, *Nature* 2001, 411:494-498 y Caplen y otros, *PNAS USA* 2001, 98:9742-9747). Como resultado, los pequeños ARN interferentes (ARNip) se han convertido en herramientas poderosas para intentar comprender la función génica.

La interferencia del ARN (ARNi) es mediada por pequeños ARN interferentes (ARNip) (Fire y otros, Nature 1998, 391:806) o microARN (ARNmi) (Ambros, Nature 2004, 431(7006):350-355; Bartel, Cell 2004, 116(2): 281-97). El proceso correspondiente en plantas se denomina comúnmente como silenciamiento génico postranscripcional específico (PTGS) o silenciamiento de ARN y se denomina además como extinción en hongos.

Un ARNip es una molécula de ARN bicatenario o de ARN modificado que regula negativamente o silencia (evita) la expresión de un gen/ ARNm de su contraparte endógena (celular). El mecanismo de interferencia del ARN se detalla *infra*.

Diversos estudios han revelado que los agentes terapéuticos de ARNip son eficaces *in vivo* tanto en mamíferos como en seres humanos. Bitko y otros, han demostrado que las moléculas de ARNip específicos dirigidos contra el gen de la nucleocápsida N del virus sincitial respiratorio (RSV) son eficaces en el tratamiento de ratones cuando se administran por vía intranasal (Nat. Med. 2005, 11(1):50-55). Las revisiones recientes que discuten la terapéutica del ARNip están disponibles (Barik y otros, J. Mol. Med 2005, 83:764-773; Dallas y Vlassov, Med. Sci. Monitor 2006, 12(4):RA67-74; Chakraborty, Current Drug Targets 2007, 8(3):469-82; Dykxhoorn y otros, Gene Therapy 2006, 13:541-552).

Mucke (IDrugs 2007, 10(1):37-41) presenta una revisión de la terapéutica actual, que incluyen ARNip para varias dianas, para el tratamiento de enfermedades oculares, por ejemplo, la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y el glaucoma.

Estructuras de ARNip

La selección y síntesis de ARNip correspondiente a genes conocidos se ha informado ampliamente; (ver por ejemplo Ui-Tei y otros, J Biomed Biotech. 2006; 2006: 65052; Chalk y otros, BBRC. 2004, 319(1): 264-74; Sioud y Leirdal, Met. Mol Biol.; 2004, 252:457-69; Levenkova y otros, Bioinform. 2004, 20(3):430-2; Ui-Tei y otros, NAR. 2004, 32(3):936-48; De Paula y otros, RNA 2007, 13:431-56).

Para ejemplos del uso y la producción de ARNip modificados, ver, por ejemplo, Braasch y otros, Biochem. 2003, 42(26):7967-75; Chiu y otros, RNA, 2003, 9(9):1034-48; publicaciones PCT WO 2004/015107 (atugen AG) y WO 02/44321 (Tuschl y otros). Las patentes de Estados Unidos núms. 5,898,031 y 6,107,094, describen oligómeros modificados químicamente. Las publicaciones de patentes de Estados Unidos núms. 2005/0080246 y 2005/0042647 respectivamente se refieren a compuestos oligoméricos que tienen un motivo alternante y compuestos de ARNbc que tienen uniones internucleosídicas modificadas químicamente.

Se han descrito otras modificaciones. Se demostró que la inclusión de un resto 5'-fosfato mejora la actividad de los ARNip en embriones de *Drosophila* (Boutla, y otros, Curr. Biol. 2001, 11:1776-1780) y se requiere para la función ARNip en células HeLa humanas (Schwarz y otros, Mol. Cell, 2002, 10 537-48). Amarzguioui y otros, (NAR, 2003, 31(2):589-95) demostraron que la actividad de ARNip dependía del posicionamiento de las modificaciones 2'-O-metilo. Holen y otros (NAR. 2003, 31(9):2401-07) informan que un ARNip que tiene un pequeño número de nucleósidos modificados con 2'-O-metilo dio una buena actividad en comparación con el tipo salvaje, pero que la actividad disminuyó a medida que aumentó el número de nucleósidos modificados con 2'-O-metilo. Chiu y Rana (RNA. 2003, 9:1034-48) describen que la incorporación de nucleósidos modificados con 2'-O-metilo en la hebra codificante o la no codificante (hebras completamente modificadas) redujo severamente la actividad de ARNip en relación con el ARNip no modificado. Se informó que la colocación de un grupo 2'-O-metilo en el terminal 5' en la hebra no codificante limitaba severamente la actividad, mientras que la colocación en el terminal 3' de la no codificante y en ambos terminales de la hebra codificante se toleraba (Czauderna y otros, NAR. 2003, 31(11):2705-16; documento WO 2004/015107). Las moléculas de la presente invención ofrecen una ventaja porque son estables y activas y son útiles en la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de diversas enfermedades.

Las publicaciones de patentes PCT núms. WO 2008/104978 y WO 2009/044392 a favor del titular de la presente invención, describen nuevas estructuras de ARNip.

La publicación PCT núm. WO 2008/050329 y núm. de serie de Estados Unidos 11/978,089 a favor del titular de la presente invención se refieren a inhibidores de genes pro-apoptóticos.

Las publicaciones de patentes PCT núms. WO 2004/111191 y WO 2005/001043 se relacionan con métodos para mejorar el ARNi.

La descripción describe un método de regulación negativa de la expresión del gen diana en al menos 20%, 30%, 40% o 50% en comparación con un control, que comprende poner en contacto un transcripto de ARNm del gen diana con uno o más de los compuestos de la invención.

Adicionalmente la descripción describe un método de regulación negativa de la expresión del gen diana en un mamífero en al menos 20%, 30%, 40% o 50% en comparación con un control, que comprende administrar uno o más de los compuestos de la invención al mamífero. En una modalidad preferida de la invención, el mamífero es un ser humano.

En diversas modalidades, una molécula de ácido nucleico bicatenario de estructura (A) regula negativamente la expresión de un gen diana, de manera que la regulación negativa de la expresión de un gen diana se selecciona del grupo que comprende la regulación negativa de la función génica (que se examina, por ejemplo, mediante un ensayo enzimático o un ensayo de unión con un producto de interacción conocido del gen/polipéptido nativos, *entre otros*), la regulación negativa del producto polipeptídico del gen (que se examina, por ejemplo, mediante transferencia Western, ELISA o inmunoprecipitación, *entre otros*) y regulación negativa de la expresión del ARNm del gen (que se examina, por ejemplo, mediante transferencia Northern, RT-PCR cuantitativa, hibridación in situ o hibridación de microarreglos, *entre otros*).

Suministro

El compuesto de ARNip modificado de la invención se administra como el compuesto *per se* (es decir, como ARNip desnudo) o como sal farmacéuticamente aceptable y se administra solo o como ingrediente activo en combinación con uno o más portadores, solventes, diluyentes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables. En algunas modalidades las moléculas de ARNip de la presente invención se suministran al tejido diana mediante aplicación directa de las moléculas desnudas preparadas con un portador o un diluyente.

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

Los portadores farmacéuticamente aceptables, solventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes y vehículos, así como también portadores de implante se refieren generalmente a rellenos sólidos o líquidos no tóxicos, inertes, diluyentes o material de encapsulación que no reaccionan con los compuestos de ARNip de la invención y ellos incluyen liposomas y microesferas. Por ejemplo, los compuestos de ARNip de la invención pueden formularse con polietilenimina (PEI), con derivados de PEI, por ejemplo, derivados modificados con ácido oleico y esteárico de PEI ramificado, con quitosano o con ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA). La formulación de las composiciones en, por ejemplo, liposomas, micro o nanoesferas y nanopartículas, puede mejorar la estabilidad y beneficiar la absorción.

Además, las composiciones pueden incluir un portador de oxígeno artificial, tal como perfluorocarbonos (PFC), por ejemplo, bromuro de perfluorooctilo (perflubron).

Los ejemplos de sistemas de suministro útiles en la presente invención incluyen las patentes de Estados Unidos núms. 5,225,182; 5,169,383; 5,167,616; 4,959,217; 4,925,678; 4,487,603; 4,486,194; 4,447,233; 4,447,224; 4,439,196; y 4,475,196. Muchos de dichos sistemas de suministro, implantes y módulos, se conocen bien por aquellos con experiencia en la técnica. En una modalidad específica de esta invención pueden seleccionarse formulaciones tópicas y transdérmicas.

En consecuencia, en algunas modalidades las moléculas de ARNip de la invención se suministran en formulaciones de liposomas y formulaciones de lipofectina y similares y pueden prepararse por métodos bien conocidos para aquellos con experiencia en la técnica. Dichos métodos se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos núms. 5,593,972, 5,589,466, y 5,580,859.

Se han desarrollado sistemas de suministro específicamente con el objetivo de aumentar y mejorar el suministro de ARNip a las células de mamíferos (ver, por ejemplo, Shen y otros FEBS Let. 539: 111-114 (2003), Xia y otros, Nat. Biotechnología 20: 1006-1010 (2002), Reich y otros, Mol. Visión 9: 210-216 (2003), Sorensen y otros, J. Mol. Biol. 327: 761-766 (2003), Lewis y otros, Nat. Gen. 32: 107-108 (2002) y Simeoni y otros, NAR 31, 11: 2717-2724 (2003)). El ARNip se ha usado recientemente con éxito para inhibir la expresión génica en primates; (para más detalles ver por ejemplo, Tolentino y otros, Retina 2004. 24 (1):132-138).

Las formulaciones adicionales para el suministro mejorado de los compuestos de la presente invención pueden incluir compuestos no formulados, compuestos unidos covalentemente al colesterol, y compuestos unidos a anticuerpos dirigidos (Song y otros, Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors, Nat Biotechnol.2005. 23(6):709-17). Los ARNip conjugados con colesterol (y otros ARNip conjugados con esteroides y lípidos) pueden usarse para el suministro (ver por ejemplo Soutschek y otros Nature. 2004. 432:173-177; y Lorenz y otros Bioorg. Med. Chem Lett. 2004. 14:4975-4977).

Los ARNip desnudos o las composiciones farmacéuticas que comprenden los ARNip químicamente modificados de la presente invención se administran y se dosifican de acuerdo con la buena práctica médica, que tiene en cuenta el estado clínico del paciente individual, la enfermedad a tratar, el lugar y el método de administración, el esquema de administración, la edad del paciente, el sexo, el peso corporal y otros factores conocidos por los médicos.

La "dosis terapéuticamente eficaz" para los propósitos en la presente está determinada por consideraciones tales como las conocidas en la técnica. La dosis debe ser eficaz para conseguir una mejora que incluye, pero no se limita a la tasa de supervivencia mejorada o la recuperación más rápida, o la mejora o eliminación de los síntomas y otros indicadores

que se seleccionan como medidas apropiadas por aquellos con experiencia en la técnica. El ARNip de la invención puede administrarse en una dosis única o en dosis múltiples.

En general, la dosis activa del compuesto para seres humanos está en el intervalo de 1 ng/kg a aproximadamente 20-100 mg/kg peso corporal por día, preferentemente aproximadamente 0.01 mg a aproximadamente 2-10 mg/kg peso corporal por día, en un régimen de una dosis por día o dos o tres o más veces por día por un periodo de 1-4 semanas o más.

Los compuestos de ARNip modificados de la presente invención pueden administrarse por cualquiera de las vías convencionales de administración. Los compuestos de ARNip modificados pueden administrarse por vía oral, subcutánea o parenteral que incluyen la administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, intraocular, ocular, ótica, transtimpánica e intranasal, técnicas de instilación intratecal e inhalación intratecal, así como también de infusión. Los implantes de los compuestos son también útiles.

Las formas líquidas se preparan para administración invasiva, por ejemplo, inyección o para administración tópica o local o no invasiva. El término inyección incluye las vías de administración subcutánea, transdérmica, intravenosa, intramuscular, intratecal, intraocular, transtimpánica y otras parenterales. Las composiciones líquidas incluyen las soluciones acuosas, con y sin co-solventes orgánicos, o las suspensiones acuosas o de aceite, las emulsiones con aceites comestibles, así como los vehículos farmacéuticos similares. En una modalidad particular, la administración comprende la administración intravenosa.

En algunas modalidades, los compuestos de la presente invención se formulan para la administración no invasiva. En algunas modalidades, los compuestos de la presente invención se formulan como gotas para los oídos para la administración tópica en el oído. En algunas modalidades, los compuestos de la presente invención se formulan como gotas oculares para administración tópica a la superficie del ojo. Más información sobre la administración de los compuestos de la presente invención puede encontrarse en Tolentino y otros, Retina (2004). 24:132-138; y Reich y otros, Molecular Vision, 2003. 9:210-216. Adicionalmente, en ciertas modalidades las composiciones para uso en los tratamientos de la presente invención se forman como aerosoles, por ejemplo para la administración intranasal. En ciertas modalidades, las composiciones para usar en los tratamientos de la presente invención se forman como gotas nasales, por ejemplo para instilación intranasal.

Las composiciones terapéuticas de la presente invención se administran preferentemente en el pulmón mediante la inhalación de un aerosol que contiene estas composiciones / compuestos, o por la instilación intranasal o intratraqueal de dichas composiciones. Para más información sobre el suministro pulmonar de composiciones farmacéuticas, ver Weiss y otros, Human Gene Therapy 1999. 10:2287-2293; Densmore y otros, Molecular therapy 1999. 1:180-188; Gautam y otros, Molecular Therapy 2001. 3:551-556; y Shahiwal & Misra, AAPS PharmSciTech 2004. 24;6(3):E482-6. Adicionalmente, las formulaciones respiratorias para ARNip se describen en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2004/0063654. Las formulaciones respiratorias para ARNip se describen en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2004/0063654.

En ciertas modalidades, las composiciones orales (tales como comprimidos, suspensiones, soluciones) pueden ser eficaces para el suministro local a la cavidad oral, tal como la composición oral adecuada para enjuague bucal para el tratamiento de la mucositis oral.

En una modalidad particular, los compuestos de ARNip modificados de la invención están formulados para administración intravenosa para suministro al riñón para el tratamiento de trastornos renales, por ejemplo, insuficiencia renal aguda (ARF), función de injerto retardado (DGF) y retinopatía diabética. Se observa que el suministro de los compuestos de ARNip modificados de acuerdo con la presente invención a las células diana en los túbulos renales proximales es particularmente eficaz en el tratamiento de ARF y DGF.

El suministro de compuestos al cerebro se logra mediante varios métodos, tales como, *entre otros*, implantes neuroquirúrgicos, interrupción de la barrera hematoencefálica, transporte mediado por lípidos, afluencia o flujo de salida mediado por portadores, transporte mediado por proteínas plasmáticas, transcitosis mediada por receptores, transcitosis mediada por absorción, transporte de neuropéptidos en la barrera hematoencefálica y diseño por ingeniería genética de "caballos de Troya" para la orientación de fármacos. Los métodos anteriores se realizan, por ejemplo, como se describe en "Brain Drug Targeting: the future of brain drug development", WM Pardridge, Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido (2001).

Adicionalmente, en ciertas modalidades las composiciones para uso en los tratamientos de la presente invención se forman como aerosoles, por ejemplo para la administración intranasal.

El suministro intranasal para el tratamiento de enfermedades del SNC se ha logrado con inhibidores de acetilcolinesterasa tal como la galantamina y diversas sales y derivados de la galantamina, por ejemplo, como se describe en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2006003989 y las publicaciones de solicitudes PCT núms. WO 2004/002402 y WO 2005/102275. El suministro intranasal de ácidos nucleicos para el tratamiento de enfermedades del SNC, por ejemplo por instilación intranasal de gotas nasales, se ha descrito, por ejemplo, en la publicación de solicitud PCT núm. WO 2007/107789.

Métodos de Tratamiento

- En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de ARNip modificado de la presente invención para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que padece un trastorno asociado con la expresión génica diana que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto de ARNip modificado de la presente invención. En modalidades preferidas, el sujeto que se trata es un animal de sangre caliente y, particularmente, mamíferos, que incluyen seres humanos.
- "Tratar un sujeto" se refiere a administrar al sujeto una sustancia terapéutica eficaz para mejorar los síntomas asociados con una enfermedad, para disminuir la gravedad o curar la enfermedad, para retrasar el progreso de la enfermedad, para prevenir que ocurra la enfermedad o para posponer la aparición de la enfermedad. "Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en donde el objetivo es prevenir un trastorno, retrasar la aparición del trastorno o reducir los síntomas de un trastorno. Aquellos con necesidad de tratamiento incluyen aquellos que ya experimentan la enfermedad o afección, los propensos a tener la enfermedad o afección, y aquellos en los que la enfermedad o afección tiene que ser prevenida. Los compuestos de la invención se administran antes, durante o después de la aparición de la enfermedad o afección.
- Una "dosis terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto o composición farmacéutica que es eficaz para alcanzar una mejora en un sujeto o de sus sistemas fisiológicos que incluyen, pero sin limitarse a, mejora de la tasa de supervivencia, recuperación más rápida, mejora o eliminación de los síntomas, retraso de la aparición del trastorno, enlentecer el progreso de la enfermedad y otros indicadores seleccionados como medidas de determinación adecuadas por aquellos con experiencia en la técnica.
- "Trastorno respiratorio" se refiere a las afecciones, enfermedades o síndromes del sistema respiratorio que incluyen pero sin limitarse a trastornos pulmonares de todo tipo que incluyen la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfisema, bronquitis crónica, asma y cáncer de pulmón, *entre otros*. El enfisema y la bronquitis crónica pueden ocurrir como parte de la COPD o de forma independiente. En diversas modalidades, la presente invención proporciona métodos y composiciones útiles para prevenir o tratar el fallo primario del injerto, la lesión por isquemia-reperfusión, la lesión por reperfusión, el edema de reperfusión, la disfunción de aloinjerto, la respuesta de reimplantación pulmonar y/o la disfunción primaria del injerto (PGD) después del trasplante de órganos, en particular en trasplante de pulmón, en un sujeto que lo necesite.
- "Trastorno microvascular" se refiere a cualquier afección que afecte los capilares microscópicos y linfáticos, en particular las enfermedades vasoespásticas, enfermedades vasculíticas y enfermedades oclusivas linfáticas. Ejemplos de trastornos microvasculares incluyen, *entre otros*: Trastornos oculares como Amaurosis Fugax (embólica o secundaria al LES), síndrome de aplasia, deficiencia de Prot CS y ATIII, patologías microvasculares causadas por el uso de drogas intravenosas, disproteinemia, arteritis temporal, neuropatía óptica isquémica (ION), neuropatía óptica isquémica anterior (AION), neuritis óptica (primaria o secundaria a enfermedades autoinmunes), glaucoma, síndrome de von Hippel Lindau, enfermedad de la córnea, cataratas de rechazo de trasplante de córnea, enfermedad de Eales, angeítis de rama escarchada, operación de pando circundante, uveítis incluyendo pars planitis, melanoma coroidal, hemangioma coroidal, aplasia del nervio óptico; Condiciones de la retina como la oclusión de la arteria retiniana, la oclusión de la vena retiniana, la retinopatía del prematuro, la retinopatía del HIV, la retinopatía de Purtscher, la retinopatía de la vasculitis sistémica y las enfermedades autoinmunes, la retinopatía diabética y la retinopatía hipertensiva, retinopatía por radiación, oclusión de la arteria o vena retiniana ramificada, vasculitis retiniana idiopática, aneurismas, neurorretinitis, embolización retiniana, necrosis retiniana aguda, retinocoroidopatía en perdigón, desprendimiento de retina de larga duración; afecciones sistémicas como la diabetes mellitus, la retinopatía diabética (RD), las patologías microvasculares relacionadas con la diabetes (como se detalla en la presente descripción), los síndromes de hiperviscosidad, los síndromes del arco aórtico y los síndromes isquémicos oculares, la fístula carotídea-cavernosa, la escleritis múltiple, el lupus eritematoso sistémico, arteriolitis con autoanticuerpos SS-A, vasculitis hemorrágica multifocal aguda, vasculitis por infección, vasculitis por enfermedad de Behçet, sarcoidosis, coagulopatías, neuropatías, nefropatías, enfermedades microvasculares del riñón y afecciones microvasculares isquémicas, *entre otras*.
- Los trastornos microvasculares pueden comprender un elemento neovascular. El término "trastorno microvascular" se refiere a aquellas afecciones donde la formación de los vasos sanguíneos (neovascularización) es nociva para el paciente. Ejemplos de neovascularización ocular incluyen: enfermedades de la retina (retinopatía diabética, edema macular diabético, glaucoma crónico, desprendimiento de retina y retinopatía drepanocítica); iritis por rubeosis; vitreoretinopatía proliferativa; enfermedades inflamatorias; uveítis crónica; neoplasias (retinoblastoma, pseudoglioma y melanoma); iridociclitis heterocrómica de Fuchs; glaucoma neovascular; neovascularización de la córnea (inflamación, trasplante e hipoplasia del iris); neovascularización después de una vitrectomía y una lentescomía combinadas; enfermedades vasculares (isquemia retiniana, insuficiencia vascular coroidal, trombosis coroidal e isquemia de la arteria carótida); neovascularización del nervio óptico; y neovascularización debido a la penetración en el ojo o lesión ocular contusiva. En diversas modalidades todas estas afecciones neovasculares se tratan mediante el uso de los compuestos y las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

"Enfermedad ocular" se refiere a las afecciones, enfermedades o síndromes de los ojos que incluyen pero sin limitarse a cualesquiera afecciones que involucren la neovascularización coroidea (CNV), AMD húmeda y seca, síndrome de histoplasmosis ocular, estrías angioides, rupturas en la membrana de Bruch, degeneración miope, tumores oculares, enfermedades degenerativas de la retina y oclusión de la vena de la retina (RVO). En diversas modalidades, las afecciones descritas en la presente, tal como DR, que pueden considerarse ya sea como trastorno microvascular o como una enfermedad ocular, o ambos, bajo las definiciones presentadas en la presente descripción, se tratan de acuerdo con los métodos de la presente invención.

Más específicamente, la invención presente proporciona composiciones útiles en el tratamiento de un sujeto que sufre o es susceptible al síndrome de dificultad respiratoria del adulto (ARDS); enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD); lesión pulmonar aguda (ALI); Enfisema; Neuropatía diabética, nefropatía y retinopatía; edema macular diabético (DME) y otras afecciones diabéticas; glaucoma; degeneración macular relacionada con la edad (AMD); retinopatía por trasplante de médula ósea (BMT); afecciones isquémicas; síndrome isquémico ocular (OIS); trastornos renales: insuficiencia renal aguda (ARF), retraso de la función del injerto (DGF), rechazo del trasplante; trastornos auditivos (que incluye la pérdida de audición); lesiones de la médula espinal; mucositis oral; síndrome del ojo seco y llagas por presión; trastornos neurológicos derivados de afecciones isquémicas o hipóxicas, como hipertensión, enfermedad vascular cerebral hipertensiva, constricción u obstrucción de un vaso sanguíneo, como ocurre en el caso de un trombo o émbolo, angioma, discrasias sanguíneas, cualquier forma de función cardíaca comprometida, incluido el paro o fallo cardíaco, hipotensión sistémica; accidente cerebrovascular, enfermedad, trastornos y lesiones del SNC, incluyendo, sin limitarse a, epilepsia, lesión de la médula espinal, lesión cerebral y trastornos neurodegenerativos, que incluye, sin limitarse a la enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ALS, enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington y cualquier otra demencia inducida por la enfermedad (como la demencia asociada al HIV, por ejemplo).

La presente invención se relaciona con compuestos y composiciones útiles en el tratamiento del cáncer. Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitarse a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o malignidades linfoides. Otros ejemplos de tales cánceres incluyen el cáncer de riñón o renal, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el cáncer de recto, el cáncer colorrectal, el cáncer de pulmón, incluido el cáncer de pulmón de células pequeñas, el cáncer de pulmón de células no pequeñas, el adenocarcinoma de pulmón y el carcinoma escamoso de pulmón, el cáncer de células escamosas (p. ej. cáncer epitelial de células escamosas), cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluido el cáncer gastrointestinal, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello, glioblastoma, retinoblastoma, astrocitoma, teomas, arrenoblastomas, hepatoma, neoplasias hematológicas que incluyen linfoma no Hodgkin (NHL), mieloma múltiple y neoplasias hematológicas agudas, carcinoma endometrial o uterino, endometriosis, fibrosarcomas, coriocarcinoma, carcinoma de la glándula salival, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinomas esofágicos, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peneano, carcinoma nasofaríngeo, carcinomas laríngeos, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinomas de piel, Schwannoma, oligodendroglioma, neuroblastomas, rhabdomyosarcoma, sarcoma osteogénico, leiomyosarcomas, carcinomas del tracto urinario, carcinomas de tiroides, tumor de Wilm, así como linfoma de células B (que incluyen linfoma no Hodgkin (NHL) de bajo grado/folicular; NHL linfocítico pequeño (LSL); NHL intermedio/folicular; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblástico de alto grado; LNH de alto grado; NHL de células pequeñas no hendidas de alto grado; NHL de enfermedad voluminosa; NHL de células del manto; linfoma relacionado con el SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenström); leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia linfoblástica aguda (CLL); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; y trastorno linfoproliferativo postrasplante (PTLD), así como proliferación vascular anormal asociada con la farmacomatosis, edema (como el asociado con tumores cerebrales) y síndrome de Meigs. "Tumor", como se usa en la presente, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sean malignas o benignas, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

Los trastornos fibróticos incluyen fibrosis hepática, cirrosis, fibrosis pulmonar que incluye fibrosis pulmonar (que incluye ILF), fibrosis renal resultante de cualquier afección (por ejemplo, CKD que incluye ESRD), fibrosis peritoneal, daño hepático crónico, fibrillogénesis, enfermedades fibróticas en otros órganos, cicatrización anormal (queloides) asociada con todos los tipos posibles de lesiones cutáneas accidentales y iatrogénicas (operaciones); esclerodermia cardiofibrosis, fallo de la operación de filtración de glaucoma; y adherencias intestinales.

Adicionalmente, la descripción describe un método de regulación negativa de la expresión de un gen diana en al menos 20%, 30%, 40% o 50% en comparación con un control que comprende poner en contacto el ARNm diana con uno o más de los compuestos de ARNip modificados de la presente invención. En diversas modalidades, el compuesto de ARNip modificado de la presente invención regula negativamente el gen diana mediante lo cual la regulación negativa se selecciona del grupo que comprende la regulación negativa de la función génica, la regulación negativa del polipéptido y la regulación negativa de la expresión de ARNm.

La descripción describe un método para inhibir la expresión del gen diana en al menos 20%, 30% o 40%, preferentemente en 50%, 60% o 70%, con mayor preferencia en 75%, 80% o 90% en comparación a un control que comprende poner en contacto un transcrito de ARNm del gen diana con uno o más de los compuestos de ARNip modificados de la invención.

En una modalidad, el compuesto de ARNip modificado de la invención inhibe el polipéptido del gen diana, por lo que la inhibición se selecciona del grupo que comprende la inhibición de la función (que se examina, por ejemplo, mediante un ensayo enzimático o un ensayo de unión con un producto de interacción conocido del gen / polipéptido nativo, *entre otros*), la inhibición de la proteína diana (que se examina mediante, por ejemplo, transferencia Western, ELISA o inmunoprecipitación, *entre otros*) e inhibición de la expresión del ARNm diana (que se examina, por ejemplo, mediante transferencia Northern, RT-PCR cuantitativa, hibridación in situ o hibridación de microarreglos, *entre otros*).

En modalidades adicionales, la invención proporciona un compuesto de ARNip modificado o una composición de la invención para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que padece o es susceptible a cualquier enfermedad o trastorno acompañado de un nivel elevado de un gen diana de mamífero o no mamífero, el método que comprende administrar al sujeto dicho compuesto de ARNip modificado o composición de la invención en una dosis terapéuticamente eficaz para tratar de ese modo al sujeto.

La presente invención se refiere a compuestos que regulan negativamente la expresión de un gen diana de mamífero, particularmente a compuestos de ARN modificado de acuerdo con la estructura (A) para su uso en el tratamiento de las siguientes enfermedades o afecciones en las que la inhibición de la expresión del gen diana de mamífero es beneficioso: ARDS; COPD; ALI; enfisema; neuropatía diabética, nefropatía y retinopatía; DME y otras afecciones diabéticas; glaucoma; AMD; retinopatía BMT; afecciones isquémicas que incluyen derrame cerebral; OIS; trastornos neurodegenerativos tales como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ALS; trastornos renales: ARF, DGF, rechazo de trasplante; trastornos de la audición; lesiones de la médula espinal; mucositis oral; cáncer que incluye cáncer de tumor sólido y hematopoyético, síndrome de ojo seco y úlceras por presión. En otra modalidad, los compuestos de la presente invención son útiles en el almacenamiento y / o conservación de órganos antes del trasplante.

Por "exposición a un agente tóxico" se entiende que el agente tóxico se pone a disposición de un mamífero o entra en contacto con él. Un agente tóxico puede ser tóxico para el sistema nervioso. La exposición a un agente tóxico puede ocurrir por administración directa, por ejemplo, por ingestión o administración de un agente alimenticio, medicinal o terapéutico, por ejemplo, un agente quimioterapéutico, por contaminación accidental, o por exposición ambiental, por ejemplo, exposición aérea o acuosa.

En otras modalidades, los compuestos de ARNip químicamente modificados de la invención son útiles para tratar o prevenir la incidencia o gravedad de otras enfermedades y afecciones en un sujeto. Estas enfermedades y afecciones incluyen, pero sin limitarse a, apoplejía y situaciones similares a la apoplejía (por ejemplo, fallo cerebral, renal, cardíaca), muerte celular neuronal, lesiones cerebrales con o sin reperusión, lesión de la médula espinal, enfermedades crónicas degenerativas, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas que incluyen, Enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, atrofia espinobulbar, enfermedad priónica y apoptosis como resultado de una lesión cerebral traumática (TBI). En una modalidad adicional, los compuestos de la invención se dirigen a proporcionar neuroprotección y/o protección cerebral.

El gen diana se selecciona sin limitación del grupo que consiste en p53 (TP53), TP53BP2, LRDD, CYBA, ATF3, CASP2 (Caspase 2), NOX3, HRK; C1QBP, BNIP3, MAPK8; Rac1, GSK3B, CD38, STEAP4, BMP2a; GJA1, TYROBP, CTGF, SPP1, RTN4R, ANXA2, RHOA, DUOX1, SLC5A1, SLC2A2, AKR1B1, SORD, SLC2A1, MME, NRF2, SRM, REDD2 (RTP801L), REDD1 (RTP801), NOX4, MYC, PLK1, ESPL1, HTRA2, KEAP1, p66, ZNHIT1, LGALS3, CYBB (NOX2), NOX1, NOXO1, ADRB1, HI 95, ARF1, ASPP1, SOX9, FAS, FASLG, MLL humano, AF9, CTSD, CAPNS1, CD80, CD86, HES1, HES5, CDKN1B, ID1, ID2, ID3, CDKN2A, Caspasa 1, Caspasa 3, Caspasa 4, Caspasa 5, Caspasa 6, Caspasa 7, Caspasa 8, Caspasa 9, Caspasa 10, Caspasa 12, Caspasa 14, Apaf-1, Nod1, Nod2, Ipaf, DEFCAP, RAIDD, RICK, Bcl10, ASC, TUCAN, ARC, CLARP, FADD, DEDD, DEDD2, Criopirin, PYC1, Pirin, TRADD, UNC5a, UNC5b, UNC5c, ZUD, p84N5, LRDD, CDK1, CDK2, CDK4, CDK5, CDK9, PITSLRE A, CHK2, LATS1, Prk, MAP4K1, MAP4K2, STK4, SLK, GSK3alfa, GSK3beta, MEKK1, MAP3K5 (Ask1), MAP3K7, MAP3K8, MAP3K9, MAP3K10, MAP3K11, MAP3K12, DRP-1, MKK6, p38, JNK3, DAPK1, DRAK1, DRAK2, IRAK, RIP, RIP3, RIP5, PKR, IRE1, MSK1, PKCalfa, PKCbeta, PKCdelta, PKCepsilon, PKCeta, PKCmu, PKCtheta, PKCzeta, CAMK2A, HIPK2, LKB1, BTK, c-Src, FYN, Lck, ABL2, ZAP70, TrkA, TrkB, MYLK, FGFR2, EphA2, AATYK, c-Met, RET, PRKAA2, PLA2G2A, SMPD1, SMPD2, SPP1, FAN, PLCG2, IP6K2, PTEN, SHIP, AIF, AMID, Citocromo c, Smac, HtrA2, TSAP6, DAP-1, FEM-, DAP-3, Granzyme B, DIO-1, DAXX, CAD, CIDE-A, CIDE-B, Fsp27, Ape1, ERCC2, ERCC3, BAP31, Bit1, AES, Huntingtin, HIP1, hSir2, PHAP1, GADD45b, GADD34, RAD21, MSH6, ADAR, MBD4, WW45, ATM, mTOR, TIP49, diubiquitina/FAT10, FAF1, p193, Scythe/BAT3, Amida, IGFBP-3, TDAG51, MCG10, PACT, p52/RAP, ALG2, ALG3, presenelina-1, PSAP, AIP1/Alix, ES18, mda-7, p14ARF, ANT1, p33ING1, p33ING2, p53AIP1, p53DINP1, MGC35083, NRAGE, GRIM19, lipocalina 2, glicodelina A, NADE, Porimin, STAG1, DAB2, Galectina-7, Galectina-9, SPRC, FLJ21908, WWOX, XK, DKK-1, Fzd1, Fzd2, SARP2, axina 1, RGS3, DVL1, Nfkb2, Ikbalfa, NF-ATC1, NF-ATC2, NF-ATC4, zf3/ZNF319, Egr1, Egr2, Egr3, Sp1, TIEG, WT1, Zac1, Icaros, ZNF148, ZK1/ZNF443, ZNF274, WIG1, HIVEP1, HIVEP3, Fliz1, ZPR9, GATA3, TR3, PPARG, CSMF, RXRa, RARa, RARb, RARg, T3Ra, Erbeta, VDR, GR/GCCR, p53, p73alfa, p63(humano [ta alfa, ta beta, ta gamma, da alfa, a beta, da gamma]), 53BP2, ASPP1, E2F1, E2F2, E2F3, HIF1 alfa, TCF4, c-Myc, Max, Mad, MITF, Id2, Id3, Id4, c-Jun, c-Fos, ATF3, NF-IL6, CHOP, NRF1, c-Maf, Bach2, Mx2, Csx, Hoxa5, Ets-1, PU1/Spi1, Ets-2, ELK1, TEL1, c-Myb, TBX5, IRF1, IRF3, IRF4, IRF9, AP-2 alfa, FKHR, FOXO1A, FKHL1, FOXO3a, AFX1, MLLT7, Tip60, BTG1, AUF1, HNRPD, TIA1, NDG1, PCBP4, MCG10, FXR2, TNFR2, LTbr, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, TNFRSF19, XEDAR, Fn14, OPB, DcR3, FAS, TNFR1, WSL-1, p75NTR, DR4, DR5, DR6, EDAR, TNF alfa, FAS ligando, TRAIL, Limfotoxina alfa, Limfotoxina beta, 4-1BBL, RANKL, TL1, TWEAK, LIGHT, APRIL, IL-1-alfa, IL-1-beta, IL-18, FGF8, IL-2, IL-21, IL-5, IL-4, IL-6, LIF, IL-12, IL-

7, IL-10, IL-19, IL-24, IFN alfa, IFN beta, IFN gamma, M-CSF, Prolactinm, TLR2, TLR3, TLR4, MyD88, TRIF, RIG-1, CD14, TCR alfa, CD3 gamma, CD8, CD4, CD7, CD19, CD28, CTLA4, SEMA3A, SEMA3B, HLA-A, HLA-B, HLA-L, HLA-Dmalfa, CD22, CD33, CALL, DCC, ICAM1, ICAM3, CD66a, PVR, CD47, CD2, Thy-1, SIRPa1, CD5, E-cadherina, ITGAM, ITGAV, CD18, ITGB3, CD9, IgE Fc R beta, CD82, CD81, PERP, CD24, CD69, KLRD1, galectin 1, B4GALT1, C1q alfa, C5R1, MIP1 alfa, MIP1 beta, RANTES, SDF1, XCL1, CCKR5, OIAS/OAS1, INDO, MxA, IFI16, AIM2, iNOS, HB-EGF, HGF, MIF, TRAF3, TRAF4, TRAF6, PAR-4, IKKGamma, FIP2, TXBP151, FLASH, TRF1, IEX-1S, Dok1, BLNK, CIN85, Bif-1, HEF1, Vav1, RasGRP1, POSH, Rac1, RhoA, RhoB, RhoC, ALG4, SPP1, TRIP, SIVA, TRABID, TSC-22, BRCA1, BARD1, 53BP1, MDC1, Mdm4, Siah-1, Siah-2, RoRet, TRIM35, PML, RFWD1, DIP1, Socs1, PARC, USP7, CYLD, SERPINH1 (HSP47). Otros genes diana útiles son los genes de origen microbiano.

Terapia de Combinación

Los métodos para tratar las enfermedades descritas en la presente incluyen la administración de una molécula modificada de ácido nucleico de doble cadena descrita en la presente de conjunto o en combinación con un inhibidor adicional, una sustancia que mejora las propiedades farmacológicas del compuesto de ARNip modificado o un compuesto adicional que se sabe que es eficaz en el tratamiento de un sujeto que padece o es susceptible a cualquiera de las enfermedades y trastornos mencionados anteriormente, que incluyen el trastorno microvascular, enfermedad y afección ocular (por ejemplo, degeneración macular), discapacidad auditiva (que incluye la pérdida auditiva), trastorno respiratorio, trastorno renal, trasplante de órganos, trastorno neurodegenerativo, lesión de la médula espinal, lesión cerebral, afección relacionada con la angiogénesis y la apoptosis.

La presente invención proporciona así en otro aspecto, una composición farmacéutica que comprende una combinación de un compuesto de ARNip modificado terapéuticamente de la invención junto con al menos un agente terapéuticamente activo adicional. Por "en conjunto con" o "en combinación con" se entiende antes de, simultáneamente o después de. En consecuencia, los componentes individuales de tal combinación se administran secuencialmente o simultáneamente a partir de la misma o de formulaciones farmacéuticas separadas.

Las terapias de combinación que comprenden tratamientos conocidos para el tratamiento de trastornos microvasculares, enfermedades y afecciones oculares (por ejemplo, degeneración macular), deficiencias auditivas (que incluye la pérdida auditiva), trastornos respiratorios, trastornos renales, trasplante de órganos, trastornos neurodegenerativos (por ejemplo, lesión de la médula espinal), afecciones relacionadas con la angiogénesis y apoptosis, junto con los compuestos de ARNip modificados y las terapias descritas en la presente se consideran parte de la presente invención.

En consecuencia, en otro aspecto de la presente descripción, se administra un compuesto farmacéuticamente eficaz adicional junto con la composición farmacéutica de la invención. Además, los compuestos de ARNip modificados de la invención se usan en la preparación de un medicamento para usar como terapia complementaria con un segundo compuesto terapéuticamente activo para tratar tales afecciones. Aquellos con experiencia en la técnica aprecian fácilmente las dosis apropiadas de segundos agentes terapéuticos conocidos para su uso en combinación con un compuesto de ARNip modificado químicamente de la invención.

En algunas modalidades, las combinaciones mencionadas anteriormente se presentan para su uso en forma de una formulación farmacéutica única.

La administración de una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los conjugados de ARNip farmacéuticamente activos de acuerdo con la invención se lleva a cabo por cualquiera de las muchas vías de administración conocidas, que incluyen intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intracerebral, como se determina por un médico experto. Con el uso de formulaciones especializadas, es posible administrar las composiciones por vía oral o por inhalación o por instilación intranasal. En algunas modalidades, un compuesto de la presente invención se formula para administración tópica, que incluye gotas para los oídos, gotas para los ojos, formulación dérmica, formulación transdérmica y similares.

Por "junto con" se entiende que el compuesto farmacéuticamente eficaz adicional se administra antes, al mismo tiempo o después de la administración de los compuestos o las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Los componentes individuales de esa combinación mencionada anteriormente, por tanto, se administran ya sea secuencialmente o simultáneamente a partir de la misma o de formulaciones farmacéuticas separadas. Como es el caso de los presentes compuestos de ARNip modificados, puede administrarse un segundo agente terapéutico por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por vía oral, bucal, inhalación, sublingual, rectal, vaginal, transuretral, nasal, ótica, ocular, tópica, percutánea (es decir, transdérmica) o parenteral (que incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intracoronaria).

En algunas modalidades, un compuesto de ARNip modificado de la invención y el segundo agente terapéutico se administran por la misma vía, ya sea proporcionada en una composición única o como dos o más composiciones farmacéuticas diferentes. Sin embargo, en otras modalidades, es posible o preferida una vía de administración diferente para el compuesto de ARNip modificado de la invención y del segundo agente terapéutico. Los expertos en la técnica son conscientes de los mejores modos de administración para cada agente terapéutico, ya sea solo o en combinación.

En diversas modalidades, los compuestos de ARNip modificados de la presente invención son el componente activo principal en una composición farmacéutica.

En otros aspectos, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende dos o más moléculas de ARNip para el tratamiento de una enfermedad y para cualquiera de las enfermedades y afecciones mencionadas en la presente descripción. En algunas modalidades, las dos o más moléculas de ARNip o formulaciones que comprenden dichas moléculas se mezclan en la composición farmacéutica en cantidades que generan una actividad igual o de cualquier otra manera beneficiosa. En ciertas modalidades, las dos o más moléculas de ARNip están unidas covalentemente o no covalentemente, o unidas entre sí por un conector de ácido nucleico de una longitud que varía de 2-100, preferentemente 2-50 o 2-30 nucleótidos.

En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden además una o más moléculas de ARNip adicionales, que se dirigen a uno o más genes adicionales. En algunas modalidades, la inhibición simultánea de dicho(s) gene(s) adicional (es) proporciona un efecto sinérgico o aditivo para el tratamiento de las enfermedades descritas en la presente descripción.

El régimen de tratamiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo, en términos del modo de administración, el momento de la administración y la dosificación, de modo que se mejore la recuperación funcional del paciente de las consecuencias adversas de las afecciones descritas en la presente descripción o para posponer la aparición de un trastorno.

La invención se ha descrito de manera ilustrativa, y se entenderá que la terminología usada pretende esté en la naturaleza de las palabras de la descripción más bien que de limitación.

Son posibles numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención a la luz de las enseñanzas anteriores. Se entiende, por lo tanto, que dentro del alcance de las reivindicaciones anexas, la invención puede practicarse de cualquier otra forma que como la específicamente descrita.

La presente invención se ilustra en detalle más abajo con referencia a ejemplos, pero no debe interpretarse como limitada a los mismos.

La cita de cualquier documento en la presente descripción no debe pretenderse como una admisión de que el documento sea técnica anterior pertinente o material considerado para la patentabilidad de cualquier reivindicación de la presente solicitud. Cualquier declaración acerca del contenido o una fecha de cualquier documento se basa en la información disponible por el solicitante en el momento de la presentación y no constituye una admisión acerca de la exactitud de dicha declaración.

EJEMPLOS

Sin elaboración adicional, se cree que una persona con experiencia en la técnica pueden, mediante el uso de la descripción anterior, utilizar la presente invención en toda su extensión. Las siguientes modalidades preferidas específicas son, por lo tanto, construidas meramente como ilustrativas, y de ninguna manera limitativas de la invención reivindicada.

Los protocolos estándar de biología molecular conocidos en la técnica no descritos específicamente en la presente descripción generalmente se siguen esencialmente como en Sambrook y otros, Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992)), y en Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Baltimore, Maryland (1988), y como en Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Baltimore, Maryland (1989)) y como en Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley & Sons, Nueva York (1988), y como en Watson y otros, DNA recombinante, Scientific American Books, Nueva York y en Birren y otros (eds) Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, Vols. 1-4 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998) y la metodología que se expone en las patentes de Estados Unidos núms. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 y 5,272,057. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó generalmente como en PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press, San Diego, CA (1990). La PCR in situ (en la célula) en combinación con la Citometría de Flujo pueden usarse para la detección de células que contienen ADN específico y las secuencias de ARNm (Testoni y otros, 1996, Blood 87:3822.) Además los métodos de realización de la RT-PCR son bien conocidos en la técnica.

Ejemplo 1. Generación de secuencias para ARNips para genes diana y producción de los compuestos ARNip modificados

Con el uso de algoritmos patentados y la secuencia conocida de cualquier gen, opcionalmente los genes pro-apoptóticos descritos en la presente descripción, se generaron secuencias de t19-mer de muchos ARNip potenciales. Adicionalmente al algoritmo, algunas de las secuencias de oligómeros de 23-mer se generaron por extensión 5' y/o 3' de las secuencias de 19-mer. Las secuencias de hebras no codificantes que se generaron mediante el uso de este método son total o sustancialmente complementarias a una sección de secuencia de ARNm diana. En algunas modalidades, la secuencia no codificante es completamente complementaria a una sección de la secuencia de ARNm correspondiente. Para generar los compuestos de ARNsi modificados de la invención, el nucleótido en la posición 5' terminal de la cadena no codificante

(N)x (posición 1; N') se sustituyó para generar una molécula de ácido nucleico bicatenario de modalidades de la estructura (A). En otros ejemplos, el nucleótido en la posición 5' terminal de la hebra no codificante (N)x y el nucleótido en la posición 3' terminal de la hebra codificante (N')y se sustituyeron para generar la molécula de ácido nucleico bicatenario de modalidades de la estructura (A).

La Tabla A proporciona secuencias de nucleótidos de hebras codificante y no codificante de compuestos usados en algunos ejemplos. La Tabla A1 proporciona moléculas ilustrativas de ácido nucleico de doble cadena que se generaron como se describe para proporcionar compuestos de ARNip modificados de acuerdo con las modalidades de la estructura (A). Los compuestos que se muestran en la presente descripción no pretenden ser limitantes y cualquier ARN diana puede usarse para identificar moléculas de ácido nucleico de doble cadena como se describe en la presente descripción. La Tabla A2 proporciona compuestos de ARNip modificados que se generaron para pruebas comparativas. Los compuestos ARNip modificados en las Tablas A1 y A2 se dirigen a TLR2 (receptor 2 tipo toll de Homo sapiens (TLR2), ARNm, gi|68160956|ref|NM_003264.3|, Sec con núm. de ident.: 4) y CAPNS1 (calpaína, variante de subunidad 1 pequeña gi|51599152|ref|NM_001749.2|; Sec con núm. de ident.: 1 o calpaína, variante 2 de subunidad 1 pequeña gi|51599150|ref|NM_001003962.11, Sec con núm. de ident.: 2). Los compuestos adicionales se dirigen al ARNm de RhoA humano (familia de genes homólogos de ras, miembro A (RhoA), ARNm gi|50593005|ref| NM_001664.2 |, Sec con núm. de ident.: 3). Las secuencias de ARNm de genes diana de mamíferos están disponibles, por ejemplo, en el sitio web de NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>].

Tabla A

molécula de ARNbc	Sec núm. ident.	con de	CODIFICANTE	Sec núm. ident.	con de	NO CODIFICANTE
CAPNS1_23	5		GAGAUGACAUGGAGGUCAG	10		CUGACCUCCAUGUCAUCUC
TLR2_16	6		GAGUGGUGCAAGUAUGAAC	11		GUUCAUACUUGCACCACUC
TLR2_37	7		GGUGGAGAACCUUAUGGUC	12		GACCAUAAGGUUCUCCACC
TLR2_46	8		AGAUAUAUGAACCAAGAC	13		GUCUUGGUGUUAUUAUCU
RHOA_61	9		GAUCUUCGGAUGAUGAGA	14		UCUCAUCAUCCGAAGAUC

Tabla A1: Moléculas de doble cadena TLR2 ilustrativas

Compuesto de ARNip	(N')y		
	(N)x		
TLR2_16_S1016	SEN	5' <u>GAGUGGUGCAAGUAUGAAG</u>	3'
	AS	5' UUUCAUACUUGCACCACUC	3'
TLR2_16_S1018	SEN	5' <u>GAGUGGUGCAAGUAUGAAG</u>	3'
	AS	5' CUUCAUACUUGCACCACUC	3'
TLR2_16_S1019	SEN	5' <u>GAGUGGUGCAAGUAUGAAG</u>	3'
	AS	5' dUUUCAUACUUGCACCACUC	3'
TLR2_16_S1020	SEN	5' <u>GAGUGGUGCAAGUAUGAAG</u>	3'
	AS	5' dBUUCAUACUUGCACCACUC	3'
TLR2_16_S1022	SEN	5' <u>GAGUGGUGCAAGUAUGAAU</u>	3'
	AS	5' UUUCAUACUUGCACCACUC	3'
TLR2_16_S1024	SEN	5' <u>GAGUGGUGCAAGUAUGAAU</u>	3'
	AS	5' CUUCAUACUUGCACCACUC	3'

5	TLR2_16_S1025	SEN	5' <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>U</u>	3'
		AS	5' dUUUCAUACUUGCACCACUC	3'
	TLR2_16_S1026	SEN	5' <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>U</u>	3'
		AS	5' dBUUCAUACUUGCACCACUC	3'
10	TLR2_16_S1028	SEN	5' <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u>	3'
		AS	5' CUUCAUACUUGCACCACUC	3'
	TLR2_16_S1029	SEN	5' <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u>	3'
		AS	5' dUUUCAUACUUGCACCACUC	3'
15	TLR2_16_S1030	SEN	5' <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u>	3'
		AS	5' dBUUCAUACUUGCACCACUC	3'
	TLR2_16_S1032	SEN	5' <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u>	3'
		AS	5' CUUCAUACUUGCACCACUC	3'
20	TLR2_16_S1033	SEN	5' <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u>	3'
		AS	5' dUUUCAUACUUGCACCACUC	3'
	TLR2_16_S1034	SEN	5' <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u>	3'
		AS	5' dBUUCAUACUUGCACCACUC	3'
25	TLR2_16_S941	SEN	5' <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u>	3'
		AS	5' UUUCAUACtTUGCACCACUC	3'
30	TLR2_16_S938	SEN	5' <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u>	3'
		AS	5' UUUCAUACtTUGCACCACUC	3'
	CAPNS1_23_S938	SEN	5' <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u>	3'
		AS	5'UUGACCUCCAUGUCAUCUC	3'
35	CAPNS1_23_S898	SEN	5' <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u>	3'
		AS	5' <u>U</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>U</u> <u>C</u> -dTdT	3'
40	CAPNS 1_23_S939	SEN	5' <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u>	3'
		AS	5' CUGACCUCCAUGUCAUCUC	3'

Tabla A2: Compuestos que se sintetizaron para pruebas comparativas

45	Compuesto de ARNip	(N')y		
		(N)x		
50	TLR2_16_S1015	SEN	5' <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u>	3'
		AS	5' GUUCAUACUUGCACCACUC	3'
55	TLR2_16_S1017	SEN	5' <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u>	3'
		AS	5' AUUCAUACUUGCACCACUC	3'
60	TLR2_16_S1021	SEN	5' <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>U</u>	3'
		AS	5' GUUCAUACUUGCACCACUC	3'
	TLR2_16_S1023	SEN	5' <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>U</u>	3'
		AS	5' AUUCAUACUUGCACCACUC	3'
65	TLR2_16_S1027	SEN	5' <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>U</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u>	3'
		AS	5' AUUCAUACUUGCACCACUC	3'

5	TLR2_16_S1031	SEN	5' G <u>A</u> G <u>U</u> G <u>G</u> U <u>G</u> C <u>A</u> G <u>U</u> A <u>U</u> G <u>A</u> A <u>A</u>	3'
		AS	5' AUUCAUACUUGCACCACUC	3'
10	TLR2_16_S73	SEN	5' G <u>A</u> G <u>U</u> G <u>G</u> U <u>G</u> C <u>A</u> G <u>U</u> A <u>U</u> G <u>A</u> A <u>C</u>	3'
		AS	5' GUUCAUACUUGCACCACUC	3'
15	TLR2_16_S939	SEN	5' G <u>A</u> G <u>U</u> G <u>G</u> U <u>G</u> C <u>A</u> G <u>U</u> A <u>U</u> G <u>A</u> A <u>A</u>	3'
		AS	5' GUUCAUACUUGCACCACUC	3'
20	CAPNS1_23_S73	SEN	5' G <u>A</u> G <u>A</u> U <u>G</u> A <u>C</u> A <u>U</u> G <u>G</u> A <u>G</u> G <u>U</u> C <u>A</u> G	3'
		AS	5' CUGACCUCCAUGUCAUCUC	3'
25	CAPNS1_23_S867	SEN	5' G <u>A</u> G <u>A</u> U <u>G</u> A <u>C</u> A <u>U</u> G <u>G</u> A <u>G</u> G <u>U</u> C <u>A</u> G	3'
		AS	5' <u>C</u> U <u>G</u> A <u>C</u> C <u>U</u> C <u>C</u> A <u>U</u> G <u>U</u> C <u>A</u> U <u>C</u> U <u>C</u> - dTdT	3'

La Tabla A3 a continuación proporciona un código de los nucleótidos modificados/restos no convencionales usados en la preparación de los oligonucleótidos de ARNip de las Tablas A1 y A2.

Tabla A3: Código de los nucleótidos modificados/restos no convencionales como se usa en las Tablas en la presente descripción.

Código	Modificación
dT	timidina-3'-fosfato
A	2'-O-metiladenosina-3'-fosfato
C	2'-O-metilcitidina-3'-fosfato
G	2'-O-metilguanosina-3'-fosfato
U	2'-O-metiluridina-3'-fosfato
dB	Desoxirribosa-3'-fosfato abásica invertida
dU	desoxirribouridina-3'-fosfato
LdC	L-desoxirribocitidina-3'-fosfato (dC enantiomérico)
C3	C3-OH
C3C3	C3Pi-C3OH

Ejemplo 2: Pruebas in vitro de compuestos de ARNip modificados

Protocolo para probar la actividad de ARNip

Los compuestos de ARNip modificados de acuerdo con la presente invención se prueban para la actividad de la siguiente manera: Se sembraron aproximadamente 1×10^5 de células de REF52 de rata (para actividad de ARNip de TLR2) o 0.6×10^5 de PC3 humanas (para la actividad de ARNip CAPNS1) por pocillo en una placa de 6 pocillos (30-70% de confluente). Después de aproximadamente 24 h de incubación, las células se transfectaron con oligos de ARNbc (ver las Tablas A4 y A5 a continuación), mediante el uso de Lipofectamine™ 2000 (Invitrogene) a concentraciones finales de 1-40 nM para ARNbc de TLR2 y a concentraciones finales de 5-40 nM para ARNbc de CAPNS 1

Tabla A4: Compuestos de ARNip de TLR2_16 (Sec. con núm. de ident.: 6 y 11)

60	TLR2_16_S73	SEN	5'	GAGUGGUGCAAGUAUGAAC	3'	Par de bases G-C Coincidencia total de AS con la diana
	Compuesto de control	AS	5'	GUUCAUACUUGCACCACUC	3'	
65	TLR2_16_S941	SEN	5'	GAGUGGUGCAAGUAUGAAC	3'	U-C Desajuste de AS con la diana
		AS	5'	UUUCAUACUUGCACCACUC	3'	

TLR2_16_S939	SEN	5'	GAGUGGUGCAAGUAUGAA	3'	G-A
	AS	5'	GUUCAUACUUGCACCACUC	3'	Coincidencia de AS con la diana. Desajuste con el dúplex
TLR2_16_S938	SEN	5'	GAGUGGUGCAAGUAUGAAA	3'	Par de bases U-A
	AS	5'	GUUCAUACUUGCACCACUC	3'	Desajuste de AS con la diana

Tabla A5: Compuestos de ARNip de CAPNS1_23 (Sec. con núm. de ident.: 5 y 10)

CAPNS1_23_S73	SEN	5'	GAGAUGACAUGGAGGUCAG	3'	Par de bases C-G
Compuesto de control	AS	5'	CUGACCUCCAUGUCAUCUC	3'	Coincidencia total de AS con la diana
CAPNS1_23_S867	SEN	5'	GAGAUGACAUGGAGGUCAG	3'	Par de bases C-G
	AS	5'	CUGACCUCCAUGUCAUCUC-dTdT 3'	3'	Coincidencia total de AS con la diana
CAPNS1_23_S938	SEN	5'	GAGAUGACAUGGAGGUCA	3'	Par de bases U-A
	AS	5'	UGACCUCCAUGUCAUCUC	3'	Desajuste de AS con la diana
CAPNS1_23_S939	SEN	5'	GAGAUGACAUGGAGGUCA	3'	C-A
	AS	5'	CUGACCUCCAUGUCAUCUC	3'	Coincidencia total de AS con la diana

Como control positivo para la eficiencia de transfección de las células se usaron oligos ARNip etiquetados con REDD14-Cy3.5. Como control negativo para la actividad de ARNip se usaron oligos mezclados (CNL) (la misma concentración como se menciona en la sección 1.2). La eficacia de la transfección se probó por microscopía fluorescente, 24 horas después de la transfección de las células.

Preparación de muestras de ARNip: Para cada pocillo transfectado, se diluyeron 3 µl de reactivo Lipofectamine2000 en 250 µl de medio sin suero, y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Las moléculas de ARNip se prepararon como sigue:

Solución de trabajo de ARNip:

Solución madre de REDD14-Cy3.5 de 1.5×10^6 nM (diluida 1:150 para tener una concentración final de 10 µM con PBS)

Solución madre de CNL de 1.6×10^6 nM (diluida 1:160 para tener una concentración final de 10 µM con PBS)

Solución madre de genes diana 100 µM (diluida 1:10 para tener una concentración final de 10 µM con PBS)

Las muestras se diluyeron hasta la concentración final para los oligos ARNip de TLR2, CAPNS1 y CNL como se mencionó anteriormente (sección 1.2 y 1.4) y 20 nM de ARNip de REDD14-Cy3.5 en medio DMEM 250, calculado para un volumen final de 2 ml por pocillo. Lipofectamine™ 2000 se combinó con ARNip (volumen 1:1), la muestra se mezcló suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Transfección: El complejo Lipofectamine/ARNip se añadió a las células (500 µl por pocillo), la placa se balanceó hacia adelante y hacia atrás (2 ml de volumen final en cada pocillo). Las células se incubaron a 37 °C en una incubadora de CO₂.

Cuantificación de los niveles de ARNm mediante qPCR: 48 horas después de la transfección de las células, se recogieron las células y se aisló el ARN mediante el uso del kit EZ-RNA™ [Biological Industries (# 20-410-100). Se realizó la síntesis de ADNc y se midió el nivel de ARNm mediante qPCR. Las cantidades de ARNm medidas se normalizaron a la cantidad de ARNm del gen de referencia peptidilprolil isomerasa A (ciclofilina A; CycloA)

Resultados de la actividad de ARNip:

Actividad de ARNip de TLR2_16: análisis de qPCR de la expresión de TLR2 de rata en células REF52 que expresan el gen endógeno, después de la transfección de ARNip de TLR2_16 (los datos en la Tabla A6 demuestran la expresión residual de TLR2 de rata (% de células Ctrl no transfectadas) en células REF52.

5 Tabla A6

		Exp1	Exp2	Exp3	Exp4	Exp5	Promedio	Sd
	Control	100	100	100	100	100	100	0
10	CNL	40nM	131		131		131	0
		20nM	115	84	97	89	96	12
		5nM		101		102	102	0
15	TLR2_16_S73 Par de bases G-C. Coincidencia total de AS con la diana	40nM	22		26	13	20	6
		20nM	35	17	17		23	9
20	TLR2_16_S938 Par de bases U-A Desajuste de AS con la diana	40nM	17		16	3	12	6
		20nM	13	18	24		19	5
		5nM		24	52		38	14
		1nM		52	15		33	19
25	TLR2_16_S939 Par de bases G-A Coincidencia de AS con la diana. Desajuste con el dúplex	40nM	15		32	10	19	10
		20nM	26	39	57		41	13
		5nM		57	50		53	4
		1nM		50	7		29	21
30	TLR2_16_S941 U-C Desajuste de AS con la diana. Desajuste del dúplex	40nM	7		18		13	5
		20nM		18	26	132	59	52
		5nM		132	28		80	52

El compuesto más activo fue TLR2_16_S938 que tiene una falta de coincidencia de AS con el ARNm diana y un dúplex completamente complementario. En TLR2_16_S938 N¹ = U y N² = A y N¹ tiene falta de coincidencia con C en el ARNm diana.

35 Actividad de ARNip de CAPNS1_23

El análisis de qPCR de la expresión de CAPNS1 en células PC-3 humanas que expresan el gen endógeno, después de la transfección de ARNip de CAPNS1_23 (los datos en la Tabla A7 demuestran la expresión de CAPNS1 humana residual (% de células Ctrl no transfectadas) en células PC-3.

40 Tabla A7

Exp 1		
45	Control	100
	CNL	40nM 147
		20nM 132
		5nM 133
50	CAPNS1_23_S73 Par de bases C-G. Coincidencia total con AS	40nM 32
		20nM 29
	to target	5nM 43
55	CAPNS1_23_S867 Par de bases C-G. Coincidencia total de AS con la diana	40nM 43
		20nM 24
		5nM 38
60	CAPNS1_23_S938 Par de bases U-A. Desajuste de AS con la diana	40nM 27
		20nM 14
		5nM 22
65	CAPNS1_23_S939 C-A. Coincidencia total de AS con la diana Desajuste con el dúplex	40nM 28
		20nM 29
		5nM 13

El compuesto más activo fue CAPNS1_23_S938 que tiene una falta de coincidencia de AS con el ARNm diana y un dúplex completamente complementario. En CAPNS1_23_S938 $N^1 = U$ y $N^2 = A$ y N^1 tiene falta de coincidencia con C en el ARNm diana.

- 5 Los compuestos de prueba de acuerdo con las estructuras de la Estructura (A) son al menos 10% más activos que los compuestos de control, en donde la hebra no codificante es completamente complementaria al ARNm diana.

Pruebas dentro y fuera de la diana de moléculas de ARN bicatenario

- 10 El propósito de este estudio fue evaluar la actividad dentro de la diana y la actividad potencial fuera de la diana del control (sin modificar) y probar moléculas de ácido nucleico de doble cadena (químicamente modificadas).

- 15 Las dos hebras de una molécula de ARNip tienen secuencias con configuraciones que son codificante y no codificante con respecto al ARNm del gen diana. Dentro de una célula, la hebra no codificante de ARNip, conocida como la hebra guía (**GS**) se carga en el complejo silenciador inducido por ARN (RISC) y sirve para guiar la maquinaria de ARNi a secuencias complementarias en el ARNm diana. La hebra codificante, conocida como hebra acompañante (**PS**), se destruye. Cuando existe una complementariedad exacta entre la GS y el ARNm diana, este último se escinde por la actividad de corte de tipo RNaseH de RISC.

- 20 En algunos casos, una molécula de ARNip puede regular negativamente genes no deseados cuyos transcritos poseen complementariedad con la región de semillas GS (nucleótidos en las posiciones 2-8 [5'>3']) en el 3'-UTR. Sin desear limitarse a la teoría, este efecto fuera de la diana puede estar mediado por un mecanismo similar al silenciamiento de la diana por microARN (ARNmi). Otro tipo de actividad fuera de la diana de ARNip puede ocurrir debido a la carga de la hebra codificante (PS) en RISC. Los efectos no deseados fuera de la diana de los ARNip sintéticos pueden reducirse o anularse mediante la modificación química de la secuencia inicial de ARNip en el dúplex de ARNip. Las moléculas de prueba se diseñaron como corresponde.

- 30 Las moléculas de prueba se evaluaron tanto para la actividad en la diana (actividad para el ARNm diana) como para la actividad fuera de la diana (actividad para el ARNm distinto del ARNm diana) en el *"Ensayo de actividad basado en la secuencia semilla guía y la hebra acompañante"* mediante el uso de las construcciones de plásmidos psiCHECK™ (Promega). La actividad de las moléculas de prueba y de control se probó contra una secuencia diana completa (secuencia de nucleótidos completamente complementaria a la secuencia completa de 19 bases de GS o PS de la molécula de prueba) o la secuencia diana-semilla (secuencia complementaria a los nucleótidos 1-8 [5'>3'] de GS o PS de la molécula de prueba).

- 35 Las moléculas de prueba fueron al menos tan activas contra el sitio diana completo de GS que el ARNip de control no modificado. Las moléculas de prueba estaban inactivas hacia el sitio diana completo de PS, mientras que el ARNip de control no modificado demostró actividad hacia el mismo sitio. Ambos ARNips estuvieron inactivos contra la secuencia GS-semilla-diana y los sitios de la secuencia PS semilla-diana.

- 40 La hebra guía (GS) se refiere a la hebra no codificante de un ARN bicatenario que puede ingresar al complejo RISC y guiar el silenciamiento del ARN diana.

- 45 La hebra acompañante (PS) se refiere a la hebra codificante de un ARN bicatenario.

- La secuencia semilla se refiere a los nucleótidos 2-8 (5'>3') de la GS y pertinentes para el reconocimiento fuera de la diana.

- 50 CM (coincidencia completa) se refiere a un fragmento de ADN sintético con secuencia de nucleótidos completamente complementaria a la hebra guía de la molécula de ARN bicatenario. Este fragmento de ADN se clona en 3'UTR de un gen indicador y sirve como diana para el silenciamiento de ARN. (Castanotto y Rossi (2009). Nature, 22:426-33)

- 55 SM (coincidencia de semillas) se refiere a un fragmento de ADN sintético con secuencia de nucleótidos con completa complementariedad a los nucleótidos 1-8 (5'>3') de la cadena guía de la molécula de prueba ARNip (1er nucleótido + semilla). Este fragmento de ADN se clona en 3'UTR de un gen indicador y sirve como diana para el silenciamiento "fuera de la diana" basado en la semilla.

- 60 El sistema psiCHECK™ permite la evaluación de la GS (no codificante) y la PS (cadena codificante) para provocar efectos específicos y no específicos, al monitorear los cambios en los niveles de expresión de sus secuencias diana. Se prepararon cuatro construcciones basadas en psiCHECK™-2 (Promega) para la evaluación de la actividad diana y la actividad potencial fuera de la diana de cada molécula de prueba GS y hebras PS. En cada una de las construcciones, se clonó una copia o tres copias de la diana completa o de la secuencia diana-semilla, de la molécula de prueba PS o GS, en el sitio de clonación múltiple ubicado corriente abajo del codón de parada de la traducción de la luciferasa Renilla en la región 3'-UTR. Los vectores resultantes se denominaron:

- 1- GS-CM (hebra guía, coincidencia completa vector que contiene una copia o tres copias de la secuencia diana completa (secuencia de nucleótidos completamente complementaria a la secuencia completa de 19 bases de la GS de la molécula de prueba);
- 5 2- PS-CM (hebra acompañante Coincidencia-completa) vector que contiene una copia o tres copias de la secuencia diana completa (secuencia de nucleótidos completamente complementaria a la secuencia completa de 19 bases de la PS de la molécula de prueba);
- 3- GS-SM (guía hebra semilla-coincidencia) vector que contiene una copia o tres copias de la secuencia diana de la región semilla (secuencia complementaria a los nucleótidos 1-8 de la GS de la molécula de prueba);
- 10 4- PS-SM (hebra acompañante, coincidencia-semilla) vector que contiene una copia o tres copias de la secuencia diana de la región semilla (secuencia complementaria a los nucleótidos 1-8 del PS de la molécula de prueba).
- 15 Las secuencias diana, con o sin sustituciones de nucleótidos en la posición 19 (posición 1 de AS) se clonaron corriente abajo en la región de codificación del gen indicador de luciferasa de Renilla. El ARNi o la actividad mediada por semilla de una molécula de prueba hacia cualquiera de estas secuencias da como resultado la escisión y la posterior degradación del ARNm de fusión (GS) o la inhibición traduccional (PS). En ambos casos, la expresión de proteínas se atenúa.
- 20 Clonación de la semilla de la molécula de prueba GS y PS y sitios diana completos
- Una sola copia de la diana pertinente clonado en el 3'UTR del ARNm indicador, Luciferasa de Renilla en el vector psiCHECK™-2 (Promega). Existen múltiples sitios de clonación en el vector. Los sitios de clonación típicos que se usaron son XhoI y NotI. El vector se preparó para la clonación mediante el uso de técnicas estándar de biología molecular. Cada
- 25 cadena de CM y SM se sintetizó químicamente y se hibridó mediante calentamiento a 100 °C y se enfrió a temperatura ambiente. La ligación se realizó durante 3 horas mediante el uso de técnicas estándar de biología molecular. Los plásmidos ligados se transformaron en células E. coli DH5a
- Las colonias resultantes se seleccionaron para detectar la presencia de construcciones de plásmidos mediante PCR de colonias mediante el uso de cebadores pertinentes. Cada uno de los plásmidos (vectores) se purificó de una colonia positiva y se verificó su secuencia.
- 30 Transfección de vectores en células HeLa humanas.
- 35 Aproximadamente 1.3-2x10⁶ células HeLa humanas (ATCC, Cat # CCL-2) se inocularon por placa de 10 cm. Las células se incubaron a 37±1 °C, 5% de CO₂ durante 24 horas. El medio de crecimiento se reemplazó un día después de la inoculación por 8 ml de medio de crecimiento fresco preparado. Cada placa que contiene células se transfectó con uno de los vectores, mediante el uso del reactivo Lipofectamine™2000 (Invitrogen) de la siguiente manera:
- 40 En un tubo Eppendorf, se diluyeron 15 µl de reactivo Lipofectamine™ 2000 en 1000 µl de medio DMEM y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente (RT). En un segundo tubo Eppendorf, se diluyó un vector para alcanzar una concentración final de 15 µg en 1000 µl de medio DMEM. El reactivo diluido de Lipofectamine™ 2000 se mezcló suavemente con la muestra de vector de ADN diluido y se incubó durante 20-40 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se añadió ADN/Lipofectamine™ 2000 a las células (para alcanzar un volumen final de 2000 µL). Las
- 45 placas se mecieron suavemente. Las placas se incubaron durante 5 horas a 37±1 °C y 5% de CO₂. Después de una incubación de 5 horas, las células se volvieron a sembrar en una placa de 96 pocillos a una concentración final de 5x10³ células por pocillo en 80 µL de medio de crecimiento- 16 horas después, las células se transfectaron con moléculas de prueba o control mediante el uso de Lipofectamine™ 2000. Se realizaron transfecciones duplicadas de cada concentración de ARNip, como se describe a continuación: Lipofectamine™ 2000 se preparó en exceso para ser suficiente para 170 pocillos: Se mezclaron 85 µL de Lipofectamine™ 2000 con 3400 µL (3.4 ml) de medio DMEM y se incubaron durante 5
- 50 minutos a temperatura ambiente.
- Preparación de soluciones de trabajo de moléculas de prueba y de control: se prepararon soluciones de trabajo a diversas concentraciones mediante dilución de una solución madre de 10 µM. Esta serie de diluciones se preparó para la generación de concentraciones finales de transfección que varían entre 0.0095 nM y 100 nM en 100 µL de medio de
- 55 transfección DMEM (0.0095, 0.019, 0.039, 0.07, 0.15, 0.31, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 20.0, 100.0).
- Se mezclaron alícuotas de 100 µL de Lipofectamina 2000 diluida suavemente con 100 µL de cada una de las soluciones de trabajo diluidas de moléculas de prueba o de moléculas de control (arriba) y las mezclas se incubaron durante 20-40 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se añadieron 20 µL de la mezcla ARNip/Lipofectamine™ 2000 en la parte superior de las células (preincubadas con 80 µL del medio de cultivo celular anterior). Las placas se
- 60 mecieron suavemente. Las células se incubaron durante 48 horas a 37±1 °C y 5% de CO₂.
- Determinación de la actividad de luciferasa de renilla en células transfectadas
- El vector psiCHECK™-2 permite controlar los cambios en la expresión de una secuencia diana fusionada con el gen
- 65 indicador de luciferasa de Renilla. La secuencia diana de la molécula de prueba/control se clona en la región 3'-no traducida (3'-UTR) de la luciferasa de Renilla. La medición de la disminución de la actividad de la luciferasa de Renilla

proporciona una forma conveniente de monitorear la actividad. Además, el vector psiCHECK™-2 contiene un segundo gen indicador, luciferasa de luciérnaga, transcrito bajo un promotor diferente, que permite la normalización de la expresión de luciferasa de Renilla.

48 horas después la transfección de molécula de prueba o de control, se midieron las actividades de la Luciferasa de Renilla y luciérnaga en cada una de las muestras transfectadas con ARNip, mediante el uso del kit de ensayo Dual-Luciferase® (Promega) de acuerdo con el procedimiento del fabricante:

El medio se eliminó por completo de las células y luego se lisaron las células mediante la adición de 40 µL/ pocillo de solución de lisis de luciferasa IX. Las placas se congelaron (-80 °C) y descongelaron a temperatura ambiente. Los lisados celulares se suspendieron mediante extracción con pipeta varias veces y se transfirieron alícuotas de 12.5 µL de cada muestra a una placa separada de 96 pocillos. Se añadieron 50 µL de sustrato de luciferasa (LARII) a cada extracto y se midió la actividad de luciferasa de luciérnaga mediante un lector de absorbancia, fluorescencia y luminiscencia (Perkin Elmer, Victor™ 1240). Se añadieron 50 µL de reactivo Stop&Glo a cada una de las muestras y se midió inmediatamente la actividad de luciferasa de Renilla. El valor de la actividad de luciferasa de renilla se dividió por el valor de la actividad de luciferasa de luciérnaga para cada muestra (normalización). La actividad de luciferasa de renilla finalmente se expresa como el porcentaje del valor de actividad normalizada en la muestra analizada en relación con el valor normalizado obtenido en células transfectadas con el plásmido psiCHECK™-2 correspondiente en ausencia de moléculas de prueba o de control.

Cálculo de IC50

Los valores de IC50 de la actividad de la molécula de prueba y de control contra el sitio GS_CM se determinaron mediante construcción de una curva de dosis-respuesta mediante el uso de los resultados de la actividad obtenidos con las diversas concentraciones finales de ARNip. La curva de respuesta a la dosis se construyó mediante trazado de los valores normalizados relativos de la actividad de luciferasa de Renilla contra el logaritmo de la concentración de ARNip transfectado. La curva se calculó mediante ajuste de la mejor curva sigmoide con los datos medidos. Los métodos para el ajuste sigmoide se llaman ajuste de curva de 3 puntos.

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

Donde:

Y es la respuesta residual de ARNm de caspasa 2,

X es el logaritmo de la concentración de ARNip transfectado,

Bot es el valor Y en la meseta de la parte inferior,

LogIC50 es el valor X cuando Y está a medio camino entre las mesetas de la parte inferior y superiores y HillSlope es la pendiente de la curva.

Resultados

Para la evaluación de la actividad potencial fuera de la diana de cada hebra de una hebra de molécula de ARN bicatenario, el "ensayo de actividad basado en la secuencia de la guía-semilla y la hebra acompañante" se empleó mediante el uso de las construcciones de plásmidos psiCHECK (Promega). La medición de la actividad de Renilla proporciona una forma conveniente de controlar la actividad de ARN bicatenario.

Medición de la actividad de la proteína de luciferasa de Renilla diana

La actividad de las moléculas de prueba y control contra las cuatro secuencias diana (GS-CM, coincidencia completa de hebra guía; GS-SM, coincidencia de semilla de hebra guía; PS-CM, coincidencia completa de hebra acompañante; y PS-SM, coincidencia de semilla de hebra acompañante) se evaluó a nivel de proteína mediante medición de la actividad relativa de la proteína indicadora de luciferasa Renilla en células transfectadas con diversas concentraciones de molécula. Cada ensayo se repitió un mínimo de tres veces. El valor IC50 de la actividad de la molécula de prueba contra el sitio diana GS-CM se determinó mediante la construcción de gráficos de concentración-respuesta.

Tanto las moléculas de prueba como las de control fueron activas contra el sitio GS-CM diana en una respuesta a la dosis.

Ambos ARNips estaban inactivos contra los sitios GS-SM y PS-SM.

Las Figuras 2-10 y las Tablas 2-10 más abajo muestran la actividad medida por la diana residual para las moléculas de doble cadena dirigidas a la coincidencia completa de una secuencia diana que tiene una sustitución en la posición 19 (equivalente a la posición 1 de la no codificante) para incorporar uno de los ribonucleótidos, adenosina (A o rA), citidina (C o rC), guanosina (G o rG), ribotimidina (rT, también 5'metiluridina) y uridina (U o rU); o desoxiadenosina (dA), desoxicitidina (dC), desoxiguanosina (dG), timidina (dT) y desoxiuridina (dU); o 2'O adenosina metilada (mA), 2'O citidina metilada (mC), 2'O guanosina metilada (mG), 2'O uridina metilada (mU). "1era pos AS" se refiere a la posición 1 de la cadena no codificante (nucleótido 5' terminal).

Tabla 2: ARNip de TLR2_16 (extremo romo con 2'-OMe alternos en ambas hebras)

			1ra pos AS mC	1ra pos AS mG	1ra pos AS mA	1ra pos AS -dU
Concentración de ARNip	0.4 nM	G Diana	81	75	68	58
		U Diana	91	93	81	59
	4 nM	G Diana	85	61	50	38
		G Diana	84	78	56	40
	20 nM	G Diana	57	55	38	32
		U Diana	62	62	35	32

Los datos que se muestran en la Tabla 2 se presentan en la Figura 2. Los nucleótidos metilados en la posición 1 de la hebra no codificante muestran una reducción del silenciamiento de la diana, independientemente del apareamiento de bases.

Tabla 3: ARNip de TLR2_37 sin modificar con saliente C3-C3 o salientes dTdT

			Saliente dTdT	Saliente C3-C3				
		Pos19 de la Diana	1ra pos AS -U	1ra pos AS -U	1ra pos AS -dU	1ra pos AS -dT	1ra pos AS -mU	1ra pos AS -A
Concentración de ARNip	0.04 nM	A Diana	21	18	17	16	48	18
		C Diana	20	15	22	21	39	6
		G Diana	35	30	27	27	60	24
		U Diana	33	33	28	32	64	27
	0.4 nM	A Diana	13	8	8	9	23	11
		C Diana	12	9	9	11	18	10
		G Diana	17	13	12	13	34	16
		U Diana	19	17	12	16	43	14
	4 nM	A Diana	10	8	7	7	13	9
		C Diana	8	7	8	9	12	10
		G Diana	13	9	8	11	20	10
		U Diana	12	13	8	9	22	12

Los datos en la Tabla 3 se presentan en la Figura 3. La Tabla 3 y la Figura 3 muestran que un ribonucleótido 2'OMe en la 1ra posición de la AS reduce la actividad de ARNip independientemente del nucleótido en la posición correspondiente de la diana.

Tabla 4: ARNip de TLR2_37 sin modificar con saliente C3-C3 o salientes dTdT

			Saliente dTdT	Saliente C3-C3		
			1ra pos AS -U	1ra pos AS -U	1ra pos AS -dU	1ra pos AS -dT
Concentración de ARNip	0.04 nM	A Diana	21	18	17	16
		C Diana	20	15	22	21
		G Diana	35	30	27	27
		U Diana	33	33	28	32
	0.4 nM	A Diana	13	8	8	9
		C Diana	12	9	9	11
		G Diana	17	13	12	13
		U Diana	19	17	12	16

Los datos en la Tabla 4 se presentan en la Figura 4. La Tabla 4 y la Figura 4 muestran que

1. El ARNip con la mayor actividad se observa cuando U (dU o dT) en la 1ra posición de AS tiene falta de coincidencia con C en la diana o con A en la diana.

2. Si U en la 1ra posición de la AS de ARNip (o dU o dT) tiene falta de coincidencia con U en la diana, la actividad de ARNip se reduce

3. Si U en la 1ra posición de la AS se aparea por balanceo con G en la diana, la actividad de ARNip se reduce.

Tabla 5: ARNip de TLR2_37 (sin modificar con salientes dTdT) – 0.04 nM

			1ra pos AS -G	1ra pos AS -U
Concentración de ARNip	0.04 nM	A Diana	32	21
		C Diana	29	20
		G Diana	33	35
		U Diana	37	33
	0.4 nM	A Diana	14	13
		C Diana	13	12
		G Diana	17	17
		U Diana	21	19
	4 nM	A Diana	10	10
		C Diana	13	8
		G Diana	10	13
		U Diana	11	12
	20 nM	A Diana	9	11
		C Diana	8	8
		G Diana	8	11
		U Diana	10	11
	100 nM	A Diana	8	7
		C Diana	5	7
		G Diana	7	8
		U Diana	5	7

Los datos de la Tabla 5 se presentan en la Figura 5. La Tabla 5 y la Figura 5 muestran que

1. U en la 1ra posición de la AS produjo mejores resultados con su A coincidente o C no coincidente en la diana que con U no coincidente o G apareado por balanceo.

2. G en la 1ra posición de la AS mostró resultados similares con todos los nucleótidos posibles en la posición de destino correspondiente: la falta de coincidencia o el apareamiento por balanceo no mejoraron la actividad.

Tabla 6: ARNip de TLR2_46 (sin modificar con saliente C3-C3 o dTdT)

			Saliente dTdT	Saliente C3-C3				
			1ra pos AS -U	1ra pos AS -U	1ra pos AS -dU	1ra pos AS -dT	1ra pos AS -mU	1ra pos AS -A
Concentración de ARNip	0.04 nM	A Diana	70	83	61	69	79	52
		C Diana	56	78	49	66	85	58
		U Diana	68	85	57	69	95	67
	0.4 nM	A Diana	41	30	33	36	83	37
		C Diana	35	39	33	41	86	34
		U Diana	56	46	43	36	94	48
	4 nM	A Diana	13	16	17	20	39	14
		C Diana	15	17	11	24	48	13
		U Diana	19	21	17	14	59	19
	20 nM	A Diana	8	7	8	8	28	10
		C Diana	7	10	7	8	27	9
		U Diana	10	12	10	6	40	13

Los datos en la Tabla 6 se presentan en la Figura 6. La Tabla 6 y la Figura 6 muestran que la sustitución de U con mU reduce la actividad.

Tabla 7: ARNip de TLR2_46 (sin modificar con salientes dTdT)

			1ra pos AS -G	1ra pos AS -U
Concentración de ARNip	0.4 nM	A Diana	53	41
		C Diana	61	35
		U Diana	68	56
	4 nM	A Diana	28	13
		C Diana	28	15
		U Diana	32	19
	20 nM	A Diana	16	8
		C Diana	15	7
		U Diana	17	10
	100 nM	A Diana	16	8
		C Diana	15	7
		U Diana	17	10

Los datos en la Tabla 7 se presentan en la Figura 7. La Tabla 7 y la Figura 7 muestran que, independientemente del tipo de nucleótido de la posición diana coincidente, U en la 1ra posición de la AS produjo mejor KD (silenciamiento). Todos los casos significan, no importa la complementariedad entre el ARNip y la diana en la 1ra posición de la hebra guía, o falta de coincidencia o par por balanceo.

Tabla 8: ARNip de RHOA_61 (sin modificar/salientes C3-C3 o dTdT)

			Saliente dTdT	Saliente C3-C3				
			1ra pos AS -U	1ra pos AS -U	1ra pos AS -dU	1ra pos AS -dT	1ra pos AS -mU	1ra pos AS -A
Concentración de ARNip	0.04 nM	A Diana	35	50	34	33	76	33
		C Diana	32	38	33	32	86	34
		G Diana		41		51		49
		U Diana		53		34		36
	0.4 nM	A Diana	26	24	26	25	74	24
		C Diana	26	22		22	66	23
		G Diana		26	26	38		35
		U Diana		36		27		27
	4 nM	A Diana	22	22	24	17	37	20
		C Diana	18	19	21	17	34	18
		G Diana		21		31		25
		U Diana		30		22		22

Los datos en la Tabla 8 se presentan en la Figura 8.

Tabla 9: ARNip de RHOA_61 (sin modificar con salientes dTdT)

			Saliente dTdT	Saliente C3-C3				
			1ra pos AS -U	1ra pos AS -U	1ra pos AS -dU	1ra pos AS -dT	1ra pos AS -mU	1ra pos AS -A
Concentración de ARNip	0.04 nM	A Diana	35	50	34	33	76	33
		C Diana	32	38	33	32	86	34
		G Diana		41		51		49
		U Diana		53		34		36
	0.4 nM	A Diana	26	24	26	25	74	24
		C Diana	26	22		22	66	23
		C Diana		26	26	38		35
		U Diana		36		27		27
	4 nM	A Diana	22	22	24	17	37	20
		C Diana	18	19	21	17	34	18
		G Diana		21		31		25
		U Diana		30		22		22

Los datos en la Tabla 9 se presentan en la Figura 9. La Tabla 9 y la Figura 9 muestran que los ARNip con U en la 1ra posición de la AS son más activos que aquellos con G en la 1ra posición, independientemente del nucleótido en la posición de coincidencia de la diana (coincidencia, falta de coincidencia, balanceo). El apareamiento de bases por balanceo no puede explicar los resultados ya que tener G en ARNip y U en la diana no es equivalente a tener U en ARNip y G en la diana

Tabla 10: ARNip de Rhoa_61 (sin modificar con salientes dTdT)

			1ra pos AS -G	1ra pos AS -U
Concentración de ARNip	0.04 nM	A Diana	52	35
		G Diana	52	32
		G Diana	90	
		U Diana	66	
	0.4 nM	A Diana	49	26
		G Diana	51	26
		G Diana	84	
		U Diana	49	
	4 nM	A Diana	23	22
		G Diana	22	18
		G Diana	38	
		U Diana	28	
	20 nM	A Diana	21	20
		G Diana	18	17
		G Diana	29	
		U Diana	21	
	100 nM	A Diana	18	19
		C Diana	19	16
		G Diana	25	
		U Diana	20	

Los datos en la Tabla 10 se presentan en la Figura 10.

Ejemplo 3: Sistemas modelo de insuficiencia renal aguda (ARF)

ARF es un síndrome clínico caracterizado por el rápido deterioro de la función renal que se produce en días. Sin estar atado por la teoría la lesión renal aguda puede ser el resultado de la lesión renal por isquemia-reperfusión tales como la lesión renal por isquemia-reperfusión en pacientes sometidos a cirugía, tales como la cirugía cardíaca importante. La característica principal de la ARF es un descenso brusco de la tasa de filtrado glomerular (GFR), resultando en la retención de desechos nitrogenados (urea, creatinina). Estudios recientes, apoyan que la apoptosis en los tejidos renales es prominente en la mayoría de los casos humanos de ARF. El sitio principal de la muerte celular apoptótica es la nefrona distal. Durante la fase inicial de la lesión isquémica, la pérdida de la integridad del citoesqueleto de actina conduce al aplanamiento del epitelio, con pérdida de borde en cepillo, pérdida de los contactos celulares focales, y la subsiguiente liberación de la célula del sustrato subyacente.

La eficacia de los compuestos de la invención se prueba en el tratamiento de la lesión por isquemia-reperfusión en un modelo animal de ARF inducida por isquemia-reperfusión.

Ejemplo 4: Modelos de sistemas de llagas por presión o úlceras por presión.

Las llagas por presión o las úlceras por presión, que incluyen las úlceras diabéticas, son áreas de piel y tejido dañados que se desarrollan cuando la presión sostenida (generalmente de una cama o silla de ruedas) corta la circulación a las partes vulnerables del cuerpo, especialmente la piel de las nalgas, las caderas y los talones. La falta de flujo sanguíneo adecuado conduce a la necrosis isquémica y a la ulceración del tejido afectado. Las llagas por presión ocurren con mayor frecuencia en pacientes con sensación disminuida o ausente o que están debilitados, demacrados, paralizados o en cama. Los tejidos sobre el sacro, los isquiones, los trocánter mayores, el maléolo externo y los talones son especialmente susceptibles; otros sitios pueden estar involucrados dependiendo de la situación del paciente.

La eficacia de los compuestos de la invención se prueba en el tratamiento de llagas, úlceras y heridas por presión similares en, entre otros, el modelo de ratón como se describe en Reid y otros, J Surg. Res. 116: 172-180, 2004 o en el modelo de conejo como lo describe Mustoe y otros, JCI, 1991. 87(2):694-703; Ahn y Mustoe, Ann Pl Surg, 1991. 24(1):17-23.

Ejemplo 5: Sistemas modelo de Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD)

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

La eficacia de los compuestos de la invención se prueba en el tratamiento de la COPD/enfisema/bronquitis crónica en, entre otros, de modelos animales tales como los descritos a continuación:

Starcher y Williams, 1989. Lab. Animals, 23:234-240; Peng, y otros, 2004.; Am J Respir Crit Care Med, 169:1245-1251; Jeyaseelan y otros, 2004. Infect. Immunol, 72: 7247-56. Los modelos adicionales se describen en la publicación de patente PCT WO 2006/023544 presentada por el titular de la presente solicitud.

Ejemplo 6: Sistemas modelo de lesión medular

La lesión de la médula espinal o mielopatía, es una alteración de la médula espinal que resulta en pérdida de sensibilidad y/o movilidad. Los dos tipos más comunes de lesión de la médula espinal se deben al trauma y enfermedad. Las lesiones traumáticas pueden deberse a accidentes automovilísticos, caídas, disparos, accidentes de buceo *entre otros*, y las enfermedades que pueden afectar la médula espinal incluyen polio, espina bífida, tumores y ataxia de Friedreich.

Se inyecta ARNip en la médula espinal después de la contusión de la médula espinal y en ratas no lesionadas. Se producen criosecciones sagitales y se realiza inmunotinción mediante el uso de cuatro grupos diferentes de anticuerpos para determinar si se ha producido la captación en neuronas, astroglia, oligodendroglia y/o macrófagos/microglia. Los marcadores para las neuronas incluyen NeuN o GAP43; los marcadores para astroglia y posibles células madre neurales incluyen GFAP, nestina o vimentina; los marcadores para oligodendroglia incluyen NG2 o APC; los marcadores para macrófagos/microglia incluyen ED1 o Iba-1 (Hasegawa y otros, 2005. Exp Neurol 193: 394-410).

Las ratas se inyectan con dos dosis diferentes de ARNip (1 µg/µl, 10 µg/µl) y se dejan durante 1 y 3 días antes del sacrificio. Los resultados indican que el ARNip a los genes diana de la lesión de la médula espinal aumenta la recuperación de motoneuronas.

Ejemplo 7: Sistemas modelo de glaucoma

La eficacia de los compuestos de la invención se prueba en el tratamiento o prevención del glaucoma en el modelo animal, por ejemplo, de acuerdo con lo descrito por Pease y otros, J. Glaucoma, 2006, 15 (6): 512-9 (Calibración manométrica y comparación de tonómetros TonoLab y TonoPen en ratas con glaucoma experimental y en ratones normales).

Ejemplo 7A: Sistemas modelo de neuropatía óptica isquémica (ION)

Se estableció un modelo animal para neuropatía óptica isquémica en ratas Wistar adultas mediante el uso de un protocolo de lesión por aplastamiento del nervio óptico. Siete días antes del aplastamiento del nervio óptico, las células ganglionares de la retina (RGC) se marcan selectivamente mediante la aplicación del trazador retrógrado FluoroGold (2%, Fluorocromo, Englewood, CO) al colículo superior. El marcador se transporta mediante transporte retrógrado a lo largo de los axones de RGC, lo que da como resultado un etiquetado completo y específico de todos los RGC en 1 semana después de la inyección del marcador fluorescente. Los animales se someten a la lesión por aplastamiento del nervio óptico 7 días después del rastreo retrógrado. El nervio óptico orbital se expone a través de un abordaje supraorbital y todos los axones en el nervio óptico se cortaron por aplastamiento con fórceps durante 10 segundos, a 2 mm de la lámina cribosa. Se microinyecta una dosis única de 20 µg/5 µl de PBS del compuesto ARNip modificado de prueba en el cuerpo vítreo 2 mm por delante de la cabeza del nervio, mediante el uso de una micropipeta de vidrio en el momento del aplastamiento del nervio óptico.

La supervivencia de los RGC se determina 7 días después del aplastamiento del nervio óptico contando los RGC marcados con FluoroGold en las retinas de montaje plano. Los animales experimentales se perfunden transcárdialmente con paraformaldehído al 4% a 1 semana después del aplastamiento del nervio óptico. Ambas retinas se disecan, se fijan durante 30 minutos adicionales y se montan en un portaobjetos de vidrio para cuantificar la capa de células ganglionares. El número de RGC fluorescentes se cuenta en 16 áreas distintas en cada retina y el porcentaje de supervivencia de los RGC se determina en comparación con las muestras obtenidas de ratas que no sufrieron lesión por aplastamiento del nervio óptico o muestras obtenidas de ratas que fueron inyectadas con PBS, ARNip de control o GFP ARNip junto con la lesión por aplastamiento del nervio óptico. Las células de microglia que pueden haber incorporado FluoroGold después de la fagocitosis de los RGC moribundos se distinguieron por su morfología característica y se excluyeron de los análisis cuantitativos.

Se utiliza otro modelo de axotomía del nervio óptico en el que toda la población de RGC se axotomiza mediante la transección del nervio óptico cerca del ojo. (Cheng L y otros J. Neurosci. 2002; 22:3977-3986).

Ejemplo 8: Sistemas modelo de lesión por isquemia/reperfusión después de un trasplante de pulmón en ratas

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

Ejemplo 9: Sistemas modelo del síndrome de dificultad respiratoria aguda

La eficacia de los compuestos de la invención se prueba en el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria aguda, entre otros, en el modelo animal descrito por Chen y otros (J Biomed Sci. 2003;10(6 Pt 1):588-92. Los compuestos de ARNip modificados que se dirigen a genes que incluyen CYBA, HRK, BNIP3, MAPK8, MAPK14, RAC1, GSK3B, P2RX7, TRPM2, PARG, SPP1 y DUOX1 se prueban en este modelo animal.

Ejemplo 10: Sistemas modelo de condiciones de pérdida auditiva

(i) Modelo de Chinchilla de muerte celular de cóclea inducida por carboplatino o cisplatino

Las chinchillas se pretratan mediante la administración directa de ARNip específico en solución salina al oído izquierdo de cada animal. Se administra solución salina a la oreja derecha de cada animal como placebo. Dos días después de la administración de los compuestos de ARNip modificados específicos de la invención, los animales se tratan con carboplatino (75 mg/kg ip) o cisplatino (infusión intraperitoneal de 13 mg/kg durante 30 minutos). Después del sacrificio de las chinchillas (dos semanas después del tratamiento con carboplatino), el porcentaje de células muertas de las células ciliadas internas (IHC) y las células ciliadas externas (OHC) se calcula en el oído izquierdo (tratado con ARNip) y en el oído derecho (tratado con solución salina). Se calcula que el % de células muertas de las células ciliadas internas (IHC) y las células ciliadas externas (OHC) es menor en el oído izquierdo (tratado con ARNip) que en el oído derecho (tratado con solución salina).

(ii) Modelo de Chinchilla de muerte celular de cóclea inducida acústicamente

La actividad de ARNip específico en un modelo de trauma acústico se estudia en la chinchilla. Los animales están expuestos a una banda de ruido de octava centrada a 4 kHz durante 2.5 ha 105 dB. El oído izquierdo de las chinchillas expuestas al ruido se trata previamente (48 h antes del trauma acústico) con 30 µg de ARNip en ~10 µl de solución salina; el oído derecho se trata previamente con vehículo (solución salina). El potencial de acción compuesto (CAP) es un método electrofisiológico conveniente y confiable para medir la actividad neural transmitida desde la cóclea. El CAP se registra mediante colocación de un electrodo cerca de la base de la cóclea para detectar el potencial de campo local que se genera cuando se activa bruscamente un estímulo sonoro, como un clic o una explosión de tono. El estado funcional de cada oído se evalúa 2.5 semanas después del trauma acústico. Específicamente, el umbral medio del potencial de acción compuesto registrado desde la ventana redonda se determina 2.5 semanas después del trauma acústico para determinar si los umbrales en el oído tratado con ARNip son más bajos (mejores) que el oído no tratado (solución salina). Además, el nivel de pérdida de células ciliadas internas y externas se determina en el oído tratado con ARNip y en el oído de control.

Se usan modelos similares en ratones y ratas. Los compuestos ARNip modificados que se dirigen a genes que incluyen BNIP3, CAPNS, HES1, HES5, NOX3, ID1-3, HRK, ASPP2 (TP53BP), CASP2, RAC1, HTRA2, CDKN1B se prueban en estos y otros modelos animales de pérdida auditiva y regeneración auditiva.

Ejemplo 11. Modelos animales de osteoartritis (OA)

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

El efecto de diferentes inhibidores de ARNip, como ARNip a SSP1, sobre diferentes parámetros relacionados con OA, como la proliferación de condrocitos, la diferenciación terminal y el desarrollo de artritis, se evalúa mediante el uso de uno o más de los modelos anteriores, además de los modelos in vitro conocidos en la técnica. Los compuestos de ARNip modificados dirigidos a genes proapoptóticos, en particular a SSP1, se prueban en estos modelos animales que muestran que los compuestos de ARNip modificados tratan y/o previenen la OA y, por lo tanto, pueden usarse para tratar esta afección.

Ejemplo 12: Sistemas modelo de ratas para la lesión renal aguda asociada a trasplante

Isquemia cálida: en las ratas de prueba se realiza una nefrectomía izquierda, seguida de un autotrasplante que da como resultado un período de conservación del injerto de riñón tibio de 45 minutos. Después del autotrasplante, se realiza una nefrectomía derecha en el mismo animal. El ARNip modificado químicamente con una diana se administra por vía intravenosa a través de la vena femoral antes de la extracción del injerto de riñón (simulando el tratamiento del donante)

("pre"), o después del autotrasplante de riñón (imitando el tratamiento del receptor), o ambos antes de la recolección y después del trasplante (tratamiento combinado de donante y receptor) ("pre-post").

Isquemia fría: se realiza una nefrectomía izquierda en un animal donante, seguida de una conservación en frío (en hielo) del riñón recolectado durante un período de 5 horas. Al final de este período, la rata receptora se someterá a una nefrectomía bilateral, seguida de un trasplante del injerto de riñón conservado en frío. El tiempo total de isquemia cálida (incluido el procedimiento quirúrgico) es de aproximadamente 30 minutos. El ARNip modificado químicamente se administra por vía intravenosa a través de la vena femoral, ya sea al animal donante antes de la extracción del riñón ("pre") o al animal receptor 15 minutos ("después de 15 min") o 4 horas (después de 4 h) postrasplante.

Para evaluar la eficacia de los compuestos de ARNip modificado de la presente invención en la mejora de la función renal después del trasplante, los niveles de creatinina sérica se miden en los días 1, 2 y 7 después del trasplante en modelos de isquemia tanto cálida como fría.

Listado de secuencias

<110> Quark Pharmaceuticals, Inc.
AVKIN-NACHUM, Sharon

<120> COMPUESTOS DE ARNip QUE COMPRENDEN SUSTITUCIONES TERMINALES

<130> 213/PCT1

<150> 61/264,668

<151> 2009-11-26

<150> 61/295,721

<151> 2010-01-17

<150> 61/372,072

<151> 2010-08-09

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1492

<212> ARN

<213> HOMO_SAPIENS

<400> 1

ES 2 759 003 T3

	cgggcgacag	cagggccgcg	gugcaguguc	cgacccgaga	guugcggccu	gagucacgg	60
	ccccgccuc	cgagccgga	cgugcgga	ggccgggag	cgagugga	accgacucc	120
5	agaacuccg	acgugugcg	cgagugagu	cgagccaug	uuccugguua	acucguucuu	180
	gaagggcg	ggcgcgcg	gcgggggag	cgggggccu	ggugggggcc	ugggaaugu	240
	gcuuggagg	cugaucagc	ggccggggg	cgcgcgcg	ggcgcgcg	gcgcgcg	300
10	ugguggagg	ggcgugcg	guggaacgg	caugcgcau	cuaggcgag	ucaucagcg	360
	caucagcg	gcgugcg	aguacaacc	ggagcccc	ccccacgca	cacauuacuc	420
	caacauug	gccaacgag	gugaggaggu	ccggcaguuc	cgagacucu	uugcccagcu	480
15	ggcuggag	gacauagg	ucagcgcc	agaacucau	aacauucua	auaagguugu	540
	gacacgac	ccugaucu	agacugaug	uuuuggcau	gacacaug	gcagcauggu	600
20	ggccgugau	gauagcgac	ccacaggca	gcugggcuu	gaggaauca	aguacuugug	660
	gaacaacau	aaaaggug	aggccauua	caaacagu	gacacugac	gaucaggg	720
	cauuugcag	agugaacuc	caggugccu	ugaggcag	ggguuccac	ugaaugag	780
25	ucucuaua	augaucauc	gacgcuac	agaugaa	gggaacau	auuuugaca	840
	cuucaucag	ugcuuggu	ggcuggac	cauguucc	gccuucaaa	cucuugaca	900
	agauggcac	ggacaauc	aggugaacu	ccaggagug	cugcagcu	cuauguauc	960
30	cugaacug	gccccag	cgccccu	cugccuug	auaggagu	ccuggagcc	1020
	cgguucucc	cagggccg	ccugucug	gucacau	ugugggg	gcugacc	1080
35	aagcuuuu	ucucucag	cuuguuac	agcuucua	cauccagg	ccaauuug	1140
	cugccugg	uuccccug	cucuagg	cucuaaca	cucugucc	ggguuc	1200
	auuccacca	ggccugc	acaccac	cguaaccu	cccuguac	ugugcca	1260
40	cuagcacu	ugaugccu	augcccc	ggccucuc	caguucgg	aggauac	1320
	caguccug	acgccug	acaccu	cgguugcu	ccaggcg	aagcucc	1380
	ccgugcca	cccaggug	ccagugccu	ugucuau	cugcucc	ccugccag	1440
45	ccaggagg	auaaacau	cccaguug	gaucucua	aaaaaaaa	aa	1492

<210> 2
 <211> 1489
 50 <212> ARN
 <213> HOMO_SAPIENS

<400> 2

55

60

65

ES 2 759 003 T3

	cgggcgacag cagggccgcg gugcaguguc cgacccgaga guugcggccu gagucaccgg	60
	ccccgccuc cggagccgga cgcugcggga ggcccgggag cggcagugga accgacuccc	120
5	agaacuccgg acgugugcgg cgugagucgc agccauguuc cugguuaacu cguucuugaa	180
	ggcgcgccgc ggcggcggcg ggggagggcg ggccugggg gggggccugg gaaaugugcu	240
	uggagggcug aucagcgggg cggggggcg cggcggcggc ggcggcgcg gcggcgugg	300
10	uggagggcg cggggcgug gaacggccau gcgcuaucua ggcggaguca ucagcgccau	360
	cagcgaggcg gcugcgagu acaacccgga gccccgccc ccacgcacac auuacuccaa	420
15	cauugaggcc aacgagagug aggagguccg gcaguuccgg agacucuuug cccagcuggc	480
	uggagaugac auggagguca ggcgccaga acucaugaac auucucaua agguugugac	540
	acgacacccu gaucugaaga cugaugguuu uggcuaugac acaugucgca gcaugggggc	600
20	cgugauggau agcgacacca caggcaagcu ggccuuugag gaauucaagu acuuguggaa	660
	caacaucaaa agggggcagg ccacauaaca acaguucgac acugaccgau cagggaccu	720
	uugcaguagu gaacucccag gugccuuuga ggcagcaggg uuccaccuga augagcaucu	780
25	cuauaacaug aucauccgac gcuacucaga ugaaaguggg aacauggauu uugacaacuu	840
	caucagcugc uuggucaggc uggacgccau guuccgugcc uucaaaucuc uugacaaaga	900
	uggcacugga caaauccagg ugaacaucca ggaguggcug cagcugacua uguauuccug	960
30	aacuggagcc ccagaccgc cccucacug ccuugcuaua ggagucaccu ggagccucgg	1020
	ucucucccag ggccgauccu gucugcaguc acaucuuugu ggggcccugcu gaccacaag	1080
35	cuuuuguucu cucaguacuu guuacccagc uucucaacau ccagggccca auuugcccug	1140
	ccuggaguuc cccuggcuc uaggacacuc uaacaagcuc uguccacggg ucucccauu	1200
	cccaccaggc ccugcacaca cccacuccgu aaccucuccc cuguaccugu gccaaagccua	1260
40	gcacuuguga ugccuccaug ccccaggggc ccucucucag uucugggagg augacuccag	1320
	ucccugcacg ccuggcaca cccuucacgg uugcuacca ggcggccaag cuccagaccg	1380
	ugccagaccc aggugcccca gugccuuugu cuauauucug cuccagccu gccaggccca	1440
45	ggaggaaaua aacaugcccc aguugcugau cucuaaaaaa aaaaaaaaaa	1489

<210> 3

<211> 1926

50 <212> ARN

<213> HOMO_SAPIENS

<400> 3

55

60

65

ES 2 759 003 T3

	guggaugagc ugugagugcg cgcgcgugcg cggggccgcg accugugccg gcucgagccc	60
	gcugggcacu cggagggcgcg cacgucguuc cccgccucc cgcgcgcgcg cgcuccugcu	120
5	cucucgcgcg accuccccgc cgcgcgcggu ccuccgucgg uucucucguu aguccacggu	180
	cuggucuuca gcuaaccgcc uucgucuccg aguuugcgac ucgcggaccg gcgucgccgg	240
	cgcgaagagg cuggacucgg auucguugcc ugagcaaugg cugccauccg gaagaaacug	300
10	gugauuguug gugauggagc cuguggaaag acaugcuugc ucauagucuu cagcaaggac	360
	caguucccag agguguaugu gccacagug uuugagaacu auguggcaga uaucgaggug	420
15	gauggaaagc agguagaguu ggcuuugugg gacacagcug ggcaggaga uuaugaucgc	480
	cugaggcccc ucuccuaccc agauaccgau guuauacuga uguguuuuuc caucgacagc	540
	ccugauagu uagaaaacau cccagaaaag uggaccccag aagucaagca uuucuguccc	600
20	aacgugccca ucauccuggu uggaauaag aaggaucuc ggaaugauga gcacacaagg	660
	cgggagcuag ccaagaugaa gcaggagccg gugaaaccug aagaaggcag agauauggca	720
	aacaggauug gcgcuuuug guacauggag uguucagcaa agaccaaaga uggagugaga	780
25	gagguuuuug aaauggcuac gagagcugcu cugcaagcua gacgugggaa gaaaaaauu	840
	gggugccuug ucuugugaaa ccuugcugca agcacagccc uuaugcgguu aaauuugaag	900
	ugcuguuuau uaaucuuagu guauguuac uggccuuuuu cauuuauua uauuuaccu	960
30	aagauuacaa aucagaaguc aucuugcuac caguauuuag aagccaacua ugauuuuaa	1020
	cgauguccaa cccgucuggc ccaccagggu ccuuuugaca cugcucuaac agcccuccuc	1080
35	ugcacuccca ccugacacac caggcgcuua uucaaggaa uucuaacuu cuugcuucuu	1140
	ucuagaaaga gaaacaguug guaacuuiuug ugaauuaggc uguaacuacu uuauaacuaa	1200
	cauguccugc cuauuauucug ucagcugcaa gguacucugg ugagucacca cuucagggcu	1260
40	uuacuccgua acagauuuug uuggcauagc ucuggggugg gcaguuuuu gaaaauaggc	1320
	ucaaccagaa aagcccagu ucaugcagcu gggcagagu uacaguucug ugguuucaug	1380
	uuaguuaaccu uauaguua cuuuaauuag ugccacuua ugauguuac caaaaaaaa	1440
45	uauaucuacc ccagacuaga uguaguauuu uuuguauau uggauuuccu aaucuguca	1500
	uccucaaga aaguguauug guuuuuuaa aaagaaagug uauuuggaa uaaagucaga	1560
50	uggaaaauuc auuuuuuaa uucccguuu gucacuuuu cugauaaaag auggccauu	1620
55		
60		
65		

ES 2 759 003 T3

	uaccccuuuu cggccccaug uaucucagua cccauggag cugggcuaag uaaauaggaa	1680
	uugguuucac gccugaggca auuagacacu uuggaagaug gcuaaaccug ucucaccugg	1740
5	acuuaaagcau cuggcucuaa uucacagugc ucuuuucucc ucacuguauc cagguucccu	1800
	cccagaggag ccaccaguuc ucaugggugg cacucagucu cucuucucuc cagcugacua	1860
	aacuuuuuuu cuguaccagu uauuuuuucc aacuacuaau agaauaaag caguuuucua	1920
10	aaaaaa	1926

	<210> 4
	<211> 3417
15	<212> ARN
	<213> HOMO_SAPIENS

	<400> 4
--	---------

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 759 003 T3

	cggaggcagc	gagaaagcgc	agccaggcgg	cugcucggcg	uucucucagg	ugacugcucg	60
	gaguucuccc	aguguuuggu	guugcaagca	ggauccaaag	gagaccuaua	gugacuccca	120
5	ggagcucuua	gugaccaagu	gaagguaccu	guggggcuca	uugugcccau	ugcucuua	180
	cugcuuuaa	cugguaguug	uggguuugaag	cacuggacaa	ugccacauac	uuuguggaug	240
	gugugggucu	ugggggucuu	caucagccuc	uccaaggaag	aauccuccaa	ucaggcuucu	300
10	cugucuugug	accgcaaugg	uauugcaag	ggcagcucag	gaucuuuaa	cuccauuccc	360
	ucagggcuca	cagaagcugu	aaaaagccuu	gaccugucca	acaacaggau	caccuacauu	420
	agcaacagug	accuacagag	gugugugaac	cuccaggcuc	uggugcugac	auccaaugga	480
15	auuaacacaa	uagaggaaga	uucuuuuucu	ucccugggca	gucuugaaca	uuuagacuua	540
	uccuauaa	acuuaucaaa	uuuauugucu	uccugguuca	agcccccuuu	uucuuuaaca	600
20	uucuuuaacu	uacugggaaa	uccuuacaaa	acccuagggg	aaacaucucu	uuuuucucuu	660
	cucacaaaa	ugcaaaucuu	gagaguggga	aaauaggaca	ccuucacuaa	gauucaaaga	720
	aaagauuuug	cuggacuua	cuuccuugag	gaacuugaga	uugaugcuuc	agaucucag	780
25	agcuauagag	caaaaaguuu	gaagucauuu	cagaauugaa	gucaucugau	ccuucuuuag	840
	aagcagcaua	uuuuacugcu	ggagauuuuu	guagauguua	caaguuccgu	ggaauuguug	900
	gaacugcgag	auacugauuu	ggacacuuuc	cauuuuucag	aacuauccac	uggugaaaca	960
30	aaucuuuuga	uuuuuaguu	uacuuuuaga	aaugugaaaa	ucaccgauga	aaguuuuuuu	1020
	cagguuauga	aacuuuugaa	ucagauuuu	ggauuguuag	aaauagaguu	ugaugacugu	1080
	acccuuuau	gaguugguaa	uuuuagagca	ucugauaaug	acagaguuau	agauccaggu	1140
35	aaaguggaaa	cguuaacaau	ccggaggcug	cauuuuccaa	gguuuuacuu	auuuuauugau	1200
	cugagcacuu	uauuuuacuu	uacagaaaga	guuuuuuaga	ucacaguaga	aaacaguuaa	1260
40	guuuuuucug	uuccuuguuu	acuuucacaa	cauuuuuuuu	cauuuagaau	cuuggaucuc	1320
	agugaaaauu	ugaugguuga	agaauacuug	aaaaauucag	ccugugagga	ugccuggccc	1380
45							
50							
55							
60							
65							

ES 2 759 003 T3

	ucucuacaaa	cuuuauuuu	aaggcaaaa	cauuuggcau	cauuggaaaa	aaccggagag	1440
	acuuugcuca	cucugaaaaa	cuugacuaac	auugauauca	guaagaauag	uuuucuuuc	1500
5	augccugaaa	cuugucagug	gccagaaaag	augaaaauu	ugaacuuuc	cagcacacga	1560
	auacacagug	uaacaggcug	cauucccaag	acacuggaaa	uuuuagauu	uagcaacaac	1620
	aaucucaauu	uuuuuucuu	gaauuugccg	caacucaaa	aacuuuauu	uuccagaaa	1680
10	aaguugauga	cucuaccaga	ugccucccuc	uuacccaugu	uacuaguuu	gaaaaucagu	1740
	aggaauagca	uaacuacguu	uucuaaggag	caacuugacu	cauuucacac	acugaagacu	1800
	uuggaagcug	guggcaauaa	cuucauuugc	uccugugaa	uccucuccuu	cacucaggag	1860
15	cagcaagcac	uggccaaa	cuugauugau	uggccagcaa	auuaccugug	ugacucucca	1920
	ucccaugugc	guggccagca	gguucaggau	guccgccucu	cggugucgga	augucacagg	1980
	acagcacugg	ugucuggcau	gugcugugcu	cuguuccugc	ugauccugcu	cacggggguc	2040
20	cugugccacc	guuuuccaug	ccugugguau	augaaaauga	ugugggccc	gcuccaggcc	2100
	aaaaggaagc	ccaggaaa	ucccagcagg	aacaucugcu	augaugcau	uguuucuuac	2160
	agugagcggg	augccuacug	gguggagaac	cuuauugguc	aggagcugga	gaacuucuu	2220
25	ccccccuuc	aguugugucu	ucauaagcgg	gacuucuuu	cuggcaagug	gaucuuugac	2280
	auaucauug	acuccauuga	aaagagccac	aaaacugucu	uugugcuuuc	ugaaaacuuu	2340
	gugaagagug	aguggugcaa	guaugaacug	gacuucuccc	auuuccgucu	uuuugaugag	2400
30	aacaauaug	cugccauucu	cauucuuucg	gagcccauug	agaaaaaagc	cauuccccag	2460
	cgcuuucgca	agcugcggaa	gauaaugaac	accaagaccu	accuggagug	gcccauggac	2520
35	gaggcucagc	gggaaggauu	uuggguaaa	cugagagcug	cgaauaaguc	cuagguuccc	2580
	auauuuuaga	ccagucuuug	ucuaguuggg	aucuuuauu	cacuaguuu	aguuaaguuc	2640
	auucagacau	auuuauauaa	aaacuacgug	gauguaccgu	cauuugagga	cuugcuuacu	2700
40	aaaacuacaa	aacuucaaa	uuugucuggg	gugcuguuuu	auaaacauu	gccagauuu	2760
	aaaauugguu	uuugguuuuu	cuuuuuucua	ugagauaacc	augaucaua	gucuauuacu	2820
	gauaucugaa	uauagucccu	ugguauccaa	gggaauuggu	ugcaggaucc	ucguggauu	2880
45	caaaaaucau	agaugaucaa	guccuuuaua	agaguggcau	aguauuugca	uauaaccugu	2940
	guacauucuc	cuguauacuu	uaaaucacuc	cuagauuacu	uauagauacc	aaucacaugu	3000
	aaauacuau	uaaaugaug	uacugucuuu	uuuuuuauu	uuuuuuuuu	uuuuuuuuu	3060
50	uucaaaauuu	uuaaaacaua	cuuuugaucc	acaguugguu	gacuucagg	augcagaacc	3120
	cauggauua	gagggccaac	uguaaucugu	agcaacuggc	uuaguucuu	aggaaacagc	3180
	acaaaugaac	uuuagauucu	caaugacugu	gucauucuuu	cuuccugcua	agagacuccu	3240
55	cuguggccac	aaaaggcauu	cucuguccua	ccuagcuguc	acuucucugu	gcagcugauc	3300
60							
65							

ES 2 759 003 T3

	ucaagagcaa caaggcaaag uauuuggggc acuccccaaa acuuguugcu auuccuagaa	3360
	aaaagugcug uguauuuuccu auuaaacuuu acaggaugag aaaaaaaaaa aaaaaaa	3417
5	<210> 5 <211> 19 <212> ARN <213> artificial	
10	<220> <223> Sintetizado químicamente	
15	<400> 5 gagaugacau ggaggucag	19
20	<210> 6 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> Sintetizado químicamente	
30	<400> 6 cugaccucca ugucaucuc	19
35	<210> 7 <211> 19 <212> ARN <213> artificial	
40	<220> <223> Sintetizado químicamente	
45	<400> 7 gaguggugca aguaugaac	19
50	<210> 8 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> Sintetizado químicamente	
60	<400> 8 guucauacuu gcaccacuc	19
65	<210> 9 <211> 19 <212> ARN <213> artificial	
	<220> <223> Sintetizado químicamente	
	<400> 9	

gguggagaac cuuaugguc 19

5 <210> 10
<211> 19
<212> RNA
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Sintetizado químicamente

<400> 10
gaccuaaagg uuccacc 19

15 <210> 11
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

20 <220>
<223> Sintetizado químicamente

<400> 11
agauaaugaa caccaagac 19

25 <210> 12
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Sintetizado químicamente

<400> 12
gucuuggugu ucauauacu 19

35 <210> 13
<211> 19
<212> ARN
<213> artificial

40 <220>
<223> Sintetizado químicamente

<400> 13
gaucuucgga augaugaga 19

45 <210> 14
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Sintetizado químicamente

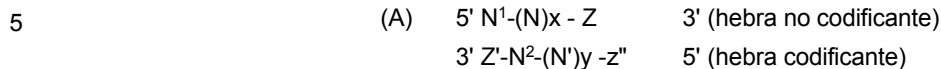
55 <400> 14
ucucaucauu ccgaagauc 19

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico bicatenario que tienen la estructura (A) que se expone más abajo:



10 en donde cada uno de N², N y N' es un ribonucleótido no modificado o modificado, o un resto no convencional;
en donde cada uno de (N)x y (N')y es un oligonucleótido en el cual cada N o N' consecutivo se une al N o N' adyacente por un enlace covalente;

en donde cada uno de x=y=18;

15 en donde la secuencia de (N)x tiene complementariedad con una secuencia consecutiva en un ARN diana; y la secuencia de N²-(N')y es completamente complementaria a la secuencia de N¹-(N)x;

en donde N¹ está enlazado covalentemente a (N)x y no es coincidente con el ARN diana;

en donde:

cuando el nucleótido de apareamiento en el ARN diana es adenosina, la uridina en la posición 1 de la hebra no codificante se sustituye con un N¹ seleccionado de adenosina o desoxiadenosina; o

20 cuando el nucleótido de apareamiento en el ARN diana es citidina, la guanosina en la posición 1 de la hebra no codificante se sustituye con un N¹ seleccionado de adenosina, desoxiadenosina, o desoxiuridina; o

cuando el nucleótido de apareamiento en el ARN diana es guanosina, la citidina en la posición 1 de la hebra no codificante se sustituye con un N¹ seleccionado de adenosina, o desoxiadenosina; o

25 cuando el nucleótido de apareamiento en el ARN diana es uridina, la adenosina en la posición 1 de la hebra no codificante se sustituye con un N¹ que es desoxiuridina;

en donde z'' puede estar presente o ausente, pero si está presente es un resto de caperuza unido covalentemente en el terminal 5' de N²-(N')y; y

30 en donde cada uno de Z y Z' independientemente está presente o ausente, pero si está presente es independientemente de 1-5 nucleótidos consecutivos, restos no nucleotídicos consecutivos o una combinación de los mismos unidos covalentemente en el terminal 3' de la hebra en la que está presente.

2. La molécula de ácido nucleico bicatenario de acuerdo con la reivindicación 1, en donde N¹ se selecciona de adenosina o desoxiadenosina, y en donde el nucleótido de apareamiento en el ARN diana es adenosina.

- 35 3. La molécula de ácido nucleico bicatenario de acuerdo con la reivindicación 1, en donde N¹ se selecciona de adenosina, desoxiadenosina, o desoxiuridina y en donde el nucleótido de apareamiento en el ARN diana es citidina.

4. La molécula de ácido nucleico bicatenario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde N¹ y N² forman un par de bases entre adenosina y uridina o entre desoxiuridina y adenosina.

- 40 5. La molécula de ácido nucleico bicatenario de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde z'' está presente.

6. La molécula de ácido nucleico bicatenario de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde Z y Z' están ausentes.

- 45 7. La molécula de ácido nucleico bicatenario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde uno de Z o Z' está presente.

8. La molécula de ácido nucleico bicatenario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde Z o Z' comprende un resto no nucleotídico.

- 50 9. La molécula de ácido nucleico bicatenario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde al menos uno de N o N' comprende un ribonucleótido modificado con 2'O-metil azúcar.

- 55 10. La molécula de ácido nucleico bicatenario de acuerdo con la reivindicación 1, en donde x=y=18, Z' está ausente, en donde Z está presente y comprende dos restos de alquilo enlazados covalentemente entre sí a través de un enlace fosfodiéster; en donde N² comprende adenosina; y en donde N¹ comprende uridina.

- 60 11. La molécula de ácido nucleico bicatenario de acuerdo con la reivindicación 1, en donde Z' está presente y comprende dos restos de alquilo enlazados covalentemente entre sí a través de un enlace fosfodiéster.

12. La molécula de ácido nucleico bicatenario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para su uso en terapia.

- 65 13. Una composición farmacéutica que comprende al menos una molécula de ácido nucleico bicatenario de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11; y un portador farmacéuticamente aceptable.

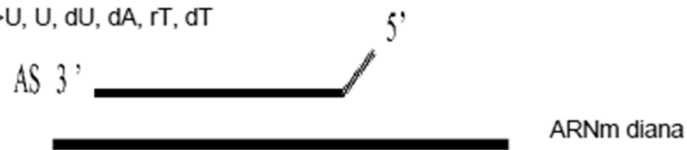
14. Un método para generar una molécula de ARN bicatenario que consiste en una hebra codificante y una hebra no codificante que comprende las etapas de
- 5 a) seleccionar una secuencia consecutiva de 17 a 25 nucleótidos en un ARN diana y sintetizar una hebra no codificante que comprenda la complementariedad con la secuencia consecutiva de 17 a 25 nucleótidos del ARNm diana, en donde el nucleótido 5' terminal de la hebra no codificante,
- si es uridina, se sustituye con adenosina o desoxiadenosina; o
- si es guanosina, se sustituye con adenosina, desoxiadenosina, o desoxiuridina; o
- 10 si es citidina, se sustituye con adenosina o desoxiadenosina; o
- si es adenosina, se sustituye con una desoxiuridina;
- b) sintetizar una hebra codificante de 17 a 25 nucleótidos que tiene complementariedad completa con la hebra no codificante, en donde el nucleótido 3' terminal de la hebra codificante forma un par de bases de Watson Crick con el nucleótido 5' terminal de la cadena no codificante; e
- 15 c) hibridar las cadenas codificante y no codificante; lo que genera de esta manera una molécula de ARN bicatenario.

1. Hebra guía (AS): Desajuste de nucleótido 5' terminal con ARN diana

C Diana. AS G>U, dU, rA, dA, rT, dT

G Diana. AS C>U, dU, rA, dA, rT, dT

U Diana. AS A>U, U, dU, dA, rT, dT



Hebra acompañante (SEN): Coincidencia total con AS

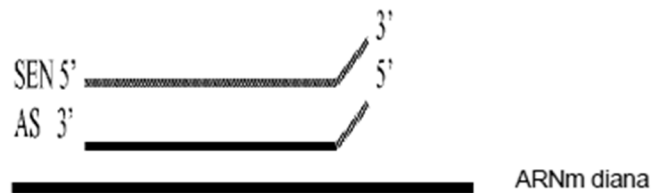
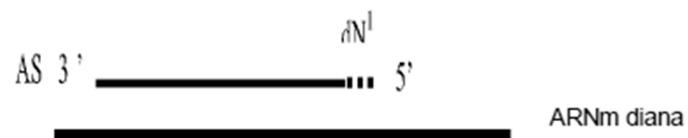


FIGURA 1

2. Hebra guía (AS): Dexosirribonucleótido 5' terminal (dN¹) complementario con

ARN diana



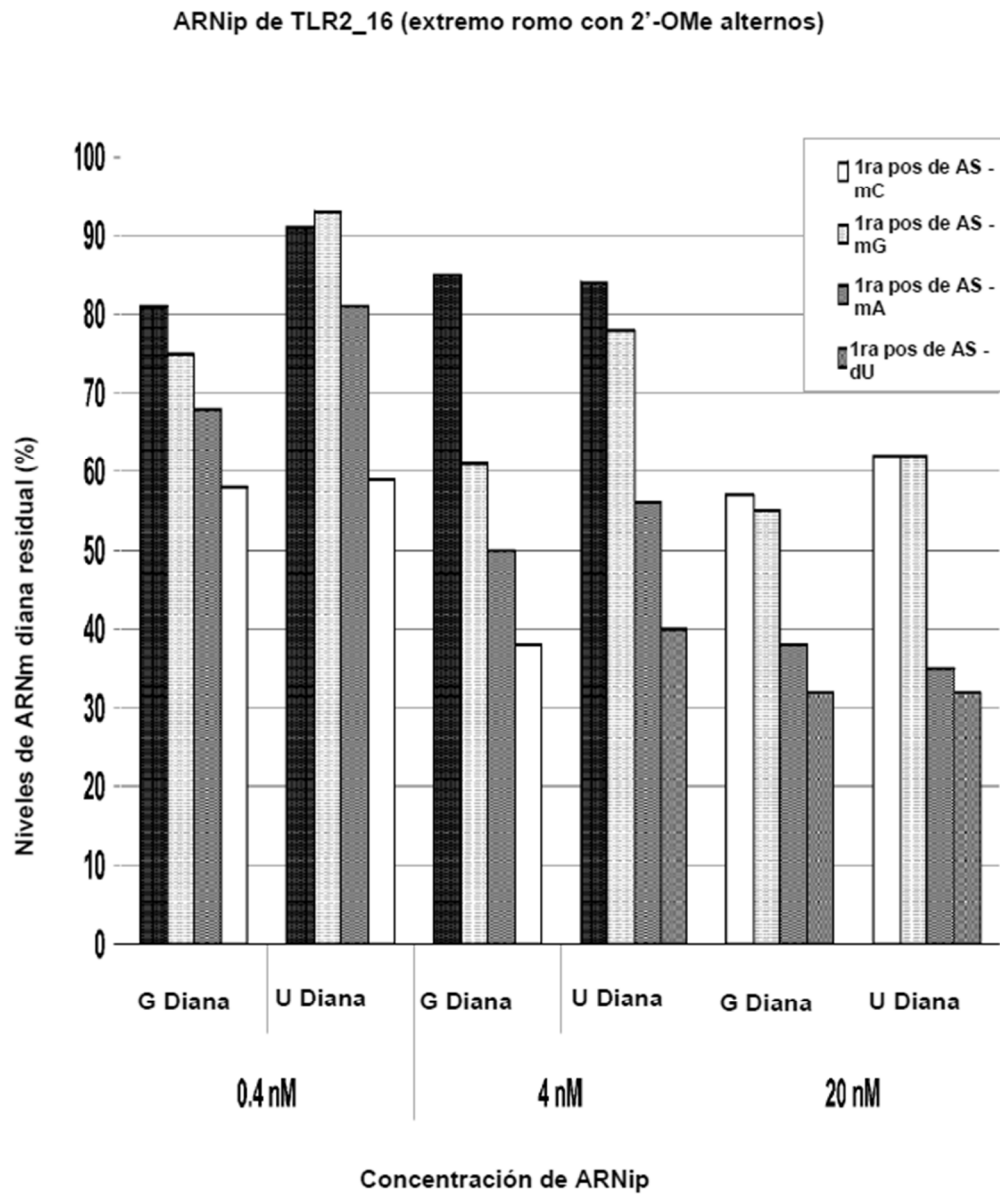
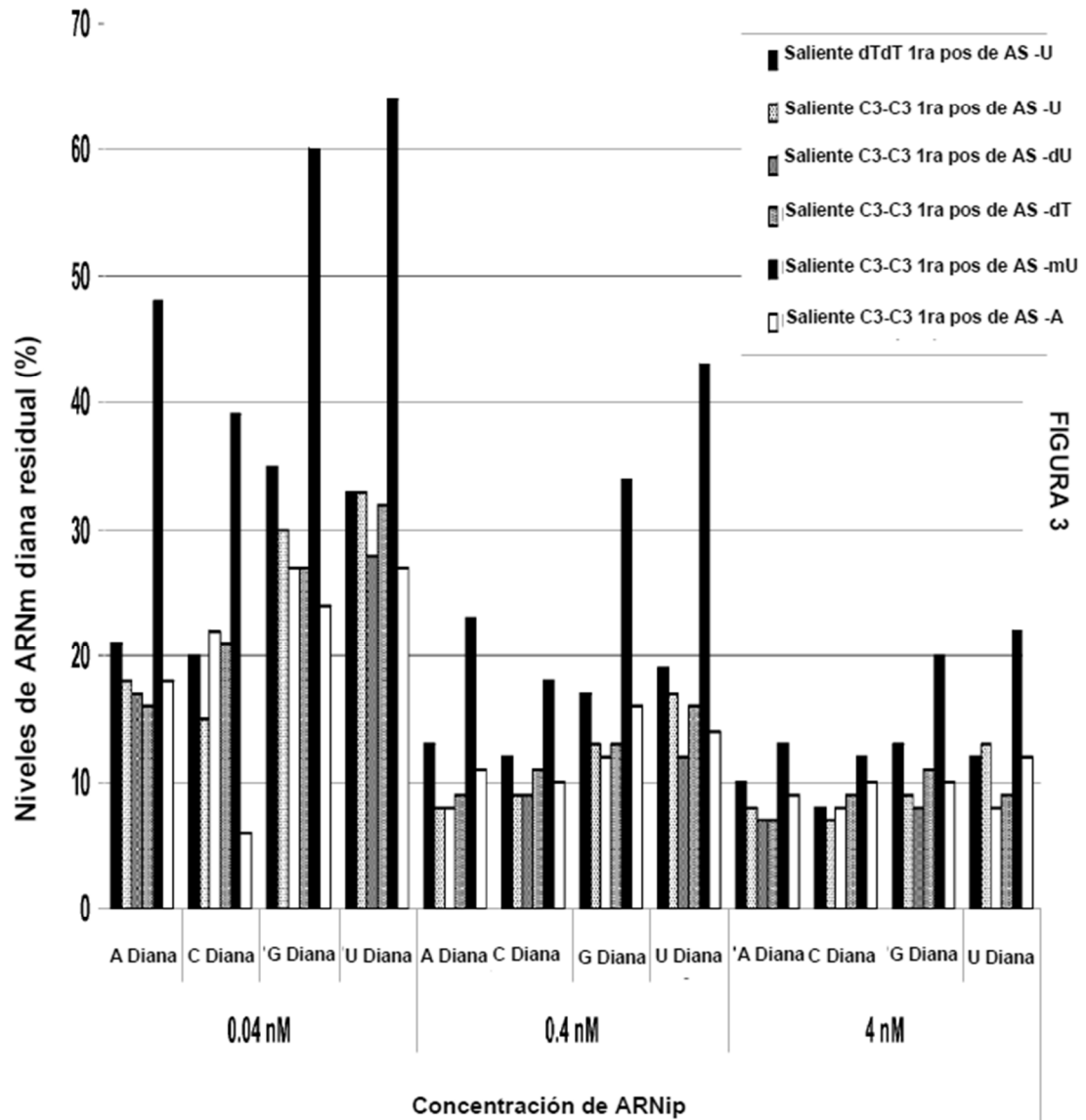


FIGURA 2

ARNip de TLR2_37 (sin modificar/salientes C3-C3 o dTdT)



ARNip de TLR2_37 (sin modificar con salientes C3-C3 o salientes dTdT)

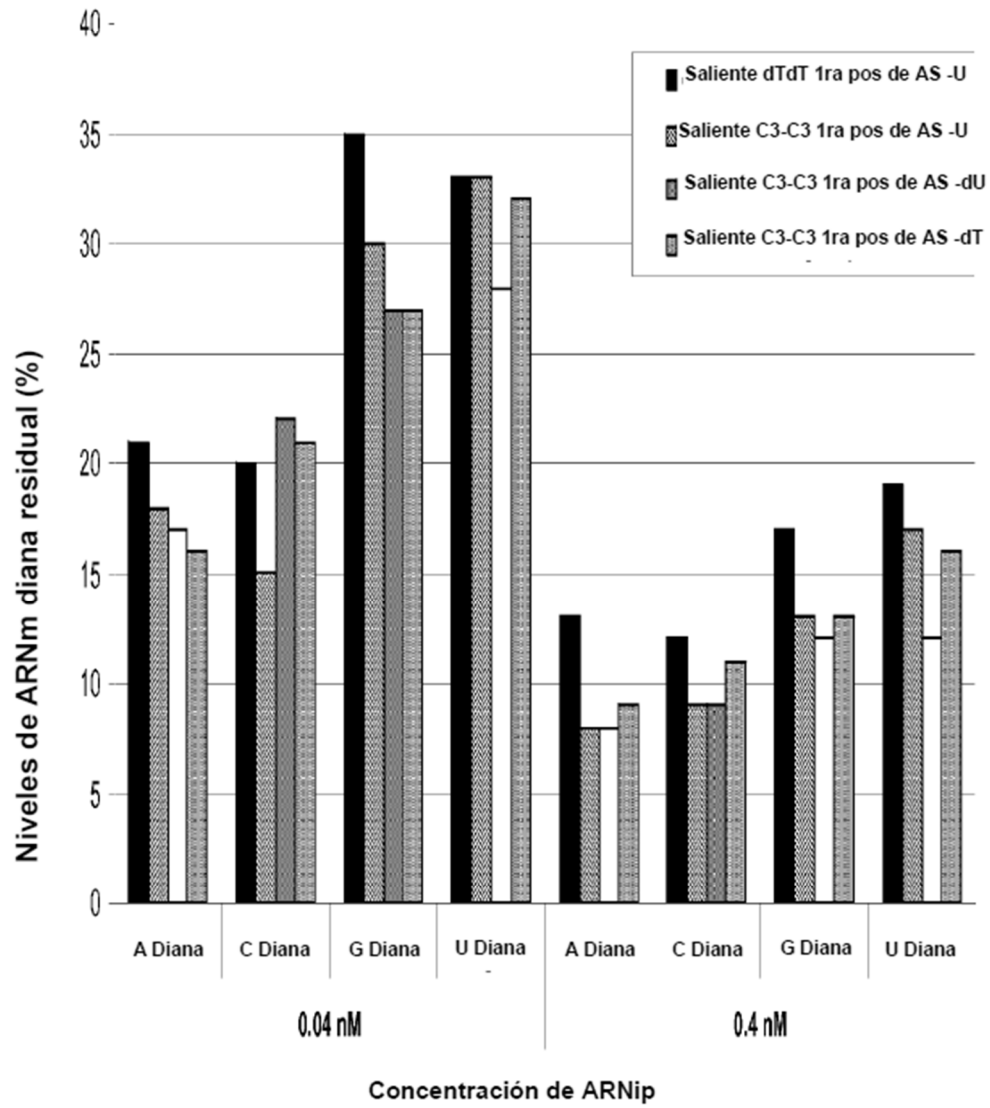


FIGURA 4

ARNip de TLR2_37 (sin modificar con salientes dTdT) – 0.04nM

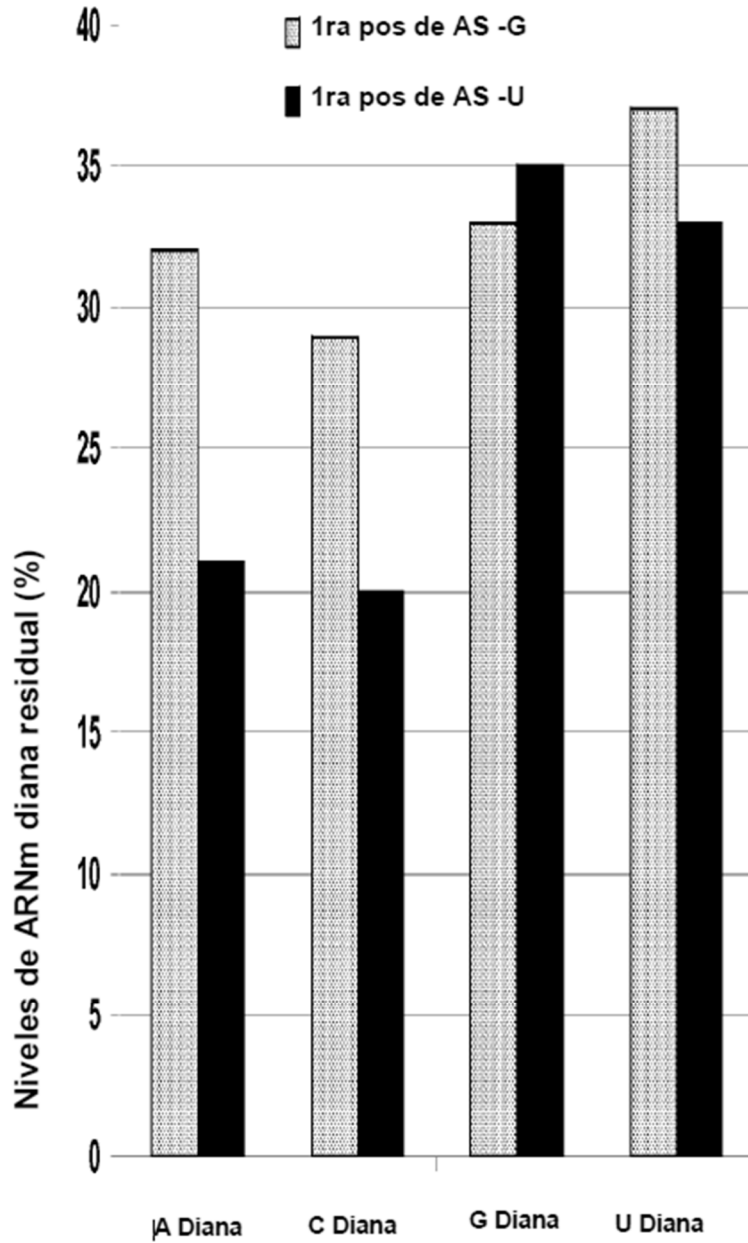


FIGURA 5

ARNip de TLR2_46 (sin modificar con salientes C3-C3 o dTdT en 3')

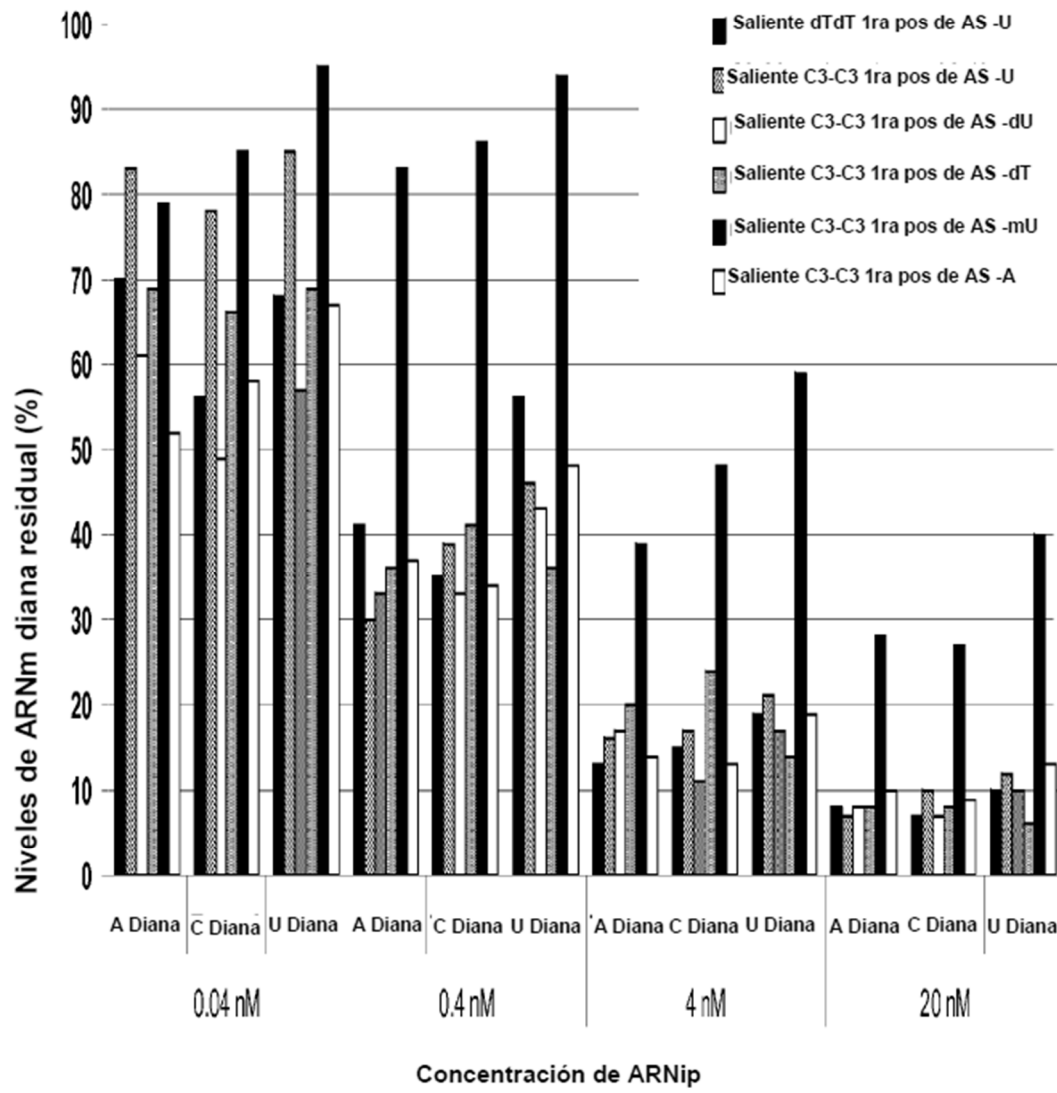


FIGURA 6

ARNip de TLR2_46 (sin modificar con salientes dTdT)

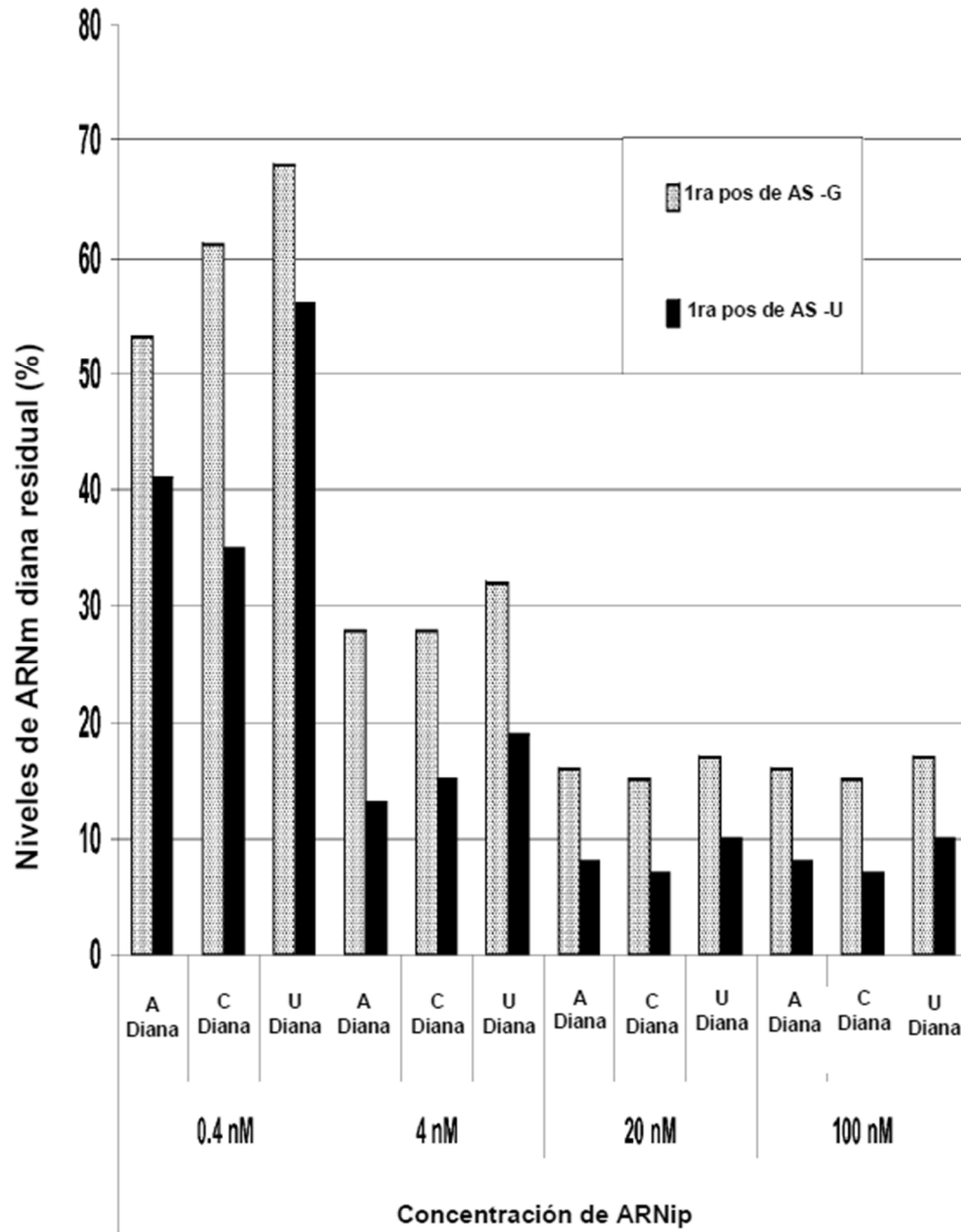


FIGURA 7

ARNip de RHOA_61 (sin modificar con salientes C3-C3 o dTdT)

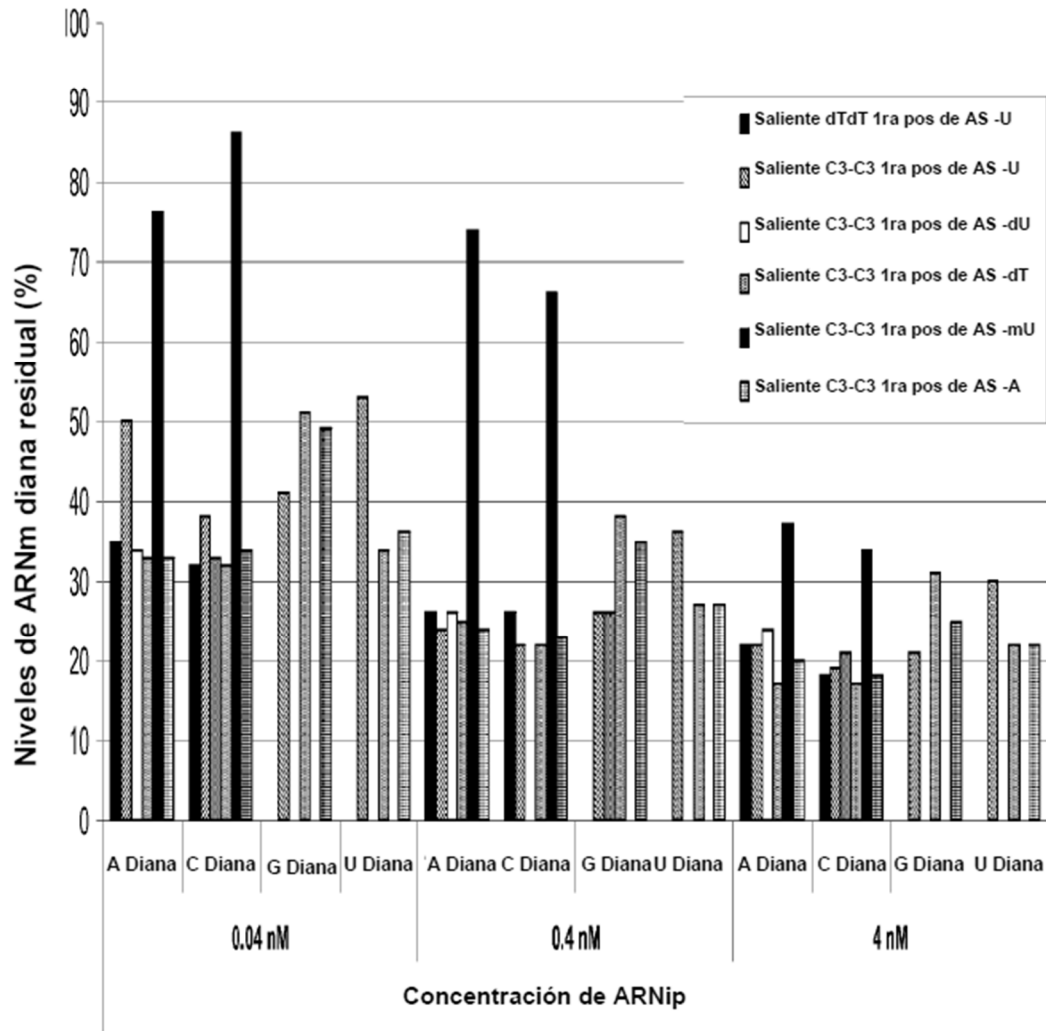
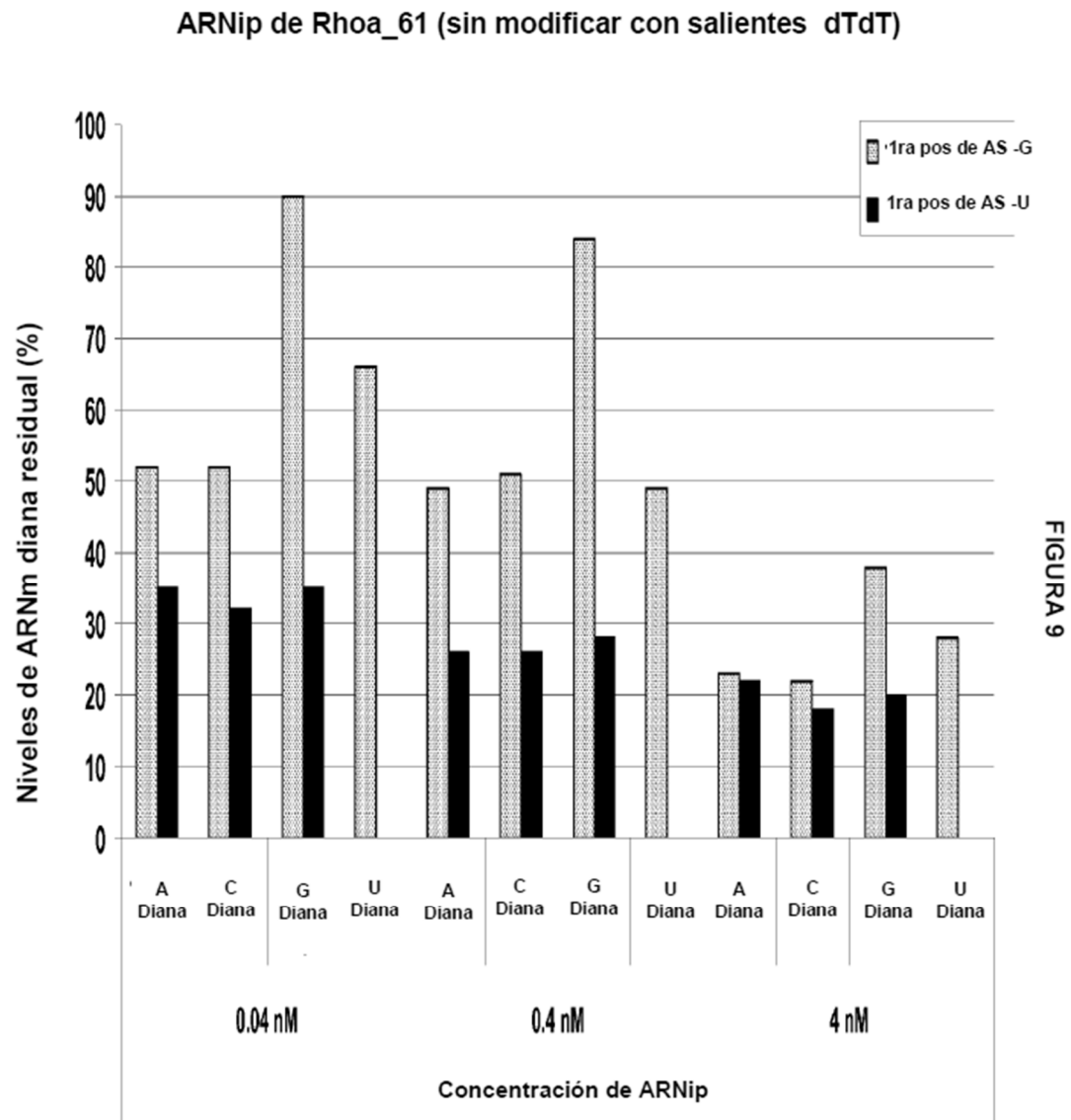


FIGURA 8



ARNip de Rhoa_61 (sin modificar con salientes dTdT)

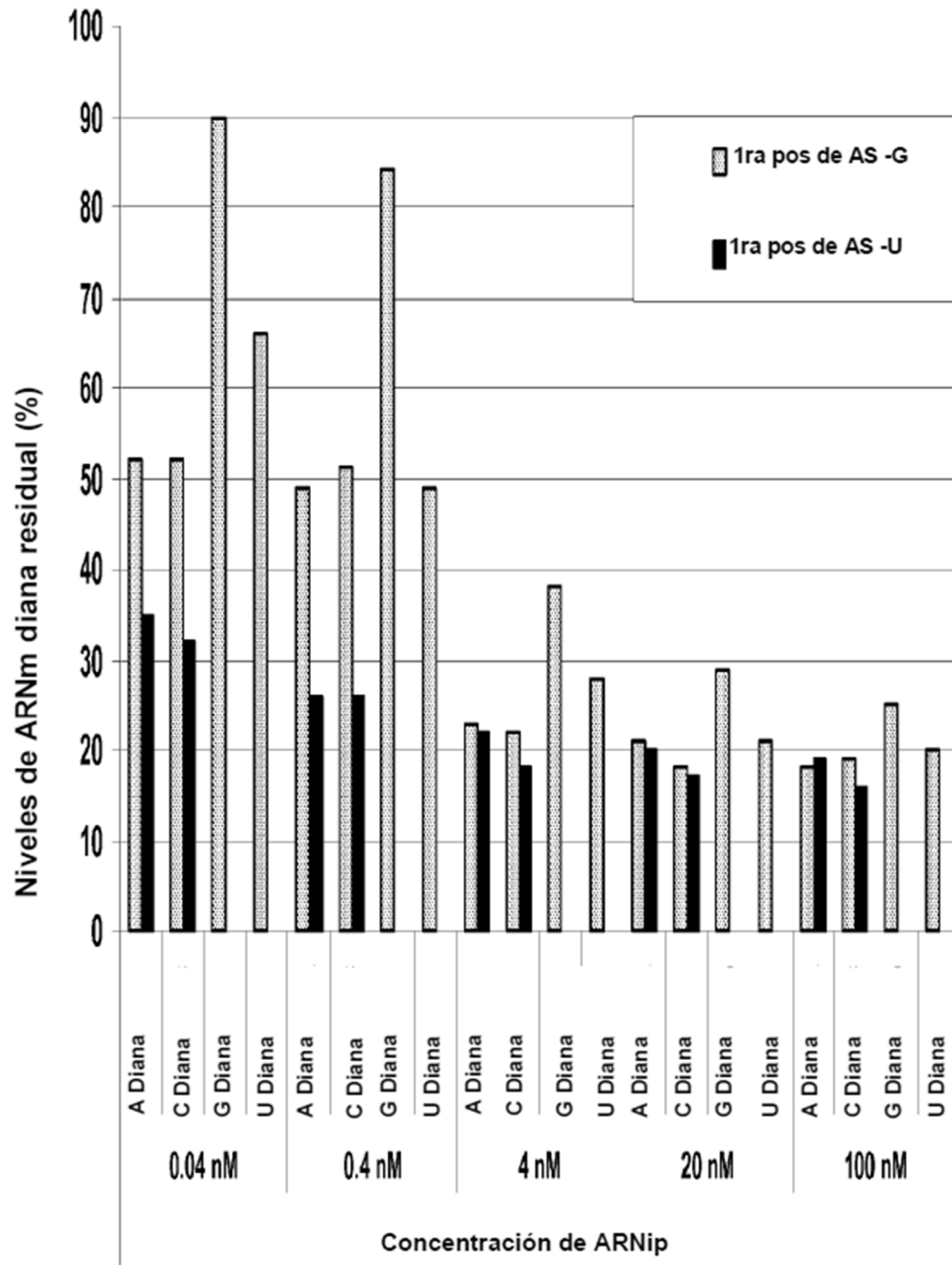


FIGURA 10