

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 905 724**

51) Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 5/00 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2004 E 19196267 (9)**

97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.12.2021 EP 3604537**

54) Título: **Ácido ribonucleico bicatenario con elevada eficacia en un organismo**

30) Prioridad:

13.06.2003 EP 03013296
18.06.2003 US 479354 P
03.02.2004 EP 04002374

45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2022

73) Titular/es:

ALNYLAM EUROPE AG (100.0%)
Fritz-Hornschuch-Strasse 9
95326 Kulmbach, DE

72) Inventor/es:

WOPPMANN, CLAUDIA;
VORNLOCHER, HANS-PETER;
HADWIGER, PHILIPP;
JOHN, MATTHIAS y
LIMMER, STEFAN

74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 905 724 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ácido ribonucleico bicatenario con elevada eficacia en un organismo

Antecedentes de la invención

5 Muchas enfermedades (por ejemplo, cánceres, trastornos hematopoyéticos, trastornos endocrinos y trastornos inmunitarios) surgen de la expresión o actividad anormal de un gen particular o grupo de genes. Similarmente, la enfermedad puede resultar de la expresión de una forma mutante de proteína, así como de la expresión de genes virales que se han integrado en el genoma de su hospedador. Existen numerosos beneficios terapéuticos de la capacidad para silenciar selectivamente estos genes anormales o extraños.

10 Se han desarrollado varios agentes terapéuticos capaces de inhibir la expresión de un gen diana, más en particular ácido nucleico antisentido (véase, por ejemplo, Skorski, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91:4504-4508). Sin embargo, los enfoques antisentido, que usan o ARN o ADN monocatenario, actúan en una relación estequiométrica 1:1 y así tienen baja eficacia (Skorski et al., arriba). Por ejemplo, Jansen et al. informan que se requirieron dosis relativamente altas (1,7 mg/kg de peso corporal por día, dando como resultado concentraciones plasmáticas a largo plazo por encima de 1 mg/L) de ARN antisentido específico para el gen bcl2 para obtener el efecto previsto del compuesto antisentido (es decir, 40 % de reducción en la expresión de bcl2) (Jansen, B., et al., The Lancet (2000) 356:1728-1733).

20 Relativamente recientemente, se ha mostrado que moléculas de ARN bicatenario (ARNbc) bloquean la expresión génica en virtud de un mecanismo regulador altamente conservado conocido como interferencia por ARN (iARN). Brevemente, la enzima Dicer de ARN III procesa ARNbc en ARN interferente pequeño (ARNip) de aproximadamente 22 nucleótidos. Una cadena del ARNip (la "cadena complementaria") sirve entonces de secuencia guía para inducir la escisión de ARN mensajeros (ARNm) que comprenden una secuencia de nucleótidos que es al menos parcialmente complementaria a la secuencia de la cadena complementaria por un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) (Hammond, S.M., et al., Nature (2000) 404:293-296). La cadena complementaria no se escinde o degrada de otro modo en este proceso, y RISC que comprende la cadena complementaria puede efectuar posteriormente la escisión de ARNm adicionales. En otras palabras, la iARN, a diferencia de antisentido, implica una reacción de tipo catalítico y degrada el ARNm diana en un modo no estequiométrico. Cuando se administra a una célula u organismo, se ha mostrado que el ARNbc exógeno dirige la degradación específica de secuencia de ARN mensajero endógeno mediante iARN. Por ejemplo, Kreutzer, R., Limmer, S., publicación PCT internacional N° WO 00/44895 desvela ARNbc que son agentes eficaces para inducir iARN, así como métodos de introducción de ARNbc en una célula para inhibir la expresión de un gen diana. Tuschl et al., publicación PCT internacional N° WO 02/44321 informan de la eficiente escisión de ARN diana en un lisado celular usando ARNbc que tiene un extremo protuberante de nucleótidos en 3', así que muestra una correlación entre la eficacia de un ARNbc, su longitud, y la posición y longitud de extremos protuberantes de nucleótidos no emparejados. El documento de patente WO 02/44321 informa de eficiencia mejorada cuando el extremo protuberante de nucleótidos en 3' tiene 2 nucleótidos de longitud y cuando el nucleótido sin emparejar directamente adyacente al par de nucleótidos terminal es una base de uridina (es decir, una base de pirimidina).

40 Aunque se ha mostrado que la interferencia por ARN usando ARNbc es un medio eficaz para el silenciamiento génico selectivo, el ARN es extremadamente inestable en algunos líquidos corporales, particularmente en suero. Así, el ARN, que incluye ARNbc, se puede degradar entre el momento en el que se administra a un sujeto y el momento en el que entra en una célula diana. Incluso dentro de la célula, el ARN experimenta una rápida degradación por nucleasas. Aunque un ARNbc más estable o resistente a nucleasas ofrecería mejor biodisponibilidad y, por tanto, eficacia mejorada, son insuficientes los medios conocidos hasta la fecha para estabilizar el ARNbc contra la degradación.

45 Así, a pesar de los significativos desarrollos recientes en el campo de la interferencia por ARN, sigue existiendo una necesidad de una molécula de ARNbc más eficaz que pueda silenciar selectivamente y eficientemente un gen diana. Más específicamente, sería altamente deseable una molécula de ARNbc que tuviera resistencia potenciada a la degradación química y/o enzimática, y por tanto, estabilidad y biodisponibilidad en suero mejorada, y que pudiera ser fácilmente y rentablemente sintetizada. Las composiciones que comprenden dichos agentes serían útiles para tratar enfermedades provocadas por la expresión o actividad anormal de un gen.

50 Sumario de la invención

La invención se define por las reivindicaciones. Se refiere a un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), en donde dicho ARNbc comprende una cadena de ARN antisentido y una cadena de ARN sentido, en donde dicha cadena de ARN antisentido tiene una secuencia de nucleótidos de menos de 30 nucleótidos de longitud y es sustancialmente complementaria a un ARN diana, en donde (a) al menos un extremo de dicho ARNbc comprende un extremo protuberante de 1 a 2 nucleótidos, (b) dicho ARNbc comprende al menos un nucleótido químicamente modificado, en donde dicho al menos un nucleótido químicamente modificado es un nucleótido de 2'-O-metilo, (c) el nucleótido sin emparejar adyacente al par de bases del nucleótido terminal comprende una base de purina, (d) dicho ARNbc está conjugado con un ligando, en donde dicho ligando se selecciona de (i) agrupaciones de hidratos de carbono, (ii)

polietilenglicoles, (iii) péptidos de administración, (iv) agentes de reticulación, y (v) conjugados de porfirina, (e) al menos un nucleótido del ARNbc comprende un grupo fosforotioato o fosforoditioato, y en donde sustancialmente complementario significa que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia.

5 Se describe un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) que tiene estabilidad mejorada en células y líquidos biológicos, métodos de identificación de ARNbc que tiene estabilidad mejorada, así como composiciones farmacéuticas y métodos de inhibición de la expresión de un gen diana en una célula usando el ARNbc. La divulgación también se refiere a composiciones y a métodos de tratamiento de enfermedades, dolencias o aflicciones asociadas con la expresión en exceso o por defecto de un gen diana. El ARNbc descrito comprende un extremo protuberante de nucleótidos de 1 a 14 nucleótidos y puede comprender además al menos un nucleótido
10 sustituido o químicamente modificado, de manera que el ARNbc modificado tenga mayor resistencia a la digestión química o enzimática, y, por lo tanto, tenga mayor estabilidad y biodisponibilidad que un ARNbc idéntico sin la modificación.

15 En un aspecto, la divulgación se refiere a ARNbc que tiene estabilidad mejorada en células y líquidos biológicos, particularmente suero. El ARNbc comprende dos cadenas sencillas. Una cadena del ARNbc comprende una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a una porción del gen diana (la cadena "sentido"), y la otra cadena (la cadena "complementaria" o "antisentido") comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria al gen diana. La cadena complementaria de ARN tiene menos de 30 nucleótidos, preferentemente menos de 25 nucleótidos de longitud, y más preferentemente 19 a 24 nucleótidos de longitud. La secuencia de
20 nucleótidos complementarios tiene preferentemente 20-23 nucleótidos de longitud, y más preferentemente 22 nucleótidos de longitud. El ARNbc comprende además un extremo protuberante de nucleótidos monocatenario en al menos un extremo del ARNbc. El extremo protuberante de nucleótidos puede comprender 1 a 4 nucleótidos sin emparejar, en donde el nucleótido sin emparejar del extremo protuberante monocatenario que es directamente adyacente al par de nucleótidos terminal contiene una base de purina, y en donde el par de nucleótidos terminal es un par G-C, o en donde al menos dos de los últimos cuatro pares de nucleótidos complementarios son pares G-C.
25 En casos adicionales, el extremo protuberante puede tener 1 o 2 nucleótidos sin emparejar, y en un caso a modo de ejemplo el extremo protuberante de nucleótidos es 5'-GC-3'. En casos preferidos, el extremo protuberante de nucleótidos está sobre el extremo 3' de la cadena complementaria.

30 En otro aspecto, la divulgación se refiere a una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen diana en un organismo. Las composiciones comprenden un ARNbc, como se ha descrito anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser una disolución acuosa, tal como solución salina tamponada con fosfato, o puede comprender una estructura micelar, un liposoma, un vehículo polimérico, o modificadores de la liberación.

35 En aún otro aspecto, la divulgación se refiere a un método de inhibición de la expresión de un gen diana en una célula. El método comprende introducir un ARNbc, como se ha descrito anteriormente, en la célula, y mantener la célula durante un tiempo suficiente para obtener la degradación de un transcrito de ARNm del gen diana. La célula puede ser una célula de mamífero.

40 En aún otro aspecto más, la divulgación se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad, dolencia, o aflicción provocada por la expresión de un gen diana en un sujeto. El método comprende administrar una composición farmacéutica que comprende un ARNbc, como se ha descrito anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El sujeto puede ser un ser humano.

45 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método de identificación de un ARNbc que tiene elevada estabilidad en una muestra biológica. El método puede comprender preparar una mezcla de ARNbc, incubar la mezcla de ARNbc en la muestra biológica, e identificar un ARNbc que presenta una elevada estabilidad en comparación con otro ARNbc en la muestra biológica. La mezcla de ARNbc se puede preparar por síntesis química o por extracción de una muestra biológica. Alternativamente, el método puede comprender introducir un ARNbc en una célula, mantener la célula en condiciones adecuadas para expresar una proteína codificada por un gen diana, medir una cantidad de la proteína producida en la célula, comparar la cantidad de la proteína producida en la célula con la de una célula de control, e identificar un ARNbc que provoca una reducción en la cantidad de proteína en la célula en comparación con la célula de control. La célula puede ser una célula de mamífero.

50 En todavía otro aspecto, la divulgación se refiere a un método de aumento de la resistencia a nucleasas de un ARNbc. El método comprende formar un ARNbc, como se ha descrito anteriormente, en donde la resistencia a nucleasas del ARNbc es elevada en comparación con una composición de control.

Breve descripción de las figuras

55 La **Figura 1** es una separación electroforética en gel de un ARNbc que es el sujeto de la presente invención sin incubación, y después de 0, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos incubación en suero.

La **Figura 2** es una separación electroforética en gel de otro ARNbc que es el objeto de la presente invención sin incubación, y después de 0, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos incubación en suero.

La **Figura 3** es una separación electroforética en gel de un ARNbc convencional sin incubación, y después de 0, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos incubación en suero.

Descripción detallada de la invención

5 Se describen ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) modificado que tiene estabilidad mejorada en células y líquidos biológicos en comparación con el ARNbc no modificado que reconoce el mismo ARN diana, métodos para la selección dirigida de un ARNbc que comprende un extremo protuberante de nucleótidos monocatenario, métodos de preparación de un ARNbc modificado, así como composiciones y métodos de inhibición de la expresión de un gen diana en una célula o mamífero usando el ARNbc modificado. También se describen composiciones y métodos de tratamiento de enfermedades en organismos provocadas por la expresión de un gen diana usando ARNbc modificado. El ARNbc dirige la degradación específica de secuencia del ARNm a través de un proceso conocido como interferencia por ARN (iARN). El proceso ocurre en una amplia variedad de organismos, que incluye mamíferos y otros vertebrados.

15 El ARNbc comprende una cadena complementaria de ARN y una cadena sentido de ARN, en donde la cadena complementaria de ARN tiene una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente complementaria a un ARN diana, en donde al menos una de las cadenas de ARN comprende un extremo protuberante de nucleótidos de 1 a 4 nucleótidos de longitud, y en donde el ARNbc puede comprender además al menos un nucleótido químicamente modificado. Los inventores han demostrado que el ARNbc que comprende un extremo protuberante monocatenario de 1 a 4 nucleótidos de longitud, en donde el nucleótido sin emparejar del extremo protuberante monocatenario que es directamente adyacente al par de nucleótidos terminal contiene una base de purina, y en donde los últimos pares de nucleótidos complementarios en ambos extremos del ARNbc son un par G-C, o, en donde al menos dos de los últimos cuatro pares de nucleótidos terminales son pares G-C, muestran elevada estabilidad, por ejemplo en mediciones convencionales de los puntos de fusión. Los presentes inventores también han demostrado que un ARNbc que contiene un nucleótido químicamente modificado tiene estabilidad en suero significativamente mejorada en comparación con sus homólogos de ARNbc no modificado. La presente divulgación engloba estos ARNbc modificados y composiciones que comprenden estos ARNbc y su uso para inactivar específicamente la función génica. El uso de ARNbc modificado que tiene resistencia mejorada a la degradación enzimática (es decir, elevada semivida *in vivo*) y, por tanto, biodisponibilidad mejorada, facilita la degradación dirigida de ARNm de genes que participan en una amplia variedad de procesos de enfermedad. Debido al aumento de la estabilidad y la biodisponibilidad mejorada del ARNbc modificado, se requiere menos ARNbc para producir el efecto deseado de interferencia por ARN. Así, los métodos y composiciones que comprenden estos ARNbc modificados son útiles para tratar enfermedades y trastornos provocados por la expresión o actividad de un gen particular.

La siguiente descripción detallada desvela cómo preparar y usar ARNbc modificado y composiciones que contienen ARNbc modificado que tienen estabilidad en suero mejorada para inhibir la expresión de un gen diana, así como composiciones y métodos de tratamiento de enfermedades y trastornos provocados por la expresión del gen.

35 I. Definiciones

Por comodidad, se proporcionan a continuación el significado de ciertos términos y frases usados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas.

"G", "C", "A" y "U" representan cada uno un nucleótido que contiene guanina, citosina, adenina y uracilo como base, respectivamente.

40 Como se usa en el presente documento, "gen diana" incluye polinucleótidos que comprenden una región que codifica una región de polipéptido o polinucleótido que regula la replicación, transcripción, traducción, u otro proceso importante en la expresión de la proteína diana o un polinucleótido que comprende una región que codifica el polipéptido diana y una región que regula la expresión del polipéptido diana. Por consiguiente, el término "gen diana" como se usa en el presente documento puede referirse a, por ejemplo, una molécula de ARNm producida por la transcripción del gen de interés. Además, un "gen diana" es un gen cuya expresión se va a inhibir o silenciar selectivamente mediante interferencia por ARN. El término "gen diana" engloba específicamente cualquier gen celular o fragmento génico cuya expresión o actividad está asociada con una enfermedad o trastorno (por ejemplo, un oncogén), así como cualquier gen extraño o exógeno o fragmento génico cuya expresión o actividad está asociada con una enfermedad, tal como un gen de un organismo patógeno (por ejemplo, un gen viral o pro-viral, viroide, o plasmodio).

El término "cadena complementaria de ARN" (también denominado en el presente documento "cadena no codificante") se refiere a la cadena de un ARNbc que es sustancialmente complementaria a un transcrito de ARN que se forma durante la expresión del gen diana, o sus productos de procesamiento (tales como un ARNm), o una región (tal como 3'-UTR) de un virus de ARN de cadena (+) o una porción de la misma.

55 El término "cadena sentido", como se usa en el presente documento, se refiere a la cadena de un ARNbc que es sustancialmente idéntica a una porción del gen diana y es suficientemente complementaria a la cadena antisentido de un ARNbc en condiciones fisiológicas.

"ARNbc" se refiere a una molécula de ácido ribonucleico que tiene una estructura de dúplex que comprende dos cadenas complementarias y antiparalelas de ácido nucleico (es decir, las cadenas sentido y antisentido). No todos los nucleótidos de un ARNbc deben presentar pares de bases de Watson-Crick; las dos cadenas de ARN pueden ser sustancialmente complementarias. Las cadenas de ARN puede tener el mismo número de nucleótidos o diferente. La cadena complementaria de ARN tiene menos de 30, preferentemente menos de 25, y lo más preferentemente 19 a 24 nucleótidos de longitud. El término "ARNbc" también incluye "ARNip" o ARN interferente pequeño.

Se entenderá que el término "ribonucleótido" o "nucleótido" también se puede referir, en el caso de un ARN modificado o sustituto de nucleótido, a un nucleótido modificado, o resto de sustitución sustituto en una o más posiciones. Así, el ARNbc es o incluye una región que es al menos parcialmente complementaria al ARN diana. En ciertos casos, el ARNbc es completamente complementario al ARN diana. No es necesario que haya complementariedad perfecta entre el ARNbc y la diana, pero la correspondencia debe ser suficiente para permitir que el ARNbc, o un producto de escisión del mismo, dirija el silenciamiento específico de secuencia, tal como por iARN escisión del ARN diana. La complementariedad, o grado de homología con la cadena diana, es más crítica en la cadena no codificante. Aunque la complementariedad perfecta, particularmente en la cadena no codificante, es frecuentemente deseada algunas realizaciones, puede incluir uno o más desapareamientos, pero preferentemente 6, 5, 4, 3, 2, o menos, con respecto al ARN diana. Los desapareamiento son los más tolerados en las regiones terminales, y si están presentes están preferentemente en una región o regiones terminales, por ejemplo, dentro de 6, 5, 4 o 3 nucleótidos del extremo 5' y/o 3'. La cadena sentido solo necesita ser sustancialmente complementaria a la cadena antisentido para mantener el carácter bicatenario global de la molécula.

Como se usa en el presente documento, "ARNbc modificado" se refiere a una molécula de ARNbc que comprende al menos un alteración que la hace más resistente a nucleasas (por ejemplo, proteína cinasa) que una molécula de ARNbc idéntica que reconoce el mismo ARN diana. El ARNbc modificado de la presente invención incluye un extremo protuberante de nucleótidos monocatenario y/o al menos un nucleótido sustituido.

El término "nucleótido sustituido" o "base sustituida", como se usa en el presente documento, se refiere a un nucleótido o una base de nucleótido que ha sido alterada para convertir el ARNbc en más resistente a nucleasas (es decir, más estable) que un ARNbc que existe de forma natural o un ARNbc químicamente sintetizado que reconoce la misma secuencia diana, pero carece del nucleótido alterado o adicional o base de nucleótido. Las modificaciones a modo de ejemplo que generan nucleótidos sustituidos que aumentan la estabilidad del ARNbc incluyen, por ejemplo, sustituir un nucleótido con otro (por ejemplo, sustituir un nucleótido que comprende una base de pirimidina con un nucleótido que comprende una base de purina, o sustituir un nucleótido no mutante con un nucleótido bloqueado), modificación química de una base, modificación química de un nucleótido (por ejemplo, sustituir un grupo 2'-hidroxilo con un grupo químico, tal como un grupo 2'-amino o uno 2'-metilo), y alteración de los extremos 3' o 5' de una cadena de ARN de la molécula de ARNbc (por ejemplo, que incorpora un enlace no nucleotídico, tal como un conector de propilo).

Los términos "base químicamente modificada" o "base de nucleótido químicamente modificado", como se usan en el presente documento, se refieren a una base de nucleótido que se ha modificado químicamente. Los términos "base no modificada" o "base de nucleótido no modificada" significan una de las bases que existen de forma natural o no mutantes (adenina, citosina, guanosina, uracilo) unidas al carbono 1' de un azúcar pentosa, que tiene un fosfato unido al carbono 5'. El término "químicamente modificado", como se usa en el presente documento, incluye modificaciones que introducen restos químicos u otras características estructurales que se diferencian de las observadas en ARN que existe de forma natural. Dichas modificaciones pueden afectar la capacidad de una base para el enlace de hidrógeno con su base complementaria normal, e incluyen, sin limitación, derivados heterocíclicos, análogos de nucleótidos, modificaciones covalentes tales como la introducción de nucleótidos modificados, o la inclusión de grupos laterales que no se encuentran naturalmente en moléculas de ARN. Un "nucleótido químicamente modificado", como se usa en el presente documento, significa un nucleótido que contiene una modificación en su estructura química que produce un cambio medible en la estabilidad de un ARNbc que contiene un nucleótido modificado en comparación con un ARNbc idéntico sin el nucleótido modificado.

Los términos "purina" y "base de purina" se refieren a las bases de adenina y guanina que existen de forma natural. Los términos también se refieren a modificaciones de estas bases, tales como bases sustituidas en la posición 8, o análogos de guanina modificados en la posición 6 o el análogo de adenina, 2-amino o 2-metil purina, así como análogos de purinas que tienen nitrógeno que sustituyen el carbono en la posición 9, tales como derivados de 9-deazapurina y otros análogos de purina.

Como se usa en el presente documento, un "extremo protuberante de nucleótidos" se refiere al nucleótido o nucleótidos sin emparejar que sobresalen de la estructura de dúplex cuando un extremo 3' de una cadena de ARN se extiende más allá del extremo 5' de la otra cadena complementaria, o viceversa. "Romo" o "extremo romo" significa que no existen nucleótidos sin emparejar en ese extremo del ARNbc, es decir, sin extremo protuberante de nucleótidos. Un ARNbc de "extremo romo" es un ARNbc que es bicatenario a lo largo de su longitud entera, es decir, sin extremo protuberante de nucleótidos en ningún extremo de la molécula.

El término "bicatenario" significa dos cadenas de ARN separadas que comprenden una región en la que al menos una porción de las cadenas es suficientemente complementaria al enlace hidrógeno y forma una estructura de dúplex. El término "dúplex" o "estructura de dúplex" se refiere a la región de la molécula de ARNbc en donde las dos cadenas de ARN separadas son sustancialmente complementarias, y así se hibridan entre sí.

El término "par de bases terminal", como se usa en el presente documento, se refiere al último par de bases del nucleótido en un extremo de la región de dúplex del ARNbc. Así, donde el ARNbc sea de extremos romos (es decir, no tenga extremos protuberantes de nucleótidos), los últimos pares de bases del nucleótido en ambos extremos del ARNbc son pares de bases terminales. Donde un ARNbc tenga un extremo protuberante de nucleótidos en uno o ambos extremos de la estructura de dúplex, el (los) último(s) par(es) de bases del nucleótido inmediatamente adyacentes al (a los) nucleótido(s) protuberante(s) es (son) el par de bases terminal en ese (esos) extremo(s) del ARNbc.

El término "silenciar" significa suprimir al menos parcialmente. Por ejemplo, en ciertos casos, el gen es suprimido por al menos aproximadamente 25 %, 35 % o 50 % por administración del oligonucleótido bicatenario de la invención. En un caso preferido, el gen es suprimido por al menos aproximadamente 60 %, 70 % u 80 % por administración del oligonucleótido bicatenario de la invención. En un caso más preferido, el gen es suprimido por al menos aproximadamente 85 %, 90 % o 95 % por administración del oligonucleótido bicatenario de la invención. En un caso todavía más preferido, el gen es suprimido por al menos aproximadamente 98 % o 99 % por administración del oligonucleótido bicatenario de la invención.

II. Ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc)

Se describe un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) que tiene resistencia mejorada a productos químicos y/o digestión de nucleasas, y así elevada estabilidad en suero y una semivida más larga *in vivo*. El aumentar la semivida *in vivo* del ARNbc da como resultado biodisponibilidad potenciada y, por tanto, eficacia potenciada en inhibir la expresión o actividad de un gen diana (Czauderna et al., NAR 2003, 31:2705-2716). En la sangre, la estabilidad del ARNbc se determina por su susceptibilidad a la degradación por enzimas presentes en la sangre. Sorprendentemente, se ha mostrado que la susceptibilidad a la degradación depende de las secuencias de las cadenas sencillas que forman el ARNbc. Así, la presente invención se basa, al menos en parte, en mejorar la eficiencia de ARNbc como un agente terapéutico, aumentando el estabilidad en suero del ARNbc, mientras se mantiene la capacidad del ARNbc para mediar en la interferencia por ARN *in vivo*. En ciertos casos, la estabilidad en suero se refiere a una medición de la estabilidad en sangre que se aproxima experimentalmente determinando la estabilidad en suero (es decir, la fase acuosa de sangre libre de componentes celulares y factores de coagulación).

El ARNbc comprende dos cadenas sencillas. Una cadena del ARNbc comprende una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a una porción del gen diana (la cadena "sentido"), y la otra cadena (la cadena "complementaria" o "antisentido") comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria a una porción de un transcrito de ARN que se forma durante la expresión del gen diana. Las cadenas son suficientemente complementarias para hibridarse para formar una estructura de dúplex. La cadena complementaria de ARN es inferior a 30 nucleótidos, preferentemente inferior a 25 nucleótidos de longitud, y más preferentemente 19 a 24 nucleótidos de longitud. La secuencia de nucleótidos complementaria tiene preferentemente 20-23 nucleótidos de longitud, y más preferentemente 22 nucleótidos de longitud. El ARNbc de la presente invención comprende además al menos un extremo protuberante de nucleótidos monocatenario, en donde el nucleótido sin emparejar del extremo protuberante monocatenario que es directamente adyacente al par de nucleótidos terminal contiene una base de purina, y en donde el par de nucleótidos terminal es un par G-C, o en donde al menos dos de los últimos cuatro pares de nucleótidos complementarios son pares G-C. El ARNbc de la presente invención puede comprender además un nucleótido sustituido o químicamente modificado. Como se trata con detalle en la Sección III más adelante, el ARNbc se puede sintetizar por métodos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automático, tal como los comercialmente disponibles de Biosearch, Applied Biosystems, Inc.

Al menos un extremo del ARNbc puede comprender un extremo protuberante de nucleótidos monocatenario. Un extremo protuberante monocatenario en el ARNbc contribuye a un aumento en la eficacia intracelular del ARNbc y así tienen propiedades inhibitoras superiores en comparación con sus homólogos de extremos romos. Sin embargo, el ARNbc con al menos un extremo romo muestra mayor estabilidad *in vivo* (es decir, es más resistente a la degradación en la sangre, plasma y células) que el ARNbc con extremos protuberantes en ambos extremos. La presencia de solo un extremo protuberante fortalece la actividad de interferencia del ARNbc. Además, el ARNbc que tiene solo un extremo protuberante ha demostrado ser particularmente eficaz *in vivo* (así como en una variedad de células, y medios de cultivo), y son más estables que los ARNbc que tienen dos extremos romos. En teoría, el extremo protuberante monocatenario puede comprender cualquier número de nucleótidos. En ciertos casos, el extremo protuberante monocatenario puede ser inferior o igual a 15 nucleótidos de longitud. En ciertos casos, el extremo protuberante monocatenario tiene 1 a 4 nucleótidos. En otros casos, el extremo protuberante monocatenario tiene 1 o 2 nucleótidos.

Sorprendentemente, la presencia de una base de purina en el extremo protuberante de nucleótidos inmediatamente adyacente al par de bases terminal proporciona resistencia adicional a la degradación. Así, el nucleótido sin

emparejar directamente adyacente al par de nucleótidos terminal puede comprender una base de purina, tal como guanina (G) o adenina (A). Cuando un extremo protuberante monocatenario consiste en más de un nucleótido, la estabilidad se eleva adicionalmente cuando al menos la mitad del extremo protuberante consiste en bases de purina, en particular bases G o A. El extremo protuberante puede comprender la secuencia 5'-GC-3'. Además, cuando el extremo protuberante de nucleótidos tiene 2 nucleótidos de longitud, la secuencia es preferentemente 5'-GC-3'. Esto contradice el hallazgo del documento de patente WO 02/44321, que informa que en un extremo protuberante de 2 nucleótidos en el extremo 3' de un ARNbc, la uridina (es decir, una pirimidina) es preferible como el nucleótido sin emparejar que es directamente adyacente al par de nucleótidos terminal.

En un caso adicional, el extremo protuberante monocatenario se localiza en el extremo 3' de la cadena de ARN complementaria (antisentido). En aún otro caso adicional, el extremo protuberante de nucleótidos está en el extremo 3' de la cadena complementaria de ARN, y el extremo 5' es romo.

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que pequeños cambios en el grado de apareamiento de bases o enlace de hidrógeno entre las dos cadenas de ARN puede tener un efecto significativo sobre la estabilidad del ARNbc. Además, los presentes inventores han determinado que una sutil alteración en el grado de enlace de hidrógeno entre las dos cadenas de ARN, y particularmente la colocación de la modificación, se puede usar para mejorar la estabilidad del ARNbc en comparación con un ARNbc por lo demás idéntico (pero no modificado). Así, por ejemplo, se puede sustituir un par de bases de adenosina-uracilo (A-U) con un par de bases de guanina-citosina (G-C) para aumentar la interacción del enlace de hidrógeno entre las dos cadenas de ARN. Así se reducen las posibilidades de disociación entre las cadenas de ARN, debido al enlace de hidrógeno adicional (tres en G-C en comparación con dos en A-U), mejorándose así la estabilidad de la molécula de ARNbc.

En un caso, los nucleótidos que comprenden adenina (A) y uracilo (U) en al menos un par de bases de nucleótidos de un ARNbc no mutante o no modificado están sustituidos con nucleótidos que comprenden guanina (G) y citosina (C) para formar un par de bases G-C que tienen un elevado enlace de hidrógeno. Preferentemente, la modificación de bases se introduce en un par de bases terminal en un extremo de la estructura de dúplex, y, más preferentemente, en los pares de bases terminales en ambos extremos de la estructura de dúplex. Así, el ARNbc puede comprender un par G-C como el par de nucleótidos terminal en ambos extremos de la estructura de dúplex. En un caso alternativo, el ARNbc comprende al menos dos pares G-C dentro de los últimos cuatro pares de nucleótidos terminales (es decir, los últimos cuatro pares de bases de nucleótidos contiguos en ambos extremos de la estructura de dúplex).

Se proporciona un método para la selección dirigida de un ARNbc que consiste en dos cadenas sencillas que presentan elevada eficacia en inhibir la expresión de un gen diana por medio de interferencia por ARN, en donde la secuencia de las cadenas sencillas del ARNbc se selecciona de forma que comprendan al menos un extremo protuberante monocatenario de 1 a 4 nucleótidos sin emparejar; en donde el nucleótido sin emparejar directamente adyacente al par de bases terminal es una base de purina; y en donde el par de nucleótidos terminal es un par G-C, o al menos dos de los últimos cuatro pares de nucleótidos terminales son pares G-C.

Las secuencias de las cadenas sencillas del ARNbc se pueden seleccionar seleccionando una región y su longitud dentro del gen diana a inhibir, de forma que un ARNbc con una cadena que es complementaria presente los elementos anteriormente descritos. Debido a que nucleótidos individuales que no son complementarios al gen diana no inhiben la interferencia por ARN, es posible unir un nucleótido individual o nucleótidos individuales a la región de una cadena de ARNbc que es complementaria al gen diana, o sustituir nucleótidos individuales en la cadena para obtener un ARNbc que presenta los elementos definidos en los términos de la invención.

La Tabla 1 muestra ARNbc a modo de ejemplo que tiene elevada estabilidad de ARN, y que comparte ciertas características estructurales comunes. El ARNbc de la Tabla 1 se proporciona para ilustración solo, y no pretende limitar el alcance de la invención. Cualquier ARNbc que tenga elevada estabilidad debido a una o más de estas características estructurales está englobado por la presente invención. Por ejemplo, el ARNbc de la Tabla 1 comprende todas las características estructurales anteriormente tratadas, específicamente (1) 1-2 extremos protuberantes de nucleótidos en un extremo y un extremo romo en el otro; (2) el nucleótido sin emparejar adyacente al par de bases del nucleótido terminal es una purina; y (3) los pares de bases terminales en ambos extremos del ARNbc son pares G-C, o al menos dos de los cuatro pares de bases terminales consecutivos en ambos extremos son pares de bases G-C.

Tabla 1

Fuente	Información de secuencia
De Bc1-2	5'-GGCGACUUCGCCGAGAUGUCC-3' (SEQ ID NO: 7) 3'-CGCCGCUGAAGCGGCUCUACAGG-5' (SEQ ID NO: 8)
De Bc1-2	5'-ACCGGGCAUCUUCUCCUCCCA-3' (SEQ ID NO: 9) 3'-CGUGGCCCGUAGAAGAGAGGGU-5' (SEQ ID NO: 10)

5 La Tabla 2 representa una lista de moléculas de ARNbc cuyas secuencias son conocidas, y que cumplen los requisitos estructurales de un ARNbc como se describe en el presente documento. No se han modificado las moléculas de ARNbc identificadas por SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 13, 14, 15 y 16 en la Tabla 2, es decir, ninguna de estas moléculas de ARNbc comprende un nucleótido o una base de nucleótido que haya sido alterada o añadida a la secuencia para convertir la molécula en más resistente a nucleasas. El ARNbc representado por SEQ ID NOs: 17 y 18 fue como se describió en los documentos de patente WO 02/44321 y WO 03/099298. Sin embargo, cada una de estas seis moléculas de ARNbc se excluye explícitamente.

10

Tabla 2

Información de secuencia	
5'-CAGGACCUCGCCGUGCAGACC-3'	(SEQ ID NO: 1)
3'-CGGUCCUGGAGCGGCGACGUCUGG-5'	(SEQ ID NO: 2)
5'-GCCUUUGUGGAACUGUACGGCC-3'	(SEQ ID NO: 3)
3'-UACGGAAACACCUUGACAUGCCGG-5'	(SEQ ID NO: 4)
5'-CUUCUCCGCCUCACACCGCUGCAA-3'	(SEQ ID NO: 5)
3'-GAAGAGGCGGAGUGUGGCGACG-5'	(SEQ ID NO: 6)
5'-ACGGCUAGCUGUGAAAGGUCC-3'	(SEQ ID NO: 13)
3'-AGUGCCGAUCGACACUUUCCAGG-5'	(SEQ ID NO: 14)
5'-CAAGGAGCAGGGACAAGUUAC-3'	(SEQ ID NO: 15)
3'-AAGUCCUCGUCCCUGUUCUAAUG-5'	(SEQ ID NO: 16)
5'-CACGUACGCGAAUACUUCGAAA-3'	(SEQ ID NO: 17)
3'-GUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU-5'	(SEQ ID NO: 18)

15 La Tabla 3 representa una lista de moléculas de ARNbc en donde ambos extremos comprenden extremos protuberantes de nucleótidos monocatenarios cuyas secuencias son conocidas, y que cumplen los requisitos estructurales de un ARNbc como se describe en el presente documento. El ARNbc representado por SEQ ID NOs: 19 y 20 fue como se describió en el documento de patente WO 04/011647, y los ARNbc representados por SEQ ID NOs: 21-42 se describieron en el documento de patente WO 03/012052. Sin embargo, cada una de estas 12 moléculas de ARNbc se excluye explícitamente.

Tabla 3

Información de secuencia		Nombre del gen diana
5'-CCGCUUGACUGCAGAGAGUGC-3'	(SEQ ID NO: 19)	Específico de HCV
3'-UCGGCGAACUGACGUCUCUCA-5'	(SEQ ID NO: 20)	
5'-CAUCUUCUUCAAGGACGACGGC-3'	(SEQ ID NO: 21)	proteína verde fluorescente (egfP)
3'-UGGUAGAAGAAGUUCUGCUGC-5'	(SEQ ID NO: 22)	
5'-GGUGGCGCUGGAUGGUAAGCCGC-3'	(SEQ ID NO: 23)	LacZ
3'-UACCACCGCGACCUACCAUUCGG-5'	(SEQ ID NO: 24)	
5'-UCCCCAGGAGGCCUGCGGGAGC-3'	(SEQ ID NO: 25)	Erb-B2 humano (Her2)
3'-GGAGGGGUCCUCCGGACGCCCU-5'	(SEQ ID NO: 26)	
5'-UGCAGCUUCGAAGCCUCACAGA-3'	(SEQ ID NO: 27)	Erb-B2 humano (Her2)
3'-CGACGUCGAAGCUUCGGAGUGU-5'	(SEQ ID NO: 28)	
5'-UGGGGAGAGAGUUCUGAGGAUU-3'	(SEQ ID NO: 29)	Erb-B2 humano (Her2)
3'-CGACCCUCUCUCAAGACUCCU-5'	(SEQ ID NO: 30)	
5'-ACCUCCGCAACAACUACGCGC-3'	(SEQ ID NO: 31)	PNMT
3'-GAUGGAGGCGUUGUUGAUGCG-5'	(SEQ ID NO: 32)	
5'-GUAGACCUUGCUACUGCCUGC-3'	(SEQ ID NO: 33)	RAD51C
3'-ACCAUCUGGAACGAUGACGGA-5'	(SEQ ID NO: 34)	
5'-CAUGACGGAACUAGAGACAGC-3'	(SEQ ID NO: 35)	S100P
3'-UGGUACUGCCUUGAUCUCUGU-5'	(SEQ ID NO: 36)	
5'-CUCUACGCUUGUACGAGGAGC-3'	(SEQ ID NO: 37)	TBX2
3'-CAGAGAUGCGAACAUUCUCCU-5'	(SEQ ID NO: 38)	
5'-CAGACUUCGGAGUACCUUGCGC-3'	(SEQ ID NO: 39)	TXNIP
3'-UUGUCUGAAGCCUCAUGGACG-5'	(SEQ ID NO: 40)	
5'-CAUCUUCUUCAAGGACGACGGC-3'	(SEQ ID NO: 41)	proteína verde fluorescente (egfP)
3'-UGGUAGAAGAAGUUCUGCUGC-5'	(SEQ ID NO: 42)	

Se describe un ARNbc que tiene secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas o complementarias a al menos una porción de un gen diana. Normalmente se prefiere 100 % de identidad de secuencia entre la cadena codificante del ARNbc inhibidor y la porción del gen diana. Sin embargo, están englobados por la presente invención los ARNbc modificados que tiene al menos 70 %, o 85 %, o 90 % o 95 % de identidad de secuencia con el gen diana, así como resistencia mejorada a la degradación enzimática y/o disociación. El ARNbc modificado puede tener las siguientes características estructurales: (1) un extremo protuberante de nucleótidos en un extremo del ARNbc y un extremo romo en el otro extremo; (2) el nucleótido sin emparejar en el extremo protuberante de nucleótidos adyacente al par de bases terminal comprende una base de purina; y (3) los pares de bases terminales en ambos extremos de la estructura de dúplex son pares de bases G-C, o al menos dos de los cuatro pares de bases terminales consecutivos en ambos extremos son pares de bases G-C. Dichos ARNbc modificados tienen estabilidad mejorada en tejidos biológicos, permitiendo así la administración a bajas dosificaciones, es decir, inferior a 5 mg/kg de peso corporal del receptor por día. Preferentemente, la cadena complementaria del ADNbc modificado tiene un extremo protuberante de nucleótidos en el extremo 3', y el extremo 5' es romo.

En aún otro caso, el ARNbc se modifica químicamente para potenciar más la estabilidad. Las modificaciones químicas pueden incluir, pero no se limitan a, modificaciones en 2', introducción de bases no naturales, unión

covalente a un ligando, y sustitución de enlaces fosfato con enlaces tiofosfato. En este caso, la integridad de la estructura de dúplex se refuerza por al menos un enlace químico, y preferentemente dos. El enlace químico se puede lograr por cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas, por ejemplo, introduciendo enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno; interacciones hidrófobas, interacciones de van der Waals o de apilamiento; por medio de coordinación con iones metálicos, o mediante el uso de análogos de purina. Preferentemente, los grupos químicos que se pueden usar para modificar el ARNbc incluyen, sin limitación, azul de metileno; grupos bifuncionales, preferentemente bis-(2-cloroetil)amina; N-acetil-N'-(p-glioxilbenzoil)cistamina; 4-tiouracilo; y psoraleno. En una realización preferida, el conector es un conector de hexaetilenglicol. En este caso, el ARNbc se produce por síntesis en fase sólida y el conector de hexaetilenglicol se incorpora según métodos convencionales (por ejemplo, Williams, D.J., y K.B. Hall, *Biochem.* (1996) 35:14665-14670). En un caso particular, el extremo 5' de la cadena complementaria (antisentido) de ARN y el extremo 3' de la cadena sentido de ARN se unen químicamente por un conector de hexaetilenglicol. En otro caso, al menos un nucleótido del ARNbc comprende un fosforotioato o grupos fosforoditioato. El enlace químico en los extremos del ARNbc se forma preferentemente por enlaces de triple hélice.

En ciertos casos, se puede formar un enlace químico por medio de uno o varios grupos de unión, en donde dichos grupos de unión son preferentemente cadenas de poli-(oxifosfinocoxi-1,3-propanodiol) y/o polietilenglicol. En otros casos, también se puede formar un enlace químico por medio de análogos de purina introducidos en la estructura bicatenaria en lugar de purinas. En casos adicionales, se puede formar un enlace químico por unidades de azabenceno introducidas en la estructura bicatenaria. Aún en casos adicionales, se puede formar un enlace químico por análogos de nucleótidos ramificados en lugar de nucleótidos introducidos en la estructura bicatenaria. En ciertos casos, se puede inducir un enlace químico por luz ultravioleta. En ciertos casos, se excluyen cadenas sencillas parcialmente autoasociadas (tallos-bucles).

En aún otro caso, los nucleótidos en una o ambas de las dos cadenas sencillas se pueden modificar para prevenir o inhibir la activación de enzimas celulares, tales como una proteína cinasa, cuya activación depende del ARNbc. Se conocen en la técnica las técnicas para inhibir la activación de enzimas celulares, que incluyen, pero no se limitan a, modificaciones de 2'-amino, modificaciones de 2'-aminoazúcar, modificaciones de 2'-F-azúcar, modificaciones de 2'-F, modificaciones de 2'-alquil-azúcar, modificaciones de esqueleto sin carga, modificaciones de morfolino, modificaciones de 2'-O-metilo, y fosforamidoato (véase, por ejemplo, Wagner, *Nat. Med.* (1995) 1:1116-8). Así, al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos en un ARNbc está sustituido por un grupo químico, preferentemente por un grupo 2'-amino o 2'-metilo. Por tanto, se puede modificar al menos un nucleótido para formar un nucleótido bloqueado. Dicho nucleótido bloqueado contiene un puente de metileno que conecta el 2'-oxígeno de la ribosa con el 4'-carbono de la ribosa. Los oligonucleótidos que contienen el nucleótido bloqueado se describen en Koshkin, A.A., et al., *Tetrahedron* (1998), 54: 3607-3630) y Obika, S. et al., *Tetrahedron Lett.* (1998), 39: 5401-5404). La introducción de un nucleótido bloqueado en un oligonucleótido mejora la afinidad por secuencias complementarias y aumenta la temperatura de fusión en varios grados (Braasch, D.A. y D.R. Corey, *Chem. Biol.* (2001), 8:1-7).

La conjugación de un ligando con un ARNbc puede potenciar su absorción celular. En ciertos casos, un ligando hidrófobo se conjuga con el ARNbc para facilitar la permeación directa de la membrana celular. Alternativamente, el ligando conjugado con el ARNbc es un sustrato para la endocitosis mediada por receptor. Estos enfoques se han usado para facilitar la permeación celular de oligonucleótidos antisentido. Por ejemplo, se ha conjugado colesterol con diversos oligonucleótidos antisentido dando como resultado compuestos que son sustancialmente más activos en comparación con sus análogos no conjugados. Véase M. Manoharan *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 2002, 12, 103. Otros compuestos lipófilos que se han conjugado con oligonucleótidos incluyen ácido 1-pirenobutírico, 1,3-bis-O-(hexadecil)glicerol, y mentol. Un ejemplo de un ligando para endocitosis mediada por receptor es el ácido fólico. El ácido fólico entra en la célula por endocitosis mediada por receptor de folato. Los compuestos de ARNbc que llevan ácido fólico serían eficientemente transportados en la célula por la endocitosis mediada por receptor de folato. Li y colaboradores informan que la unión de ácido fólico al extremo 3' de un oligonucleótido produjo un aumento de 8 veces en la captación celular del oligonucleótido. Li, S.; Deshmukh, H. M.; Huang, L. *Pharm. Res.* 1998, 15, 1540. Otros ligandos que se han conjugado con oligonucleótidos incluyen polietilenglicoles, agrupaciones de hidratos de carbono, agentes de reticulación, conjugados de porfirina y péptidos de administración.

En ciertos casos, la conjugación de un ligando catiónico con oligonucleótidos da frecuentemente como resultado la resistencia mejorada a las nucleasas. Los ejemplos representativos de ligandos catiónicos son propilamonio y dimetilpropilamonio. De forma interesante, se informó que los oligonucleótidos antisentido retenían su alta afinidad de unión a ARNm cuando el ligando catiónico se dispersó a través del oligonucleótido. Véase M. Manoharan *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 2002, 12, 103 y referencias en su interior.

El ARNbc conjugado con ligando se puede sintetizar usando un ARNbc que posee una funcionalidad reactiva lateral, tal como la derivada de la unión de una molécula de enlace sobre el ARNbc. Este oligonucleótido reactivo se puede hacer reaccionar directamente con ligandos comercialmente disponibles, ligandos que se sintetizan que llevan cualquiera de una variedad de grupos protectores, o ligandos que tienen un resto de enlace unido al mismo. Los métodos de la presente invención facilitan la síntesis de ARNbc conjugado con ligando usando, en algunos casos, monómeros de nucleósido que se han conjugado apropiadamente con ligandos y que se pueden unir además a un material de soporte sólido. Dichos conjugados de ligando-nucleósido, opcionalmente unidos a un material de soporte

sólido se preparan según algunos casos de los métodos de la presente divulgación por reacción de un ligando seleccionado que se une a suero con un resto de enlace situado en la posición 5' de un nucleósido u oligonucleótido. En ciertos casos, se prepara un ARNbc que lleva un ligando de aralquilo unido al extremo 3' del ARNbc uniendo primero covalentemente un elemento estructural de monómero a un soporte de vidrio de poro controlado mediante un grupo aminoalquilo de cadena larga. Entonces, los nucleótidos se unen por técnicas convencionales de síntesis en fase sólida al elemento estructural de monómero unido al soporte sólido. El elemento estructural de monómero puede ser un nucleósido u otro compuesto orgánico que sea compatible con la síntesis en fase sólida.

El ARNbc usado en los conjugados se puede preparar convenientemente y rutinariamente mediante la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. El equipo de dicha síntesis se comercializa por varios vendedores que incluyen, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Se puede emplear adicionalmente o alternativamente cualquier otro medio para dicha síntesis conocida en la técnica. También se conoce usar técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos, tales como los fosfortioatos y derivados alquilados.

Se pueden encontrar enseñanzas referentes a la síntesis de oligonucleótidos modificados particulares en las siguientes patentes de EE. UU.: las patentes de EE. UU. Nº 5.138.045 y 5.218.105, referidas a oligonucleótidos conjugados con poliamina; la patente de EE. UU. Nº 5.212.295, referida a monómeros para la preparación de oligonucleótidos que tienen enlaces de fósforo quiral; las patentes de EE. UU. Nº 5.378.825 y 5.541.307, referidas a oligonucleótidos que tienen esqueletos modificados; la patente de EE. UU. Nº 5.386.023, referida a oligonucleótidos modificados en el esqueleto y a la preparación de los mismos mediante acoplamiento reductor; la patente de EE. UU. Nº 5.457.191, referida a nucleobases modificadas basadas en los sistema de anillos de 3-deazapurina y métodos de síntesis de los mismos; la patente de EE. UU. Nº 5.459.255, referida a nucleobases modificadas basadas en purinas N-2 sustituidas; la patente de EE. UU. Nº 5.521.302, referida a procesos de preparación de oligonucleótidos que tienen enlaces de fósforo quiral; la patente de EE. UU. Nº 5.539.082, referida a ácidos nucleicos peptídicos; la patente de EE. UU. Nº 5.554.746, referida a oligonucleótidos que tienen esqueletos de β -lactama; la patente de EE. UU. Nº 5.571.902, referida a métodos y materiales para la síntesis de oligonucleótidos; la patente de EE. UU. Nº 5.578.718, referida a nucleósidos que tienen grupos alquiltio, en donde dichos grupos se pueden usar como conectores a otros restos unidos a cualquiera de una variedad de posiciones del nucleósido; las patentes de EE. UU. Nº 5.587.361 y 5.599.797, referidas a oligonucleótidos que tienen enlaces fosfortioato de alta pureza quiral; la patente de EE. UU. Nº 5.506.351, referida a procesos para la preparación de 2'-O-alquilguanosina y compuestos relacionados, que incluyen compuestos de 2,6-diaminopurina; la patente de EE. UU. Nº 5.587.469, referida a oligonucleótidos que tienen purinas sustituidas en N-2; la patente de EE. UU. Nº 5.587.470, referida a oligonucleótidos que tienen 3-deazapurinas; la patente de EE. UU. Nº 5.223.168, y la patente de EE. UU. Nº 5.608.046, ambas referidas a análogos de nucleósidos de 4'-desmetilo conjugados; las patentes de EE. UU. Nº 5.602.240 y 5.610.289, referidas a análogos de oligonucleótidos modificados en el esqueleto; las patentes de EE. UU. Nº 6.262.241 y 5.459.255, referidas a, entre otras cosas, métodos de síntesis de oligonucleótidos de 2'-flúor.

En el ARNbc conjugado con ligando y la molécula de ligando que lleva nucleósidos unidos específicos de secuencia, los oligonucleótidos y oligonucleósidos se pueden ensamblar en un sintetizador de ADN adecuado que utiliza precursores convencionales de nucleótido o nucleósido, o precursores de conjugados de nucleótidos o nucleósidos que ya poseen el resto de enlace, precursores de ligando-nucleótido o nucleósido-conjugado que ya poseen la molécula de ligando, o elementos estructurales que llevan ligando distinto de nucleósido.

Cuando se usan precursores de nucleótido-conjugado que ya poseen un resto de enlace, normalmente se completa la síntesis de los nucleósidos unidos específicos de secuencia, y entonces se hace reaccionar la molécula de ligando con el resto de enlace para formar el oligonucleótido conjugado con ligando. Se han descrito previamente conjugados de oligonucleótido que llevan una variedad de moléculas tales como esteroides, vitaminas, lípidos y moléculas indicadoras (véase Manoharan et al., solicitud PCT WO 93/07883). Los oligonucleótidos o nucleósidos asociados se pueden sintetizar por un sintetizador automatizado usando fosforamiditos derivados de conjugados de ligando-nucleósido, además de los fosforamiditos convencionales y fosforamiditos no convencionales que están comercialmente disponibles y se usan rutinariamente en la síntesis de oligonucleótidos.

La incorporación de un grupo 2'-O-metilo, 2'-O-etilo, 2'-O-propilo, 2'-O-alilo, 2'-O-aminoalquilo o 2'-desoxi-2'-flúor en nucleósidos de un oligonucleótido confiere propiedades potenciadas de hibridación al oligonucleótido. Además, los oligonucleótidos que contienen esqueletos de fosfortioato tienen estabilidad potenciada a las nucleasas. Así, los nucleósidos unidos funcionalizados de la invención pueden ser incrementados para incluir cualquiera o ambos de un esqueleto de fosfortioato o un grupo 2'-O-metilo, 2'-O-etilo, 2'-O-propilo, 2'-O-aminoalquilo, 2'-O-alilo o 2'-desoxi-2'-flúor.

En algunos casos, se preparan secuencias de nucleósidos funcionalizadas de la invención que poseen un grupo amino en el extremo 5' usando un sintetizador de ADN, y luego haciendo reaccionar con un derivado de éster activo de un ligando seleccionado. Los derivados de éster activo se conocen bien por los expertos en la técnica. Los ésteres activos representativos incluyen ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres tetrafluorofenólicos, ésteres pentafluorofenólicos y ésteres pentaclorofenólicos. La reacción del grupo amino y el éster activo produce un oligonucleótido en el que el ligando seleccionado se une a la posición 5' mediante un grupo de enlace. El grupo amino en el extremo 5' se puede preparar utilizando un 5'-Amino-Modifier C6. En un caso preferido, se pueden conjugar moléculas de ligando con oligonucleótidos en la posición 5' usando un fosforamidito de ligando-nucleósido

en donde el ligando se une al grupo 5'-hidroxi directamente o indirectamente mediante un conector. Dichos fosforamiditos de ligando-nucleósido normalmente se usan al final de un procedimiento de síntesis automática para proporcionar un oligonucleótido conjugado con ligando que lleva el ligando en el extremo 5'.

5 En un caso de los métodos, la preparación de oligonucleótidos conjugados con ligando comienza con la selección de moléculas precursoras apropiadas sobre las que se construye la molécula de ligando. Normalmente, el precursor es un derivado apropiadamente protegido de los nucleósidos comúnmente usados. Por ejemplo, los precursores sintéticos para la síntesis de los oligonucleótidos conjugados con ligando de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, 2'-aminoalcoxi-5'-ODMT-nucleósidos, 2'-6-aminoalquilamino-5'-ODMT-nucleósidos, 5'-6-aminoalcoxi-2'-desoxi-nucleósidos, 5'-6-aminoalcoxi-2'-protected-nucleósidos, 3'-6-aminoalcoxi-5'-ODMT-nucleósidos y 3'-aminoalquilamino-5'-ODMT-nucleósidos que se pueden proteger en la porción de nucleobases de la molécula. Los expertos habituales en la técnica conocen los métodos para la síntesis de dichos precursores de nucleósido protegidos unidos a amino.

15 En muchos casos, se usan grupos protectores durante la preparación de los compuestos de la invención. Como se usa en el presente documento, el término "protegido" significa que el resto indicado tiene un grupo protector unido al mismo. En algunos casos, los compuestos contienen uno o más grupos protectores. Se puede emplear una amplia variedad de grupos protectores en los métodos. En general, los grupos protectores convierten las funcionalidades químicas en inertes para condiciones de reacción específicas, y se pueden unir a y retirar de dichas funcionalidades en una molécula sin dañar sustancialmente el resto de la molécula.

20 Se desvelan grupos protectores de hidroxilo representativos, por ejemplo, por Beaucage et al. (Tetrahedron, 1992, 48:2223-2311). Se desvelan grupos protectores de hidroxilo adicionales, así como otros grupos protectores representativos, en Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Capítulo 2, 2ª ed., John Wiley & Sons, New York, 1991, y Oligonucleotides And Analogues A Practical Approach, Ekstein, F. Ed., IRL Press, N.Y., 1991.

25 Los ejemplos de grupos protectores de hidroxilo incluyen, pero no se limitan a, t-butilo, t-butoximetilo, metoximetilo, tetrahidropiraniolo, 1-etoxietilo, 1-(2-cloroetoxi)etilo, 2-trimetilsililetilo, p-clorofenilo, 2,4-dinitrofenilo, bencilo, 2,6-diclorobencilo, difenilmetilo, p,p'-dinitrobenzohidrido, p-nitrobencilo, trifenilmetilo, trimetilsililo, trietilsililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, trifenilsililo, benzoilformiato, acetato, cloroacetato, tricloroacetato, trifluoroacetato, pivaloato, benzoato, p-fenilbenzoato, carbonato de 9-fluorenilmetilo, mesilato y tosilato.

30 Los grupos protectores de amino estables a tratamiento ácido se retiran selectivamente con tratamiento con base, y se usan para preparar grupos amino reactivos selectivamente disponibles para la sustitución. Los ejemplos de dichos grupos son Fmoc (E. Atherton y R. C. Sheppard en The Peptides, S. Udenfriend, J. Meienhofer, Eds., Academic Press, Orlando, 1987, volumen 9, p.1) y diversos carbamatos de sulfoniletilo sustituidos ejemplificados por el grupo Nsc (Samukov et al., Tetrahedron Lett., 1994, 35:7821; Verhart y Tesser, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 1987, 107:621).

35 Los grupos protectores de amino adicionales incluyen, pero no se limitan a, grupos protectores de carbamato, tales como 2-trimetilsililetoxicarbonilo (Teoc), 1-metil-1-(4-bifenilil)etoxicarbonilo (Bpoc), t-butoxicarbonilo (BOC), aliloxicarbonilo (Alloc), 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) y benciloxicarbonilo (Cbz); grupos protectores de amida, tales como formilo, acetilo, trihaloacetilo, benzoilo y nitrofenilacetilo; grupos protectores de sulfonamida, tales como 2-nitrobenzenosulfonilo; y grupos protectores de imina e imida cíclica, tales como ftalimido y ditiassuccinóilo. Los equivalentes de estos grupos protectores de amino también están englobados por los compuestos y métodos de la presente divulgación.

40 Muchos soportes sólidos están comercialmente disponibles y un experto habitual en la técnica puede seleccionar fácilmente un soporte sólido que se va a usar en las etapas de síntesis en fase sólida. En ciertos casos, se usa un soporte universal. Un soporte universal permite la preparación de oligonucleótidos que tienen nucleótidos poco usuales o modificados localizados en el extremo 3' del oligonucleótido. Universal Support 500 y Universal Support II son soportes universales que están comercialmente disponibles de Glen Research, 22825 Davis Drive, Sterling, Virginia. Para más detalles sobre los soportes universales, véase Scott et al., Innovations and Perspectives in solid-phase Synthesis, 3º Simposio Internacional, 1994, Ed. Roger Epton, Mayflower Worldwide, 115-124; Azhayev, A.V. Tetrahedron 1999, 55, 787-800; y Azhayev and Antopolsky Tetrahedron 2001, 57, 4977-4986. Además, se ha informado que el oligonucleótido se puede escindir del soporte universal en condiciones de reacción más suaves cuando el oligonucleótido está unido al soporte sólido mediante un grupo syn-1,2-acetoxifosfato que se somete más fácilmente a hidrólisis básica. Véase Guzaev, A. I.; Manoharan, M. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 2380.

45 Los nucleósidos se unen por enlaces internucleosídicos covalentes que contienen fósforo o que no contienen fósforo. A efectos de identificación, dichos nucleósidos conjugados se pueden caracterizar como nucleósidos que llevan ligando o conjugados de ligando-nucleósido. Los nucleósidos unidos que tienen un ligando de aralquilo conjugado con un nucleósido dentro de su secuencia demostrarán actividad de ARNbc potenciada cuando se comparen con compuestos de ARNbc unidos que no están conjugados.

55 Los oligonucleótidos conjugados con ligando de aralquilo de la presente invención también incluyen conjugados de oligonucleótidos y nucleósidos unidos en donde el ligando se une directamente al nucleósido o nucleótido sin el

mediador de un grupo conector. El ligando se puede unir preferentemente, mediante grupos de enlace, en un grupo carboxilo, amino u oxo del ligando. Los grupos de enlace típicos pueden ser grupos éster, amida o carbamato.

Los ejemplos específicos de oligonucleótidos modificados preferidos previstos para su uso en los oligonucleótidos conjugados con ligando incluyen oligonucleótidos que contienen esqueletos modificados o enlaces internucleosídicos no naturales. Como se define aquí, los oligonucleótidos que tienen esqueletos modificados o enlaces internucleosídicos incluyen los que retienen un átomo de fósforo en el esqueleto y los que no tienen un átomo de fósforo en el esqueleto. Para los fines de la invención, también se puede considerar que los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su esqueleto inter-azúcar son oligonucleósidos.

Se describen a continuación modificaciones químicas específicas de oligonucleótidos. No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado sean uniformemente modificadas. En cambio, se puede incorporar más de una modificación en un único compuesto de ARNbc o incluso en un único nucleótido del mismo.

Los enlaces internucleosídicos o esqueletos modificados preferidos incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros alquilo que incluyen fosfonatos de 3'-alquilo y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos unidos en 2'-5' de estos, y los que tiene polaridad invertida en donde los pares adjuntos de unidades de nucleósidos se unen 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También están incluidas diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Las patentes de Estados Unidos representativas referentes a la preparación de los anteriores enlaces que contienen átomos de fósforo incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. Nº 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.625.050; y 5.697.248.

Los enlaces internucleosídicos o esqueletos modificados preferidos que no incluyen un átomo de fósforo en su interior (es decir, oligonucleósidos) tienen esqueletos que se forman por enlaces inter-azúcar de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces inter-azúcar de heteroátomos mixtos y de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces inter-azúcar heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen los que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilen-formacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilnimino y metilhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes componentes mixtas de N, O, S y CH₂.

Las patentes de Estados Unidos representativas referentes a la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. Nº 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

En otros miméticos de oligonucleótidos preferidos, tanto el enlace de azúcar como internucleosídico, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleósido se sustituyen por grupos novedosos. Las unidades de nucleobase se mantienen para la hibridación con un compuesto diana apropiado de ácido nucleico. Dicho oligonucleótido, un mimético de oligonucleótido, que se ha mostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se denomina un ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se sustituye por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases son retenidas y se unen directa o indirectamente a átomos de la porción de amida del esqueleto. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de compuestos de PNA incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. Nº 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Se puede encontrar enseñanza adicional de los compuestos de PNA en Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497.

En algunos casos, se emplean oligonucleótidos con enlaces fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos de heteroátomo, y en particular --CH₂--NH--O--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--O--CH₂-- [conocido como un esqueleto de metileno (metilimino) o MMI], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂--, y --O--N(CH₃)--CH₂--CH₂-- [en donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como --O--P--O--CH₂--] de la patente de EE. UU. Nº 5.489.677 anteriormente referenciada, y los esqueletos de amida de la patente de EE. UU. Nº 5.602.240 anteriormente referenciada. También se prefieren oligonucleótidos que tienen estructuras de esqueleto de morfolino de la patente de EE. UU. Nº 5.034.506 anteriormente referenciada.

Los oligonucleótidos empleados en los oligonucleótidos conjugados con ligando de la presente invención pueden comprender adicionalmente o alternativamente modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominada en la materia simplemente como "base"). Como se usa en el presente documento, nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales, tales

como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo, y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propiniluracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halógeno, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas 8-sustituidas y guaninas, 5-halógeno, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos 5-sustituidos y citosinas, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

Las nucleobases adicionales incluyen las desveladas en la patente de EE. UU. Nº 3.687.808, las desveladas en Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, las desveladas por English et al., *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613, y las desveladas por Sanghvi, Y. S., Capítulo 15, *Antisense Research and Applications*, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993. Ciertas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los oligonucleótidos de la invención. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C (idem, páginas 276-278) y son sustituciones de bases actualmente preferidas, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de 2'-metoxietilazúcar.

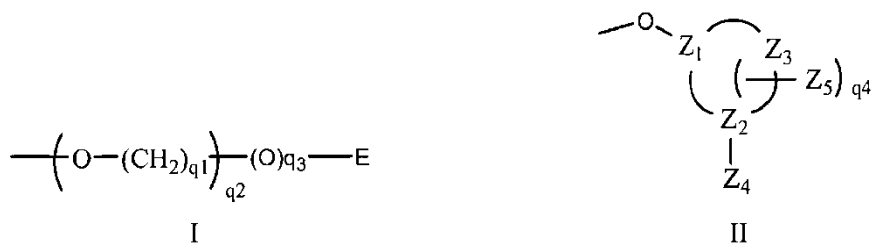
Las patentes de Estados Unidos representativas referentes a la preparación de ciertas de las nucleobases modificadas anteriormente indicadas, así como otras nucleobases modificadas, incluyen, pero no se limitan a, la patente de EE. UU. Nº 3.687.808 anteriormente indicada, así como las patentes de EE. UU. Nº 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121. 5.596.091; 5.614.617; 5.681.941; y 5.808.027.

En ciertos casos, los oligonucleótidos empleados en los oligonucleótidos conjugados con ligando de la presente invención pueden comprender adicionalmente o alternativamente uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo, O-, S- o N-alqueno, u O-, S- o N-alquino, en donde el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C₁ a C₁₀ o alqueno y alquino C₂ a C₁₀ sustituidos o sin sustituir. Particularmente se prefieren O[(CH₂)_n]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m son desde 1 hasta aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo que escinde ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi [2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE] (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486), es decir, un grupo alcóxalcoxi. Una modificación adicional preferida incluye 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en la patente de EE. UU. Nº 6.127.533, presentada el 30 de enero de 1998, cuyo contenido se incorpora como referencia.

Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O--CH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-flúor (2'-F). También se pueden hacer modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleósido del extremo 3' o en los oligonucleótidos unidos 2'-5'.

Como se usa en el presente documento, el término "grupo sustituyente de azúcar" o "grupo 2'-sustituyente" incluye grupos unidos a la posición 2' del resto de ribofuranosilo con o sin un átomo de oxígeno. Los grupos sustituyentes de azúcar incluyen, pero no se limitan a, flúor, O-alquilo, O-alquilamino, O-alquilalcoxi, O-alquilamino protegido, O-alquilaminoalquilo, O-alquilimidazol y poliéteres de fórmula (O-alquilo)_m, en donde m es 1 a aproximadamente 10. Se prefieren entre estos poliéteres polietilenglicoles (PEGs) lineales y cíclicos, y grupos que contienen (PEG), tales como éteres corona y los que se desvelan por Ouchi et al. (*Drug Design and Discovery* 1992, 9:93); Ravasio et al. (*J. Org. Chem.* 1991, 56:4329); y Delgado et al. (*Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 1992, 9:249). Se desvelan modificaciones de azúcar adicionales por Cook (*Anti-Cancer Drug Design*, 1991, 6:585-607). Se describe la sustitución de flúor, O-alquilo, O-alquilamino, O-alquilimidazol, O-alquilaminoalquilo y alquilamino en la patente de EE. UU. 6.166.197, titulada "Oligomeric Compounds having Pyrimidine Nucleotide(s) with 2' and 5' Substitutions".

Los grupos sustituyentes de azúcar adicionales aceptados por la presente invención incluyen grupos 2'-SR y 2'-NR₂, en donde cada R es, independientemente, hidrógeno, un grupo protector o alquilo, alqueno o alquino sustituido o sin sustituir. Los nucleósidos de 2'-SR se desvelan en la patente de EE. UU. Nº 5.670.633. La incorporación de sintones de monómeros de 2'-SR se desvela por Hamm et al. (*J. Org. Chem.*, 1997, 62:3415-3420). Los nucleósidos de 2'-NR se desvelan por Goettingen, M., *J. Org. Chem.*, 1996, 61, 6273-6281; y Polushin et al., *Tetrahedron Lett.*, 1996, 37, 3227-3230. Los sustituyentes en 2' de grupos representativos adicionales incluyen los que tienen una de la fórmula I o II:



en donde

E es alquilo C₁-C₁₀, N(Q₃)(Q₄) o N=C (Q₃)(Q₄); cada Q₃ y Q₄ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₁₀, dialquilaminoalquilo, un grupo protector de nitrógeno, un grupo conjugado unido o no unido, un conector a un soporte sólido; o Q₃ y Q₄, juntos, forman un grupo protector de nitrógeno o una estructura de anillo que opcionalmente incluye al menos un heteroátomo adicional seleccionado de N y O;

q₁ es un número entero desde 1 hasta 10;

q₂ es un número entero desde 1 hasta 10;

q₃ es 0 o 1;

q₄ es 0, 1 o 2;

cada Z₁, Z₂ y Z₃ es, independientemente, cicloalquilo C₄-C₇, arilo C₅-C₁₄ o heterociclilo C₃-C₁₅, en donde el heteroátomo en dicho grupo heterociclilo se selecciona de oxígeno, nitrógeno y azufre;

Z₄ es OM₁, SM₁, o N(M₁)₂; cada M₁ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₈, haloalquilo C₁-C₈, C(=NH)N(H)M₂, C(=O)N(H)M₂ u OC(=O)N(H)M₂; M₂ es H o alquilo C₁-C₈; y

Z₅ es alquilo C₁-C₁₀, haloalquilo C₁-C₁₀, alqueno C₂-C₁₀, alquino C₂-C₁₀, arilo C₆-C₁₄, N(Q₃)(Q₄), OQ₃, halógeno, SQ₃ o CN.

Se desvelan grupos sustituyentes de 2'-O-azúcar representativos de fórmula I en la patente de EE. UU. N° 6.172.209, titulada "2'-Oxyethoxy Oligonucleotides", incorporada por este documento como referencia en su totalidad. Los grupos sustituyentes de 2'-O-azúcar cíclicos representativos de la fórmula II se desvelan en la patente de EE. UU. 6.271.358, titulada "RNA Targeted 2'-Modified Oligonucleotides that are Conformationally Preorganized" incorporada por este documento como referencia en su totalidad.

Los azúcares que tienen O-sustituciones en el anillo de ribosilo también son aceptados por la presente invención. Las sustituciones representativas para el anillo O incluyen, pero no se limitan a, S, CH₂, CHF y CF₂. Véanse, por ejemplo, Secrist et al., Abstract 21, Program & Abstracts, Tenth International Roundtable, Nucleosides, Nucleotides and their Biological Applications, Park City, Utah, Sep. 16-20, 1992.

Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar, tales como restos de ciclobutilo, en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las patentes de Estados Unidos representativas referentes a la preparación de dichos azúcares modificados incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. N° 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.0531 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; 5.700.920; y 5.859.221.

También se pueden preparar modificaciones adicionales en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal de 3'. Por ejemplo, una modificación adicional de los oligonucleótidos conjugados con ligando de la presente invención implica unir químicamente al oligonucleótido uno o más restos de no ligando adicionales o conjugados que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Dichos restos incluyen, pero no se limitan a, restos de lípido, tales como un resto de colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553), ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilitol (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765), un tiocolesterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533), una cadena alifática, por ejemplo, restos de dodecanodiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 111; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49), un fosfolípido, por ejemplo, dihexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969), o ácido adamantanoacético (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651), un resto de palmitilo (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229), o un resto de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923). Se han enumerado anteriormente las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos conjugados de oligonucleótido. Los protocolos típicos de conjugación implican la síntesis de oligonucleótidos que llevan un conector de amino en una o más posiciones de la

secuencia. El grupo amino se hace reaccionar entonces con la molécula que se conjuga usando reactivos de acoplamiento o activación apropiados. La reacción de conjugación se puede realizar tanto con el oligonucleótido todavía unido al soporte sólido, como tras la escisión del oligonucleótido en fase de disolución. La purificación del oligonucleótido conjugado por HPLC normalmente proporciona el conjugado puro.

- 5 Las patentes de Estados Unidos representativas referentes a la preparación de dichos conjugados de oligonucleótido incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. N^o 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 10 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241. 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928; y 5.688.941.

- La presente divulgación también incluye composiciones que emplean oligonucleótidos que son sustancialmente quiralmente puros con respecto a las posiciones particulares dentro de los oligonucleótidos. Los ejemplos de oligonucleótidos sustancialmente quiralmente puros incluyen, pero no se limitan a, los que tienen enlaces fosforotioato que son al menos 75 % de Sp o Rp (Cook et al., patente de EE. UU. N^o 5.587.361) y los que tienen alquilfosfonato sustancialmente quiralmente puro (Sp o Rp), enlaces fosforamidoato o fosfotriéster (Cook, patentes de EE. UU. N^o 5.212.295 y 5.521.302).
- 15

- Alternativamente, la molécula que se conjuga se puede convertir en un elemento estructural, tal como un fosforamidoato, mediante un grupo alcohol presente en la molécula o por unión de un conector que lleva un grupo alcohol que se puede fosfilitar.
- 20

- Y, lo que es más importante, se puede usar cada uno de estos enfoques para la síntesis de oligonucleótidos conjugados con ligando. Se pueden acoplar oligonucleótidos amino-unidos directamente con ligando mediante el uso de reactivos de acoplamiento o tras la activación del ligando como un éster de NHS o de pentafluorofenolato. Se pueden sintetizar fosforamidoatos de ligando mediante la unión de un conector de aminohexanol a uno de los grupos carboxilo, seguido por fosfilitación de la funcionalidad alcohol terminal. También se pueden utilizar otros conectores, tales como cisteamina, para la conjugación con un conector de cloroacetilo presente sobre un oligonucleótido sintetizado.
- 25

III. Método de preparación de ARNbc modificados que tienen estabilidad mejorada

- 30 La invención se refiere además a un método de preparación de un ARNbc que tiene estabilidad en suero mejorada y, por tanto, biodisponibilidad mejorada. El ARNbc modificado de la invención se puede aislar de células, producidas a partir de un molde de ADN, o se puede sintetizar químicamente usando métodos conocidos en la técnica anterior antes de la alteración usando los métodos.

- En un caso, el ARNbc modificado se sintetiza químicamente. El método comprende sintetizar una cadena complementaria de ARN y una cadena de ARN sentido, en donde al menos una de las cadenas de ARN comprende un extremo protuberante monocatenario y puede comprender además un nucleótido sustituido, y mezclar las dos cadenas de ARN para formar un ARNbc. Las secuencias de nucleótidos de las cadenas individuales de ARN se seleccionan tal que una de las dos cadenas tenga una región de complementariedad con el gen diana a inhibir (es decir, la cadena complementaria de ARN comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región de un transcrito de ARNm que se forma durante la expresión del gen diana, o sus productos de procesamiento, o una región de un virus de cadena (+)). Entonces se modifica la secuencia de nucleótidos para estabilidad mejorada reemplazando o añadiendo nucleótido(s) según la presente invención. Por tanto, la(s) cadena(s) de ARN se puede(n) modificar químicamente adicionalmente como se describe en el presente documento. La etapa de sintetizar la cadena de ARN implica preferentemente una síntesis en fase sólida, en donde los nucleótidos individuales se unen extremo con extremo mediante la formación de enlaces fosfodiéster 3'-5' internucleotídicos en ciclos de síntesis consecutivos.
- 35
- 40
- 45

- En general, los oligonucleótidos se pueden sintetizar usando protocolos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describen en Caruthers, et al., *Methods in Enzymology* (1992) 211:3-19; Thompson, et al., publicación internacional PCT WO 99/54459; Wincott, et al., *Nucl. Acids Res.* (1995) 23:2677-2684; Wincott, et al., *Methods Mol. Bio.*, (1997) 74:59; Brennan, et al., *Biotechnol. Bioeng.* (1998) 61:33-45; y Brennan, patente de EE. UU. N^o 6.001.311. En general, la síntesis de oligonucleótidos implica grupos de protección y acoplamiento convencionales de ácidos nucleicos, tales como dimetoxitritilo en el extremo 5', y fosforamidoatos en el extremo 3'. En un ejemplo no limitante, se realizan síntesis a pequeña escala en un sintetizador de ARN Expedite 8909 comercializado por Applied Biosystems, Inc. (Weiterstadt, Alemania), usando fosforamidoatos de ribonucleósido comercializados por ChemGenes Corporation (Ashland Technology Center, 200 Homer Avenue, Ashland, MA 01721, EE. UU.). Alternativamente, se pueden realizar síntesis en un sintetizador de placa de 96 pocillos, tal como el instrumento producido por Protogene (Palo Alto, Calif., EE. UU.), o por métodos tales como los descritos en Usman, et al., *J. Am. Chem. Soc.* (1987) 109:7845; Scaringe, et al., *Nucl. Acids Res.* (1990) 18:5433; Wincott, et al., *Nucl. Acids Res.* (1990) 23:2677-2684; y Wincott, et al., *Methods Mol. Bio.* (1997) 74:59.
- 50
- 55

Las moléculas de ácidos nucleicos se pueden sintetizar por separado y unirse juntas posteriormente a la síntesis, por ejemplo, por ligación (Moore, et al., Science (1992) 256:9923; Draper, et al., publicación internacional PCT N° WO 93/23569; Shabarova, et al., Nucl. Acids Res. (1991) 19:4247; Bellon, et al., Nucleosides & Nucleotides (1997) 16:951; y Bellon, et al., Bioconjugate Chem. (1997) 8:204; o por hibridación tras la síntesis y/o desprotección. Las moléculas de ácidos nucleicos se pueden purificar por electroforesis en gel usando métodos convencionales o se pueden purificar por cromatografía líquida de alta presión (HPLC; véase Wincott et al., arriba, cuya totalidad se incorpora por este documento en el presente documento como referencia) y resuspender en agua.

En un caso, el método de preparación de ARNbc modificado comprende aumentar el número de pares de bases G-C en el ARNbc, particularmente en los pares de bases de nucleótidos terminales o en los cuatro pares de bases de nucleótidos terminales consecutivos, para aumentar la interacción del enlace de hidrógeno entre las dos cadenas de ARN. En este caso, se sustituyen nucleótidos no mutantes que contienen bases A y U con nucleótidos que contienen bases G y C durante el proceso sintético. Alternativamente o además, se pueden insertar nucleótidos adicionales que contienen bases G y C durante el proceso sintético para producir pares de bases G-C apropiadamente situados, es decir, situados para formar un par de bases de nucleótidos G-C terminal o para producir pares de bases G-C dentro de los cuatro nucleótidos terminales consecutivos de la estructura de dúplex.

En aún otro caso, el método comprende sustituir o añadir un nucleótido que contiene una base de purina en el primer nucleótido sin aparear inmediatamente adyacente a los pares de bases terminales de la estructura de dúplex. En este caso, se sustituye un nucleótido que comprende una base de purina con un nucleótido que contiene una base de pirimidina, o se inserta el nucleótido de purina en la secuencia adyacente al par de bases terminal.

En otro caso, al menos un nucleótido del ARNbc se modifica químicamente para introducir restos químicos u otras características estructurales que se diferencian de las observadas en ARN que existe de forma natural. Dichas modificaciones pueden afectar la capacidad de una base para el enlace de hidrógeno con su base complementaria normal, e incluyen, sin limitación, derivados heterocíclicos, análogos de nucleótidos, modificaciones covalentes tales como la introducción de nucleótidos modificados, o la inclusión de grupos laterales que no se encuentran naturalmente en moléculas de ARN. Se conocen en la técnica modificaciones a modo de ejemplo y los métodos para introducir dichas modificaciones en ARNbc, que incluyen la modificación y los métodos tratados en la Sección II anterior y las referencias citadas en su interior.

En otro caso, se aísla ARNbc de células o se produce a partir de un molde de ADN antes de la alteración usando métodos conocidos en la técnica. En estos casos alternativos, la estabilidad del ARNbc se puede aumentar antes de uso por cualquiera de varias técnicas bien conocidas, que incluyen las tratadas anteriormente.

IV. Composiciones farmacéuticas que comprenden ARNbc

Se describe una composición farmacéutica que comprende un ARNbc modificado, como se describe en las secciones precedentes, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, como se describe a continuación. La composición farmacéutica que comprende el ARNbc modificado es útil para tratar una enfermedad provocada por la expresión de un gen diana. En este aspecto, el ARNbc de la invención se formula como se describe a continuación. La composición farmacéutica se administra en una dosificación suficiente para inhibir la expresión del gen diana.

El experto apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación y el momento preciso requerido para tratar eficazmente un sujeto, que incluyen, pero no se limitan a, la gravedad de la infección o enfermedad, tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición puede incluir un único tratamiento o una serie de tratamientos. Las estimaciones de dosificaciones eficaces y semividas *in vivo* para el ARNbc individual englobado por la invención se pueden hacer usando metodologías convencionales o basándose en pruebas *in vivo* usando un modelo animal apropiado, como se describe en cualquier parte en el presente documento.

Los avances en la genética de ratón han generado varios modelos de ratón para el estudio de diversas enfermedades humanas. Por ejemplo, se pueden encontrar repositorios de ratón en The Jackson Laboratory, Charles River Laboratories, Taconic, Harlan, Mutant Mouse Regional Resource Centers (MMRRC) National Network y en European Mouse Mutant Archive. Dichos modelos se pueden usar para las pruebas *in vivo* de ARNbc, así como para determinar una dosis terapéuticamente eficaz.

Se puede determinar la toxicidad y eficacia terapéutica del ARNbc por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación DL50/DE50. Se prefieren ADNbc que presentan altos índices terapéuticos.

Se pueden usar los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de las composiciones de la invención se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier ADNbc usado en el método de la invención, la dosis

terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante del ADNbc o, cuando convenga, del producto de polipéptido de una secuencia diana (por ejemplo, que alcanza una concentración reducida del polipéptido) que incluye la CI_{50} (es decir, la concentración del ADNbc de prueba que logra una inhibición al 50 % de los síntomas) como se determina en cultivo celular. Dicha información se puede usar para determinar con más exactitud dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

Además de su administración individualmente o como una pluralidad, como se trata anteriormente, el ARNbc útil según la invención se puede administrar en combinación con otros agentes conocidos eficaces en el tratamiento de infecciones virales y enfermedades. En cualquier caso, el médico que administra puede ajustar la cantidad y el momento preciso de la administración de ARNbc basándose en los resultados observados usando medidas estándar de eficacia conocidas en la técnica o descritas en el presente documento.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante cualquier medio conocido en la técnica que incluye, pero no se limita a, vías orales o parenterales, que incluyen administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, transdérmica, a las vías respiratorias (aerosol), rectal, vaginal y tópica (incluyendo bucal y sublingual).

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos descritos anteriormente, formuladas junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables (aditivos) y/o diluyentes. Como se describe en detalle a continuación, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser especialmente formuladas para administración en forma sólida o líquida, que incluyen las adaptadas para lo siguiente: (1) administración por vía oral, por ejemplo, rociados (disoluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos, por ejemplo, los dirigidos para absorción bucal, sublingual y sistémica, bolos, polvos, gránulos, pastas para administración a la lengua; (2) administración parenteral, por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como, por ejemplo, una disolución o suspensión estéril, o formulación de liberación sostenida; (3) administración tópica, por ejemplo, como una crema, pomada, o un parche de liberación controlada o espray aplicado a la piel; (4) por vía intravaginal o vía intrarrectal, por ejemplo, como un pesario, crema o espuma; (5) por vía sublingual; (6) por vía ocular; (7) por vía transdérmica; o (8) por vía nasal.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento significa que cantidad de un compuesto, material, o composición que comprende un compuesto de la presente invención que es eficaz para producir cierto efecto terapéutico deseado en al menos una subpoblación de células en un animal a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que son, dentro del alcance de criterio médico sensato, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, adyuvante de fabricación (por ejemplo, lubricante, talco magnesio, calcio o estearato de cinc, o ácido esteárico), o material de encapsulación disolvente, implicado en llevar o transportar el compuesto objeto de un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano, o porción del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros componentes de la formulación y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de alazor, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes de tamponamiento, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua sin pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) disolución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) disolución de pH tamponado; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y (22) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Como se explica anteriormente, los presentes compuestos pueden contener un grupo funcional básico, tal como amino o alquilamino, y, así, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con ácidos farmacéuticamente aceptables. El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere, a este respecto, a las sales de adición de ácido relativamente no tóxicas, inorgánicas y orgánicas, de compuestos de la presente invención. Estas sales se pueden preparar *in situ* en el proceso de vehículo de administración o el proceso de fabricación de la forma farmacéutica, o haciendo reaccionar por separado un compuesto purificado de la invención en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, y aislando la sal así formada durante la

posterior purificación. Las sales representativas incluyen las sales de bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato, y similares (véase, por ejemplo, Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19)

- 5 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos objeto incluyen las sales no tóxicas convencionales o sales de amonio cuaternario de los compuestos, por ejemplo, de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Por ejemplo, dichas sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhidrato, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico, y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, palmítico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etano disulfónico, oxálico, isetiónico, y similares.

10 En otros casos, los compuestos pueden contener uno o más grupos funcionales ácidos y, así, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. El término "sales farmacéuticamente aceptables" en estos casos se refiere a las sales de adición de base relativamente no tóxicas, inorgánicas y orgánicas, de los compuestos de la presente invención. Estas sales se pueden asimismo preparar *in situ* en el vehículo de administración o el proceso de fabricación de la forma farmacéutica, o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de ácido libre con una base adecuada, tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable, con amoníaco, o con una amina primaria, secundaria o terciaria orgánica farmacéuticamente aceptable. Las sales alcalinas o alcalinotérricas representativas incluyen las sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio, y similares. Las aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de base incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina y similares (véase, por ejemplo, Berge et al., arriba).

15 También pueden estar presentes en las composiciones agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como los agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes.

20 Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

25 Las formulaciones de la presente invención incluyen las adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar por cualquier método bien conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una forma farmacéutica única variará dependiendo del hospedador que está tratándose, el modo particular de administración. La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una forma farmacéutica única, en general, será aquella cantidad del compuesto que produzca un efecto terapéutico. En general, fue del uno por ciento, esta cantidad variará desde aproximadamente 0,1 por ciento hasta aproximadamente noventa y nueve por ciento de principio activo, preferentemente desde aproximadamente 5 por ciento hasta aproximadamente 70 por ciento, lo más preferentemente desde aproximadamente 10 por ciento hasta aproximadamente 30 por ciento.

30 En ciertos casos, una formulación de la presente invención comprende un excipiente seleccionado del grupo que consiste en ciclodextrinas, celulosas, liposomas, agentes formadores de micelas, por ejemplo, ácidos biliares, y vehículos poliméricos, por ejemplo, poliésteres y polianhídridos; y un compuesto de la presente invención. En ciertos casos, una formulación anteriormente mencionada convierte en biodisponible por vía oral un compuesto.

35 Los métodos de preparación de estas formulaciones o composiciones incluyen la etapa de asociar un compuesto de la presente invención con el vehículo y, opcionalmente, uno o más componentes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente un compuesto de la presente invención con vehículos líquidos, o vehículos sólidos finamente dividido, o ambos, y luego, si fuera necesario, moldeando el producto.

40 Las formulaciones de la invención adecuadas para administración por vía oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto), polvos, gránulos, o como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica) y/o como enjuagues bucales y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un compuesto de la presente invención como un principio activo. Un compuesto de la presente invención también se puede administrar como un bolo, electuario o pasta.

45 En formas farmacéuticas sólidas de la invención para administración por vía oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, comprimidos recubiertos de azúcar, polvos, gránulos, trociscos y similares), el principio activo se mezcla con uno o

más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o sustancias de relleno, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato sódico; (5) agentes retardantes de la disolución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario y tensioactivos, tales como poloxámero y laurilsulfato de sodio; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerol y tensioactivos no iónicos; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio, estearato de cinc, estearato de sodio, ácido esteárico, y mezclas de los mismos; (10) agentes colorantes; y (11) agentes de liberación controlada tales como crospovidona o etilcelulosa. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes de tamponamiento. También se puede emplear composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina de cubierta blanda y dura usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Se puede preparar un comprimido por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes accesorios. Se pueden preparar comprimidos por compresión usando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón o carboximetilcelulosa de sodio reticulada), agente tensioactivo o dispersante. Se pueden preparar comprimidos moldeados moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto humedecido en polvo con un diluyente líquido inerte.

Los comprimidos, y otras formas farmacéuticas sólidas de las composiciones farmacéuticas, tales como comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, píldoras y gránulos, se ranuran o preparan opcionalmente con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. También se pueden formular de manera que se proporcione liberación lenta o controlada del principio activo en su interior usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Se pueden formular para liberación rápida, por ejemplo, liofilizadas. Se pueden esterilizar por, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de uso. Estas composiciones también pueden contener opcionalmente opacificantes y pueden ser de una composición que liberan el (los) principio(s) activo(s) solo(s), o preferencialmente, en una cierta porción del tubo gastrointestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Los ejemplos de incorporar composiciones que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras. El principio activo también puede estar forma en microencapsulada, si es apropiada, con uno o más de los excipientes anteriormente descritos.

Las cápsulas para uso oral incluyen cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido, y cápsulas de gelatina blanda en donde los principios activos se mezclan con agua o un aceite tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las formas farmacéuticas líquidas para administración por vía oral de los compuestos de la invención incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del principio activo, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la materia, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos.

Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, emulsionante y agentes de suspensión, edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, ésteres de polioxietilensorbitol y de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas para administración rectal o vaginal se pueden presentar como un supositorio, que se puede preparar mezclando uno o más compuestos de la invención con uno o más excipientes o vehículos no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera de supositorio o un salicilato, y que es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a temperatura corporal y, por tanto, se fundirá en el recto o cavidad vaginal y liberará el compuesto activo.

Las formulaciones que son adecuadas para administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en espray que contienen dichos vehículos como se conoce en la técnica por ser apropiado.

5 Las formas farmacéuticas para administración tópica o transdérmica de un compuesto de la presente invención incluyen polvos, esprays, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, disoluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo se puede mezclar en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón o propulsor que se pueda requerir.

10 Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto activo de la presente invención, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos.

Los polvos y esprays pueden contener, además de un compuesto de la presente invención, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Los esprays pueden contener además propulsores habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles sin sustituir, tales como butano y propano.

15 Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar la liberación controlada de un compuesto de la presente invención al cuerpo. Dichas formas farmacéuticas se pueden preparar disolviendo o dispersando el compuesto en el medio apropiado. También se pueden usar potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La tasa de dicho flujo se puede controlar por o proporcionando una membrana de control de la tasa o dispersando el compuesto en una matriz de polímero o gel.

20 También se contemplan dentro del alcance de la presente invención formulaciones oftálmicas, pomadas oculares, polvos, disoluciones y similares.

25 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral comprenden uno o más compuestos de la invención en combinación con uno o más disoluciones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, dispersiones, suspensiones, o emulsiones, o polvos estériles que se pueden reconstituir en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de uso, que pueden contener azúcares, alcoholes, antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes.

30 Los ejemplos de vehículos acuosa y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Se pueden mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, usando materiales de recubrimiento, tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersiones, y usando tensioactivos.

35 Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos en los compuestos objeto se puede garantizar por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsórbico, y similares. También puede desearse incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico, y similares, en las composiciones. Además, se puede provocar la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable por la inclusión de agentes que retardan la absorción, tal como monoestearato de aluminio y gelatina.

45 Para uso intramuscular, intraperitoneal, subcutáneo e intravenoso, las composiciones farmacéuticas de la invención se proporcionarán, en general, en disoluciones acuosas estériles o suspensiones, tamponadas a un pH apropiado e isotonicidad. Los vehículos acuosos adecuados incluyen disolución de Ringer y cloruro sódico isotónico. En un caso preferido, el vehículo consiste exclusivamente de un tampón acuoso. En este contexto, "exclusivamente" significa que no están presentes agentes auxiliares o sustancias de encapsulación que podrían afectar o mediar en la captación del ARNbc en las células que albergan el gen diana o virus. Dichas sustancias incluyen, por ejemplo, estructuras micelares, tales como liposomas o cápsides, como se describe a continuación. Aunque se requieren microinyección, lipofección, virus, viroides, cápsides, capsoides, u otros agentes auxiliares, para introducir ARNbc en cultivos celulares, sorprendentemente estos métodos y agentes no son necesarios para captación de ARNbc *in vivo*.

50 Los ARNbc de la presente invención son particularmente ventajosos en que no requieren el uso de un agente auxiliar para mediar en la captación del ARNbc dentro la célula, muchos de cuyos agentes son tóxicos o asociados a efectos secundarios perjudiciales. Las suspensiones acuosas según la invención pueden incluir agentes de suspensión tales como derivados de celulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona y goma tragacanto, y un agente humectante tal como lecitina. Los conservantes adecuados para las suspensiones acuosas incluyen p-hidroxibenzoato de etilo y n-propilo.

55

En algunos casos, para prolongar el efecto de un fármaco, se desea ralentizar la absorción del fármaco de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede llevar a cabo usando una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tiene mala solubilidad en agua. La tasa de absorción del fármaco depende entonces de su

velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, se lleva a cabo la absorción retardada de un fármaco administrado por vía parenteral disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo de aceite.

- 5 Se preparan formas inyectables de liberación prolongada formando matrices microencapsuladas de los compuestos objeto en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la relación entre fármaco y polímero, y la naturaleza del polímero empleado particular, se puede controlar la velocidad de liberación de fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). También se preparan formulaciones inyectables de liberación prolongada atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con tejido del cuerpo.
- 10 Las composiciones farmacéuticas también incluyen formulaciones encapsuladas para proteger el ARNbc contra la rápida eliminación del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulada. Se pueden usar polímeros biocompatibles biodegradables, tal como etilenoacetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se
- 15 pueden obtener comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos virales) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar según métodos conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. N° 4.522.811; publicación PCT WO 91/06309; y la publicación de patente europea EP-A-43075.
- 20 Cuando los compuestos de la presente invención se administran como productos farmacéuticos, a seres humanos y animales, se pueden administrar por sí mismos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, 0,1 a 99 % (más preferentemente, 10 a 30 %) de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 Las preparaciones pueden ser administradas por vía oral, por vía parenteral, por vía tópica, o por vía rectal. Se administran, por supuesto, en formas adecuadas para cada vía de administración. Por ejemplo, se administran en comprimidos o forma de cápsula, por inyección, inhalación, loción ocular, pomada, supositorio, etc., administración por inyección, infusión o inhalación; tópica por loción o pomada; y rectal por supositorios. Se prefieren las administraciones por vía oral.
- 30 Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", como se usa en el presente documento, significa modos de administración distintos de administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intrarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal y intraesternal.
- 35 Las expresiones "administración sistémica", "administrado por vía sistémica", "administración periférica" y "administrado periféricamente" como se usa en el presente documento significan la administración de un compuesto, fármaco u otro material distinto de directamente en el sistema nervioso central, de forma que entra en el sistema del paciente y, así, se somete a metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.
- 40 Estos compuestos se pueden administrar a seres humanos y otros animales para terapia por cualquier vía de administración adecuada, que incluye por vía oral, por vía nasal, como por, por ejemplo, un espray, rectalmente, por vía intravaginal, por vía parenteral, por vía intracisternal y por vía tópica, como por polvos, pomadas o gotas, que incluyen por vía bucal y sublingual.
- 45 Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que se pueden usar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos para los expertos en la técnica.
- Se pueden variar niveles actuales de dosificación de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención para obtener una cantidad del principio activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente.
- 50 El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto particular de la presente invención empleado, o el éster, sal o amida del mismo, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de eliminación o metabolismo del compuesto particular que se emplea, la tasa y grado de absorción, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con el compuesto particular empleado, la edad, sexo, peso, condición, salud general y antecedentes personales previos del paciente que está tratándose, y factores similares bien conocidos en las artes médicas.
- 55 Un médico o veterinario que tiene experiencia habitual en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría empezar las dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los

requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado.

5 En general, una dosis diaria adecuada de un compuesto de la invención será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis eficaz más baja para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz, en general, dependerá de los factores descritos anteriormente. En general, las dosis orales, intravenosas, intracerebroventriculares y subcutáneas de los compuestos de la presente invención para un paciente, cuando se usan para los efectos de silenciamiento génico indicados, variarán desde aproximadamente 0,0001 hasta aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal por día.

10 En general, una dosis adecuada de ARNbc estará en el intervalo de 0,01 a 5,0 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor por día, preferentemente en el intervalo de 0,1 a 2,5 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor por día, más preferentemente en el intervalo de 0,1 a 200 microgramos por kilogramo de peso corporal por día, y lo más preferentemente en el intervalo de 0,1 a 100 microgramos por kilogramo de peso corporal por día. La composición farmacéutica se puede administrar una vez al día, o el ARNbc se puede administrar como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis a intervalos apropiados a lo largo del día. En ese caso, el ARNbc contenido en cada subdosis debe ser correspondientemente más pequeño para lograr la dosis diaria total. La unidad de dosificación también puede ser combinada para administración durante varios días, por ejemplo, usando una formulación de liberación sostenida convencional que proporciona la liberación sostenida del ARNbc durante un periodo de varios días. Las formulaciones de liberación sostenida se conocen bien en la técnica. En este caso, la unidad de dosificación contiene un múltiplo correspondiente de la dosis diaria.

20 Si se desea, la dosis diaria eficaz del compuesto activo se pueden administrar como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas farmacéuticas unitarias. La dosis preferida es una administración por día.

Aunque es posible que un compuesto de la presente invención se administre solo, es preferible administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición).

25 Los compuestos según la invención se pueden formular para administración en cualquier forma conveniente para su uso en medicina humana o veterinaria, por analogía con otros productos farmacéuticos.

30 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos objeto, como se ha descrito anteriormente, formulados juntos con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables (aditivos) y/o diluyentes. Como se describe en detalle más adelante, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser especialmente formuladas para administración en forma sólida o líquida, que incluyen las adaptadas para lo siguiente: (1) administración por vía oral, por ejemplo, rociados (disoluciones o suspensiones acuosa o no acuosas), comprimidos, bolos, polvos, gránulos, pastas para administración a la lengua; (2) administración parenteral, por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa como, por ejemplo, una disolución estéril o suspensión; (3) administración tópica, por ejemplo, como una crema, pomada o spray aplicado a la piel, pulmones, o membranas mucosas; o (4) por vía intravaginal o por vía intrarrectal, por ejemplo, como un pesario, crema o espuma; (5) por vía sublingual o por vía bucal; (6) por vía ocular; (7) por vía transdérmica; o (8) por vía nasal.

El término "tratamiento" pretende englobar también la profilaxis, terapia y cura.

40 El paciente que recibe este tratamiento es cualquier animal en necesidad, que incluye primates, en particular seres humanos, y otros mamíferos, tales como equinos, ganado vacuno, cerdos y ovejas; y aves de corral y mascotas en general.

45 El compuesto de la invención se puede administrar como tal o en mezclas con vehículos farmacéuticamente aceptables y también se puede administrar conjuntamente con agentes antimicrobianos tales como penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos y glicopéptidos. La terapia unida, por consiguiente, incluye administración secuencial, simultánea y separada del compuesto activo en una forma tal que los efectos terapéuticos del primero administrado no desaparece completamente cuando se administra el posterior.

Micelas

50 Recientemente, la industria farmacéutica introdujo la tecnología de microemulsión para mejorar la biodisponibilidad de algunos agentes farmacéuticos lipófilos (insolubles en agua). Los ejemplos incluyen Trimetrine (Dordunoo, S. K., et al., Drug Development and Industrial Pharmacy, 17(12), 1685-1713, 1991 y REV 5901 (Sheen, P. C., et al., J Pharm Sci 80(7), 712-714, 1991). Entre otras cosas, la microemulsión proporciona biodisponibilidad potenciada dirigiendo preferencialmente la absorción al sistema linfático en lugar del aparato circulatorio, que así evita el hígado, y previene la destrucción de los compuestos en la circulación hepatobiliar.

55 En un aspecto de la invención, las formulaciones contienen micelas formadas a partir de un compuesto de la presente invención y al menos un vehículo anfifílico, en el que las micelas tienen un diámetro promedio inferior a aproximadamente 100 nm. Las realizaciones más preferidas proporcionan micelas que tienen un diámetro promedio

inferior a aproximadamente 50 nm, e incluso casos más preferidos proporcionan micelas que tienen un diámetro promedio inferior a aproximadamente 30 nm, o incluso inferior a aproximadamente 20 nm.

Aunque se contemplan todos los vehículos anfífilos adecuados, los vehículos presentemente preferidos, en general, son los que tienen, en general, estado reconocido como seguro (GRAS), y que pueden solubilizar el compuesto de la presente invención como microemulsionarlo en una etapa posterior cuando la disolución se ponga en contacto con una fase acuosa compleja (tal como la encontrada en el tubo gastrodigestivo humano). Normalmente, los componentes anfífilos que cumplen estos requisitos tienen valores de HLB (balance hidrófilo-lipófilo) de 2-20, y sus estructuras contienen radicales alifáticos de cadena lineal en el intervalo de C-6 a C-20. Los ejemplos son glicéridos grasos glicolizados con polietileno y polietilenglicoles.

Los vehículos anfífilos particularmente preferidos son glicéridos de ácidos grasos polietilenglicolisados saturados y monoinsaturados, tales como los obtenidos a partir de diversos aceites vegetales completamente o parcialmente hidrogenados. Dichos aceites pueden consistir ventajosamente en glicéridos de ácidos tri-, di- y mono-grasos y ésteres de di- y mono-polietilenglicol de los ácidos grasos correspondientes, con una composición de ácidos grasos particularmente preferida que incluye ácido cáprico 4-10, ácido cáprico 3-9, ácido láurico 40-50, ácido mirístico 14-24, ácido palmítico 4-14 y ácido esteárico 5-15 %. Otra clase útil de vehículos anfífilos incluye sorbitano y/o sorbitol parcialmente esterificados, con ácidos grasos saturados o monoinsaturados (serie SPAN) o análogos etoxilados correspondientes (serie TWEEN).

Se contemplan particularmente vehículos anfífilos comercialmente disponibles, que incluyen la serie Gelucire, Labrafil, Labrasol o Lauroglycol (todos fabricados y distribuidos por Gattefosse Corporation, Saint Priest, Francia), mono-oleato de PEG, di-oleato de PEG, mono-laurato y di-laurato de PEG, lecitina, Polisorbato 80, etc. (producidos y distribuidos por varias empresas en EE. UU. y en todo el mundo).

Polímeros

Los polímeros hidrófilos adecuados para su uso en la presente invención son los que son fácilmente solubles en agua, pueden ser covalentemente unidos a un lípido formador de vesículas, y que son tolerados *in vivo* sin efectos tóxicos (es decir, son biocompatibles). Los polímeros adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), ácido poliláctico (también denominada polilactida), poliglicólico (también denominado poliglicolida), un copolímero de ácido poliláctico-poliglicólico, y poli(alcohol vinílico). Los polímeros preferidos son los que tienen un peso molecular de desde aproximadamente 100 o 120 dáltones hasta aproximadamente 5.000 o 10.000 dáltones, y más preferentemente desde aproximadamente 300 dáltones hasta aproximadamente 5.000 dáltones. En una realización particularmente preferida, el polímero es polietilenglicol que tiene un peso molecular de desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 5.000 dáltones, y más preferentemente que tiene un peso molecular de desde aproximadamente 300 hasta aproximadamente 5.000 dáltones. En una realización particularmente preferida, el polímero es polietilenglicol de 750 dáltones (PEG(750)). Los polímeros también se pueden definir por el número de monómeros en su interior; una realización preferida de la presente invención utiliza polímeros de al menos aproximadamente tres monómeros, consistiendo dichos polímeros de PEG en tres monómeros (aproximadamente 150 dáltones).

Otros polímeros hidrófilos que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen polivinilpirrolidona, polimetoxazolona, polietiloxazolona, polihidroxiropilmetacrilamida, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, y celulosas derivatizadas tales como hidroximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa.

En ciertas realizaciones, una formulación de la presente invención comprende un polímero biocompatible seleccionado del grupo que consiste en poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, polímeros de polivinilo, poliglicolidas, polisiloxanos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, celulosas, polipropileno, polietilenos, poliestireno, polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto)ésteres, poli(ácido butírico), poli(ácido valérico), poli(lactida-co-caprolactona), polisacáridos, proteínas, poli(ácidos hialurónicos), policianoacrilatos, y combinaciones, mezclas, o copolímeros de los mismos.

Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos, que consiste en 6, 7 u 8 unidades de glucosa, designadas por la letra griega alfa, beta o gamma, respectivamente. No se conoce que existan ciclodextrinas con menos de seis unidades de glucosa. Las unidades de glucosa se unen por enlaces alfa-1,4-glucosídicos. Como consecuencia de la conformación de silla de las unidades de azúcar, todos los grupos hidroxilo secundarios (en C-2, C-3) se localizan sobre un lado del anillo, mientras que todos los grupos hidroxilo primarios en C-6 se sitúan en el otro lado. Como resultado, las caras externas son hidrófilas, que hace que las ciclodextrinas sean solubles en agua. A diferencia, las cavidades de las ciclodextrinas son hidrófobas, puesto que están revestidas por el hidrógeno de los átomos C-3 y C-5, y por oxígenos de tipo éter. Estas matrices permiten la complejación con una variedad de compuestos relativamente hidrófobos, que incluyen, por ejemplo, compuestos esteroideos tales como 17.beta.-estradiol (véase, por ejemplo, van Uden et al., Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38:1-3-113 (1994)). La complejación tiene lugar por interacciones de van der Waals y por formación de enlaces de hidrógeno. Para una revisión general de la química de las ciclodextrinas, véase, Wenz, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:803-822 (1994).

Las propiedades fisicoquímicas de los derivados de ciclodextrina dependen fuertemente del tipo y el grado de sustitución. Por ejemplo, su solubilidad en agua varía de insoluble (por ejemplo, triacetil-beta-ciclodextrina) a 147 % soluble (p/v) (G-2-beta-ciclodextrina). Además, son solubles en muchos disolventes orgánicos. Las propiedades de las ciclodextrinas permiten el control con respecto a la solubilidad de diversos componentes de formulación aumentando o disminuyendo su solubilidad.

Se han descrito numerosas ciclodextrinas y métodos para su preparación. Por ejemplo, Parmeter (I), et al. (patente de EE. UU. N° 3.453.259) y Gramera, et al. (patente de EE. UU. N° 3.459.731) describieron ciclodextrinas electroneutras. Otros derivados incluyen ciclodextrinas con propiedades catiónicas [Parmeter (II), patente de EE. UU. N° 3.453.257], ciclodextrinas reticuladas insolubles (Solms, patente de EE. UU. N° 3.420.788) y ciclodextrinas con propiedades aniónicas [Parmeter (III), patente de EE. UU. N° 3.426.011]. Entre los derivados de ciclodextrina con propiedades aniónicas, los ácidos carboxílicos, ácidos fosforosos, ácidos fosfinosos, ácidos fosfónicos, ácidos fosfóricos, ácidos tiosulfónicos, ácidos sulfónicos y ácidos sulfónicos se han unido a la ciclodextrina parental [véase, Parmeter (III), arriba]. Además, se han descrito derivados de ciclodextrina de sulfoalquil éter por Stella, et al. (patente de EE. UU. N° 5.134.127).

15 Liposomas

Los liposomas consisten en al menos una membrana de bicapa lipídica que encierra un compartimento interno acuoso. Los liposomas se pueden caracterizar por tipo de membrana y por tamaño. Las vesículas unilaminares pequeñas (SUV) tienen una única membrana y normalmente varía entre 0,02 y 0,05 μm de diámetro; las vesículas unilaminares grandes (LUV) normalmente son mayores de 0,05 μm . Las vesículas grandes oligolaminares y las vesículas multilaminares tienen múltiples capas de membrana, normalmente concéntricas, y normalmente son mayores de 0,1 μm . Los liposomas con varias membranas no concéntricas, es decir, varias vesículas más pequeñas contenidas dentro de una vesícula más grande, se llaman vesículas multivesiculares.

Un aspecto se refiere a formulaciones que comprenden liposomas que contienen un compuesto de la presente invención, donde la membrana de liposoma se formula para proporcionar un liposoma con elevada capacidad de carga. Alternativamente o además, el compuesto de la presente invención puede estar contenido dentro de, o adsorbido sobre, la bicapa de liposoma del liposoma. El compuesto de la presente invención se puede agregar con un lípido tensioactivo y ser llevado dentro del espacio interno del liposoma; en estos casos, la membrana del liposoma se formula para resistir los efectos perturbadores del agregado de agente activo-tensioactivo.

La bicapa de lípido de un liposoma puede contener lípidos derivatizados con polietilenglicol (PEG), de forma que las cadenas de PEG se extiendan desde la superficie interna de la bicapa de lípido dentro del espacio interior encapsulado por el liposoma, y se extiendan desde el exterior de la bicapa de lípido dentro del entorno de alrededor.

Los agentes activos contenidos dentro de los liposomas de la presente invención están en forma solubilizada. Los agregados de tensioactivo y agente activo (tales como emulsiones o micelas que contienen el agente activo de interés) pueden ser atrapados dentro del espacio interior de los liposomas según la presente invención. Un tensioactivo actúa para dispersar y solubilizar el agente activo, y se puede seleccionar de cualquier tensioactivo alifático, cicloalifático o aromático adecuado, que incluye, pero no se limita a, lisofosfatidilcolinas biocompatibles (LPC) de longitudes de cadena variables (por ejemplo, desde aproximadamente C₁₄ hasta aproximadamente C₂₀). También se pueden utilizar lípidos derivatizados con polímero tales como PEG-lípidos para la formación de micelas ya que actuarán inhibiendo la fusión de micelas/membranas, y ya que la adición de un polímero a moléculas de tensioactivo disminuye la CMC del tensioactivo y ayuda en la formación de micelas. Se prefieren tensioactivos con CMC en el intervalo micromolar; se pueden utilizar tensioactivos de mayor CMC para preparar micelas atrapadas dentro de los liposomas de la presente invención, sin embargo, los monómeros de tensioactivo micelar podrían afectar la estabilidad de bicapas de liposoma y sería un factor en el diseño de un liposoma de una estabilidad deseada.

Los liposomas se pueden preparar por cualquiera de una variedad de técnicas que se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N° 4.235.871; las solicitudes publicadas PCT WO 96/14057; New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990), páginas 33-104; Lasic DD, Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993.

Por ejemplo, se pueden preparar liposomas difundiendo un lípido derivatizado con un polímero hidrófilo en liposomas preformados, tales como exponiendo liposomas preformados a micelas compuestas de polímeros injertados en lípidos, a concentraciones de lípido correspondientes al porcentaje molar final de lípido derivatizado que se desea en el liposoma. Los liposomas que contienen un polímero hidrófilo también se pueden formar por homogeneización, hidratación del campo de lípidos, o técnicas de extrusión, como se conoce en la técnica.

En otro procedimiento de formulación a modo de ejemplo, el agente activo se dispersa primero por sonicación en una lisofosfatidilcolina u otro tensioactivo de baja CMC (incluyendo lípidos injertados en polímero) que solubiliza fácilmente moléculas hidrófobas. La suspensión micelar resultante de agente activo se usa entonces para rehidratar una muestra secada de lípidos que contiene un porcentaje en moles adecuado de lípido injertado en polímero, o colesterol. La suspensión de lípido y agente activo se forma entonces en liposomas usando técnicas de extrusión

como se conoce en la técnica, y se separan los liposomas resultantes de la disolución sin encapsular por separación convencional en columna.

Los liposomas se pueden preparar para tener tamaños sustancialmente homogéneos en un intervalo de tamaños seleccionado. Un método de dimensionado eficaz implica extraer una suspensión acuosa de los liposomas a través de una serie de membranas de policarbonato que tienen un tamaño de poro uniforme seleccionado; el tamaño de poro de la membrana se corresponderá aproximadamente con los mayores tamaños de liposomas producidos por extrusión a través de esa membrana. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N° 4.737.323 (12 de abril de 1988).

Modificadores de la liberación

Las características de liberación de una formulación dependen del material de encapsulación, la concentración de fármaco encapsulado, y la presencia de modificadores de la liberación. Por ejemplo, se puede manipular la liberación para que sea dependiente del pH, por ejemplo, usando un recubrimiento sensible al pH que libera solo a un bajo pH, como en el estómago, o un pH más alto, como en el intestino. Se puede usar un recubrimiento entérico para prevenir la liberación desde que ocurre hasta después del paso a través del estómago. Se pueden usar múltiples recubrimientos o mezclas de cianamida encapsuladas en diferentes materiales para obtener una liberación inicial en el estómago, seguido por la posterior liberación en el intestino. La liberación también se puede manipular por inclusión de sales o agentes formadores de poros, que puede aumentar la captación de agua o liberación de fármaco por difusión de la cápsula. También se pueden usar excipientes que modifican la solubilidad del fármaco para controlar la velocidad de liberación. También se pueden incorporar agentes que potencian la degradación de la matriz o liberan de la matriz. Se pueden añadir al fármaco, añadir como una fase separada (es decir, como partículas), o se pueden co-disolver en la fase de polímero dependiendo del compuesto. En todos los casos, la cantidad debe estar entre 0,1 y treinta por ciento (p/p de polímero). Los tipos de potenciadores de la degradación incluyen sales inorgánicas tales como sulfato de amonio y cloruro de amonio, ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, ácido benzoico y ácido ascórbico, bases inorgánicas tales como carbonato sódico, carbonato de potasio, carbonato cálcico, carbonato de cinc e hidróxido de cinc, y bases orgánicas tales como sulfato de protamina, espermina, colina, etanolamina, dietanolamina y trietanolamina, y tensioactivos tales como Tween® y Pluronic®. Se añaden agentes formadores de poros que añaden microestructura a las matrices (es decir, compuestos solubles en agua tales como sales inorgánicas y azúcares) como partículas. El intervalo debe estar entre uno y treinta por ciento (p/p de polímero).

También se puede manipular la captación alterando el tiempo de residencia de las partículas en el intestino. Esto se puede lograr, por ejemplo, recubriendo la partícula con, o seleccionando como material de encapsulación, un polímero adhesivo a la mucosa. Los ejemplos incluyen la mayoría de los polímeros con grupos carboxilo libres, tales como quitosano, celulosas, y especialmente poliacrilatos (como se usa en el presente documento, poliacrilatos se refiere a polímeros que incluyen grupos acrilato y grupos acrilato modificados, tales como cianoacrilatos y metacrilatos).

V. Métodos de tratamiento de enfermedades provocadas por la expresión de un gen diana

La divulgación se refiere a un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o en riesgo de desarrollar una enfermedad provocada por la expresión de un gen diana. En esta realización, el ARNbc modificado de la invención puede actuar como agentes terapéuticos novedosos para controlar una o más de los trastornos celulares proliferativos y/o diferenciativos, trastornos asociados al metabolismo óseo, trastornos inmunitarios, trastornos hematopoyéticos, trastornos cardiovasculares, trastornos hepáticos, enfermedades virales, o trastornos metabólicos. El método comprende administrar una composición farmacéutica de la invención al paciente (por ejemplo, ser humano), de forma que se silencie la expresión del gen diana. Debido a su alta eficiencia y especificidad, el ARNbc de la presente invención se dirige específicamente a ARNm de genes diana de células y tejidos enfermos, como se describe a continuación, y a bajas dosificaciones.

Los ejemplos de genes que se pueden dirigir para el tratamiento incluyen, sin limitación, un oncogén (Hanahan, D. y R.A. Weinberg, *Cell* (2000) 100:57; y Yokota, J., *Carcinogenesis* (2000) 21(3):497-503); un gen de citocina (Rubinstein, M., et al., *Cytokine Growth Factor Rev.* (1998) 9(2):175-81); un gen de proteína de idiotipo (Id) (Benezra, R., et al., *Oncogene* (2001) 20(58):8334-41; Norton, J.D., *J. Cell Sci.* (2000) 113(22):3897-905); un gen priónico (Prusiner, S.B., et al., *Cell* (1998) 93(3):337-48; Safar, J., y S.B. Prusiner, *Prog. Brain Res.* (1998) 117:421-34); un gen que expresa moléculas que inducen la angiogénesis (Gould, V.E. y B.M. Wagner, *Hum. Pathol.* (2002) 33(11):1061-3); moléculas de adhesión (Chothia, C. y E.Y. Jones, *Annu. Rev. Biochem.* (1997) 66:823-62; Parise, L.V., et al., *Semin. Cancer Biol.* (2000) 10(6):407-14); receptores de la superficie celular (Deller, M.C., y Y.E. Jones, *Curr. Opin. Struct. Biol.* (2000) 10(2):213-9); genes de proteínas que están implicadas en procesos metastatizantes y/o invasivos (Boyd, D., *Cancer Metastasis Rev.* (1996) 15(1):77-89; Yokota, J., *Carcinogenesis* (2000) 21(3):497-503); genes de proteasas, además de moléculas que regulan la apoptosis y el ciclo celular (Matrisian, L.M., *Curr. Biol.* (1999) 9(20):R776-8; Krepela, E., *Neoplasma* (2001) 48(5):332-49; Basbaum y Werb, *Curr. Opin. Cell Biol.* (1996) 8:731-738; Birkedal-Hansen, et al., *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* (1993) 4:197-250; Mignatti y Rifkin, *Physiol. Rev.* (1993) 73:161-195; Stetler-Stevenson, et al., *Annu. Rev. Cell Biol.* (1993) 9:541-573; Brinkerhoff, E., y L.M. Matrisian, *Nature Reviews* (2002) 3:207-214; Strasser, A., et al., *Annu. Rev. Biochem.* (2000) 69:217-45; Chao, D.T. and S.J. Korsmeyer, *Annu. Rev. Immunol.* (1998) 16:395-419; Mullauer, L., et al., *Mutat. Res.* (2001) 488(3):211-31; Fotedar,

R., et al., Prog. Cell Cycle Res. (1996) 2:147-63; Reed, J.C., Am. J. Pathol. (2000) 157(5):1415-30; D'Ari, R., Bioassays (2001) 23(7):563-5); genes que expresan el receptor de EGF; Mendelsohn, J. y J. Baselga, Oncogene (2000) 19(56):6550-65; Normanno, N., et al., Front. Biosci. (2001) 6:D685-707); y el gen de multirresistencia 1, gen MDR1 (Childs, S., and V. Ling, Imp. Adv. Oncol. (1994) 21-36).

5 En la prevención de enfermedad, el gen diana puede ser uno que se requiere para el inicio o el mantenimiento de la enfermedad, o que se ha identificado por estar asociado a un mayor riesgo de contraer la enfermedad. En el tratamiento de enfermedad, el ARNbc se puede poner en contacto con las células o tejido que presentan la enfermedad. Por ejemplo, el ARNbc sustancialmente idéntico a todo o parte de un gen mutado asociado a cáncer, o uno expresado a altos niveles en células tumorales, se puede poner en contacto con o introducir en una célula cancerosa o gen de tumor.

10 Los ejemplos de trastornos celulares proliferativos y/o diferenciativos incluyen cáncer, por ejemplo, carcinoma, sarcoma, trastornos metastásicos o trastornos hematopoyéticos neoplásicos, por ejemplo, leucemias. Un tumor metastásico puede surgir de una multitud de tipos de tumor primario, que incluyen, pero no se limitan a, los de origen de próstata, colon, pulmón, mama e hígado. Como se usa en el presente documento, los términos "cáncer", "hiperproliferativo" y "neoplásico" se refieren a células que tienen la capacidad de crecimiento autónomo, es decir, un estado de condición anormal caracterizado por crecimiento celular rápidamente proliferante. Se indica que estos términos incluyen todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos, o células, tejidos, u órganos malignamente transformados, independientemente del tipo histopatológico o etapa de invasividad. Los trastornos proliferativos también incluyen trastornos hematopoyéticos neoplásicos, que incluyen enfermedades que implican células hiperplásicas/neoplásicas de origen hematopoyético, por ejemplo, que surgen de linajes mieloides, linfoides o eritroides, o células precursoras de los mismos.

15 Un aspecto de la divulgación se refiere a un método de tratamiento de un sujeto en riesgo de o aquejado de proliferación celular no deseada, por ejemplo, proliferación de células malignas o no malignas. El método comprende proporcionar un ARNbc, en donde el ARNbc se puede inhibir por interferencia por ARN, un gen que promueve la proliferación celular no deseada; y administrar una dosis terapéuticamente eficaz del ARNbc a un sujeto, preferentemente un sujeto humano.

20 El gen puede ser un factor de crecimiento o gen de receptor de factor de crecimiento, una cinasa, por ejemplo, un gen de proteína tirosina, serina o treonina cinasa, un gen de proteína adaptadora, un gen que codifica una molécula de la superfamilia de la proteína G, o un gen que codifica un factor de transcripción.

25 En un caso preferido, el ARNbc silencia el gen PDGF beta, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de PDGF beta, por ejemplo, cánceres testicular y de pulmón.

30 En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen Erb-B, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de Erb-B, por ejemplo, cáncer de mama.

35 En un caso preferido, el ARNbc silencia el gen Src, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de Src, por ejemplo, cánceres de colon.

40 En un caso preferido, el ARNbc silencia el gen CRK, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de CRK, por ejemplo, cánceres de colon y de pulmón.

45 En un caso preferido, el ARNbc silencia el gen GRB2, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de GRB2, por ejemplo, carcinoma de células escamosas.

50 En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen RAS, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de RAS, por ejemplo, cánceres pancreático, de colon y de pulmón, y leucemia crónica.

55 En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen MEKK, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de MEKK, por ejemplo, carcinoma de células escamosas, melanoma o leucemia.

60 En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen JNK, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de JNK, por ejemplo, cánceres pancreáticos o de mama.

65 En un caso preferido, el ARNbc silencia el gen RAF, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de RAF, por ejemplo, cáncer de pulmón o leucemia.

En un caso preferido, el ARNbc silencia el gen Erk1/2, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de Erk1/2, por ejemplo, cáncer de pulmón.

En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen PCNA(p21), y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de PCNA, por ejemplo, cáncer de pulmón.

- 5 En un caso preferido, el ARNbc silencia el gen MYB, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de MYB, por ejemplo, cáncer de colon o leucemia mielógena crónica.

- 10 En un caso preferido, el ARNbc silencia el gen c-MYC, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de c-MYC, por ejemplo, linfoma de Burkitt o neuroblastoma.

En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen JUN, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de JUN, por ejemplo, cánceres de ovario, próstata o de mama.

- 15 En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen FOS, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de FOS, por ejemplo, cánceres de piel o de próstata.

En un caso preferido, el ARNbc silencia el gen BCL-2, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de BCL-2, por ejemplo, cánceres de pulmón o de próstata o linfoma no Hodgkin.

- 20 En un caso preferido, el ARNbc silencia el gen ciclina D, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de ciclina D, por ejemplo, cánceres de esófago y de colon.

- 25 En un caso preferido, el ARNbc silencia el gen VEGF, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de VEGF, por ejemplo, cánceres de esófago y de colon.

En un caso preferido, el ARNbc silencia el gen VEGFR1 (Flt-1), y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de VEGFR1, por ejemplo, cáncer de mama y de pulmón.

- 30 En un caso preferido, el ARNbc silencia el gen VEGFR2 (Flk-1/KDR), y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de VEGFR2, por ejemplo, cánceres de mama, próstata y de colon.

En un caso preferido, el ARNbc silencia el gen EGFR, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de EGFR, por ejemplo, cáncer de mama.

- 35 En un caso preferido, el ARNbc silencia el gen EGF, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de EGF, por ejemplo, cáncer de mama y de ovario.

En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen ciclina A, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de ciclina A, por ejemplo, cánceres de pulmón y de cuello uterino.

- 40 En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen ciclina E, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de ciclina E, por ejemplo, cánceres de pulmón y de mama.

En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen WNT-1, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de WNT-1, por ejemplo, carcinoma de células basales.

- 45 En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen beta-catenina, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de beta-catenina, por ejemplo, adenocarcinoma o carcinoma hepatocelular.

En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen c-MET, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de c-MET, por ejemplo, carcinoma hepatocelular.

- 50 En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen PKC, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de PKC, por ejemplo, cáncer de mama.

En un caso preferido, el ARNbc silencia el gen NFkB, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de NFkB, por ejemplo, cáncer de mama.

En un caso preferido, el ARNbc silencia el gen STAT3, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de STAT3, por ejemplo, cáncer de próstata.

5 En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen survivina, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de survivina, por ejemplo, cánceres cervicales o pancreáticos.

10 En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen Erb2/Her2/Neu, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de Erb2/Her2/Neu, por ejemplo, cáncer de mama.

En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen topoisomerasa I, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de topoisomerasa I, por ejemplo, cánceres de ovario y de colon.

15 En un caso preferido, el ARNbc silencia el gen topoisomerasa II alfa, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de topoisomerasa II, por ejemplo, cánceres de mama y de colon.

En un caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen p73, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de p73, por ejemplo, adenocarcinoma colorrectal.

20 En un caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen p21(WAF1/CIP1), y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de p21(WAF1/CIP1), por ejemplo, cáncer de hígado.

25 En un caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen p27(KIP1), y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de p27(KIP1), por ejemplo, cáncer de hígado.

En un caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen PPM1D, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de PPM1D, por ejemplo, cáncer de mama.

30 En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen caveolina I, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de caveolina I, por ejemplo, carcinoma esofágico de células escamosas.

En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen MIB I, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de MIB I, por ejemplo, carcinoma de mama masculino (MBC).

35 En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen MTA1, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de MTA1, por ejemplo, carcinoma de ovario.

40 En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen M68, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de M68, por ejemplo, adenocarcinomas humanos de esófago, estómago, colon y recto.

En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen cdk2, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de cdk2, por ejemplo, carcinoma de ovario.

45 En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen chk1, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de chk1, por ejemplo, cáncer.

En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen chk2, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de chk2, por ejemplo, cáncer.

En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen plk1, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de plk1, por ejemplo, cáncer.

- En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen Eg5/KSP (KiF11), y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de Eg5/KSP, por ejemplo, cáncer.
- 5 En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen E-cadherina, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de E-cadherina, por ejemplo, cáncer.
- En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen akt, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de akt, por ejemplo, cáncer.
- 10 En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen p85a (proteína cinasa activada por map cinasa), y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de p85a, por ejemplo, cáncer.
- En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen Bcl-XL, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de Bcl-XL, por ejemplo, cáncer.
- 15 En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen SMAD7, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de SMAD7, por ejemplo, cáncer.
- En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen HIF1, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de HIF1, por ejemplo, cáncer.
- 20 En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen MMP1 (metaloproteasa de matriz 1), y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de MMP1, por ejemplo, cáncer de mama y colorrectal.
- En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen MMP2 (metaloproteasa de 2), y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de MMP2, por ejemplo, cáncer de mama, ovario, pancreático y de colon.
- 25 En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen MMP9 (metaloproteasa de 9), y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de MMP9, por ejemplo, cáncer de mama, ovario, pancreático y de colon.
- En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen HDAC (histona desacetilasa) (es decir, genes de histona desacetilasa 1-6 y 9), y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de HDAC, por ejemplo, cáncer.
- 30 En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen TERT (telomerasa transcriptasa inversa), y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de TERT, por ejemplo, cáncer.
- 35 En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen Aurora A, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de Aurora A, por ejemplo, cáncer.
- En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen Aurora B, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de Aurora B, por ejemplo, cáncer.
- 40 En otro caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen timidilato sintasa, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de timidilato sintasa, por ejemplo, cáncer.
- En casos preferidos, el ARNbc silencia mutaciones en genes supresores de tumor, y así se pueden usar como un método para promover la actividad apoptótica en combinación con quimioterapéuticos.
- 45 En un caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen supresor de tumores p53, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de p53, por ejemplo, cánceres de vesícula biliar, pancreático y de pulmón.
- En un caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el miembro DN-p63 de la familia del gen p53, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de DN-p63, por ejemplo, carcinoma de células escamosas.
- 50

- En un caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen supresor de tumores pRb, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de pRb, por ejemplo, oral carcinoma de células escamosas.
- 5 En un caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen supresor de tumores APC1, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de APC1, por ejemplo, cáncer de colon.
- En un caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen supresor de tumores BRCA1, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de BRCA1, por ejemplo, cáncer de mama.
- 10 En un caso preferido, el ARNbc silencia mutaciones en el gen supresor de tumores PTEN, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de PTEN expresión, por ejemplo, hamartomas, gliomas, y cánceres de próstata y de endometrio.
- En un caso preferido, el ARNbc silencia genes de fusión MLL, por ejemplo, MLL-AF9, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada del gen de fusión MLL, por ejemplo, leucemias agudas.
- 15 En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen de fusión BCR/ABL, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada del gen de fusión BCR/ABL, por ejemplo, leucemias agudas y crónicas.
- En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen de fusión TEL/AML1, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada del gen de fusión TEL/AML1, por ejemplo, leucemia aguda infantil.
- 20 En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen de fusión EWS/FLI1, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada del gen de fusión EWS/FLI1, por ejemplo, sarcoma de Ewing.
- 25 En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen de fusión TLS/FUS1, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada del gen de fusión TLS/FUS1, por ejemplo, liposarcoma mixoide.
- En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen de fusión PAX3/FKHR, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada del gen de fusión PAX3/FKHR, por ejemplo, liposarcoma mixoide.
- 30 En otro caso preferido, el ARNbc silencia el gen de fusión AML1/ETO, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada del gen de fusión AML1/ETO, por ejemplo, leucemia aguda.
- Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método de tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un ser humano, en riesgo de o aquejado de una enfermedad o trastorno que se puede beneficiar por la inhibición de la angiogénesis, por ejemplo, cáncer. El método comprende proporcionar un ARNbc, en donde el ARNbc se puede inhibir por interferencia por ARN un gen que media en la angiogénesis; y administrar una dosificación terapéuticamente eficaz de dicho ARNbc a un sujeto, preferentemente un ser humano.
- 35 En un caso preferido, el ARNbc silencia el gen alfa v-integrina, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de alfa V integrina, por ejemplo, tumores cerebrales o tumores de origen epitelial.
- 40 En un caso preferido, el ARNbc silencia el receptor de gen Flt-1, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de receptores de Flt-1, por ejemplo, cáncer y artritis reumatoide.
- 45 En un caso preferido, el ARNbc silencia el gen tubulina, y así se puede usar para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de un trastorno caracterizado por la expresión no deseada de tubulina, por ejemplo, cáncer y neovascularización retiniana.
- Las composiciones farmacéuticas también se pueden usar para tratar una variedad de trastornos inmunitarios, en particular los asociados a la expresión en exceso de un gen o expresión de un gen mutante. Los ejemplos de enfermedades o trastornos hematopoyéticos incluyen, sin limitación, enfermedades autoinmunitarias (incluyendo, por ejemplo, diabetes mellitus, artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psoriásica), esclerosis múltiple, encefalomielitis, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis autoinmune, dermatitis (incluyendo dermatitis atópica y dermatitis eccematosa), psoriasis, síndrome de Sjogren, enfermedad de Crohn, úlcera aftosa, iritis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, colitis ulcerosa, asma, asma alérgica, lupus eritematoso
- 50

cutáneo, esclerodermia, vaginitis, proctitis, erupciones por fármacos, reacciones de reversión de la lepra, eritema nudoso leproso, uveítis autoinmune, encefalomiелitis alérgica, encefalopatía hemorrágica necrotizante aguda, pérdida auditiva sensorineural progresiva bilateral idiopática, anemia aplásica, anemia de eritrocitos puros, trombocitopenia idiopática, policondritis, granulomatosis de Wegener, hepatitis activa crónica, síndrome de Stevens-Johnson, celiacía idiopática, liquen plano, enfermedad de Graves, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveítis posterior y fibrosis pulmonar intersticial), enfermedad de injerto frente a hospedador, casos de trasplante y alergia.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método de tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un ser humano, en riesgo de o aquejado de una enfermedad o trastorno caracterizado por una respuesta inmunitaria no deseada, por ejemplo, un trastorno o enfermedad inflamatoria, o un trastorno o enfermedad autoinmunitaria. El método comprende proporcionar un ARNbc, en donde dicho ARNbc puede inhibir por interferencia por ARN un gen que media en una respuesta inmunitaria no deseada; y administrar dicho ARNbc a un sujeto, preferiblemente un sujeto humano. En un caso preferido, la enfermedad o trastorno es una lesión por isquemia o reperfusión, por ejemplo, lesión por isquemia o reperfusión asociada a infarto agudo de miocardio, angina inestable, derivación cardiopulmonar, intervención quirúrgica, por ejemplo, angioplastia, por ejemplo, angioplastia coronaria transluminal percutánea, la respuesta a un órgano o tejido trasplantado, por ejemplo, tejido cardíaco o vascular trasplantado; o trombólisis. En una realización preferida, la enfermedad o trastorno es reestenosis, por ejemplo, reestenosis asociada con intervención quirúrgica, por ejemplo, angioplastia, por ejemplo, angioplastia coronaria transluminal percutánea. En un caso preferido, la enfermedad o trastorno es enfermedad inflamatoria del intestino, por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. En un caso preferido, la enfermedad o trastorno es inflamación asociada a una infección o lesión. En un caso preferido, la enfermedad o trastorno es asma, lupus, esclerosis múltiple, diabetes, por ejemplo, diabetes de tipo II, artritis, por ejemplo, reumatoide o psoriásica. En casos particularmente preferidos, el ARNbc silencia una integrina o co-ligando de la misma, por ejemplo, VLA4, VCAM, ICAM. En casos particularmente preferidos, el ARNbc silencia una selectina o co-ligando de la misma, por ejemplo, P-selectina, E-selectina (ELAM), I-selectina, glucoproteína-1 de P-selectina (PSGL-1). En casos particularmente preferidos, el ARNbc silencia un componente del sistema del complemento, por ejemplo, C3, C5, C3aR, C5aR, C3 convertasa, C5 convertasa.

En casos particularmente preferidos, el ARNbc silencia una quimiocina o receptor de la misma, por ejemplo, TNF1, TNFJ, IL-11, IL-1J, IL -2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-6, IL-8, TNFRI, TNFRII, IgE, SCYA11, CCR3 y CCR2.

En otros casos, el ARNbc silencia GCSF, Gro1, Gro2, Gro3, PF4, MIG, proteína básica pro-plaquetaria (PPBP), MIP-11, MIP-1J, RANTES, MCP-1, MCP-2, MCP-3, CMBKR1, CMBKR2, CMBKR3, CMBKR5, AIF-1 y 1-309.

En aún otros casos, el ARNbc silencia Bax, CD40, CD40L, MyD88, NF-kappa-B, IKK1 (inhibidor de NF-kappa-B 1), IKK2 (inhibidor de NF-kappa-B 1), IRAK1, IRAK2, IRAK3, IRAK4, PU.1 (oncogén de integración proviral del virus formadores de foco en el bazo), receptor de adenosina A2, STAT1, p38 (proteína cinasa activada por mitógenos de map cinasa) y CTLA4.

Otro aspecto de la divulgación caracteriza un método de tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un ser humano, en riesgo de o aquejado de dolor agudo o dolor crónico. El método comprende proporcionar un ARNbc, en donde dicho ARNbc puede inhibir por interferencia por ARN un gen que media en el procesamiento de dolor; y administrar una dosis terapéuticamente eficaz de dicho ARNbc a un sujeto, preferiblemente un sujeto humano. En casos particularmente preferidos, el ARNbc silencia un componente de un canal de iones. En casos particularmente preferidos, el ARNbc silencia un receptor de neurotransmisor o ligando.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método de tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un ser humano, en riesgo de o aquejado de un trastorno o enfermedad neurológica. El método comprende proporcionar un ARNbc, en donde dicho ARNbc puede inhibir por interferencia por ARN un gen que media en un trastorno o enfermedad neurológica; y administrar una dosis terapéuticamente eficaz de dicho ARNbc a un sujeto, preferentemente un ser humano. En un caso preferido, la enfermedad o trastorno es enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson. En casos particularmente preferidos, el ARNbc silencia un gen de la familia amiloide, por ejemplo, APP; un gen de presenilina, por ejemplo, PSEN1 y PSEN2, o I-sinucleína. En un caso preferido, la enfermedad o trastorno es un trastorno neurodegenerativo de repetición de trinucleótidos, por ejemplo, enfermedad de Huntington, atrofia dentatorubro-páldoluisiana o una ataxia espinocerebelosa, por ejemplo, SCA1, SCA2, SCA3 (enfermedad de Machado-Joseph), SCA7 o SCA8.

En casos particularmente preferidos, el ARNbc silencia huntingtina (HD), DRPLA, SCA1, SCA2, MJD1, CACNL1A4, SCA7, SCA8, alfa-sinucleína, enzima convertora de beta-amiloide, proteína precursora de beta amiloide (APP), caspasa-3, receptor vainilloide (VR), Scn-1A/NAV1.8 (proteína tipo X alfa regulada por la tensión de los canales de sodio), Scn-2A/NAV1.2 (proteína tipo X alfa regulada por la tensión de los canales de sodio), KCNN3, Parkin y Tau.

En otro caso, la divulgación se refiere a un método de tratamiento de enfermedades virales, que incluyen, pero no se limitan a, hepatitis C, hepatitis B, hepatitis A, virus del herpes simple (VHS), virus del papiloma humano (VPH), VIH-SIDA, virus de la poliomiелitis y virus de la viruela. El ARNbc de la invención se prepara como se describen en el presente documento para dirigir secuencias expresadas de un virus, mejorando así la actividad y replicación virales. El ARNbc se puede usar en el tratamiento y/o diagnóstico de tejido infectado viral, tanto animal como de planta. Por tanto, dicho ARNbc se puede usar en el tratamiento de carcinoma asociado a virus, tal como cáncer hepatocelular.

Por ejemplo, los ARNbc de la presente invención son útiles para tratar un sujeto que tiene una infección o una enfermedad asociada a la replicación o actividad de un virus de ARN de cadena (+) que tiene una 3'-UTR, tal como VHC. En este caso, el ARNbc puede actuar de agentes terapéuticos novedosos para inhibir la replicación del virus. El método comprende administrar una composición farmacéutica de la invención al paciente (por ejemplo, humano), de forma que se inhiba la replicación viral. Los ejemplos de virus de ARN de cadena (+) que se puede dirigir para la inhibición incluyen, sin limitación, picornavirus, calicivirus, nodavirus, coronavirus, arterivirus, flavivirus y togavirus. Los ejemplos de picornavirus incluyen enterovirus (virus de la poliomielitis 1), rinovirus (rinovirus humano 1A), hepatovirus (virus de la hepatitis A), cardiovirus (virus de la encefalomiocarditis), aftovirus (virus O de la enfermedad de pies y boca) y parechovirus (echovirus humano 22). Los ejemplos de calicivirus incluyen vesiculovirus (virus del exantema vesicular porcino), lagovirus (virus de la enfermedad hemorrágica del conejo), "virus de tipo Norwalk" (virus de Norwalk), "virus de tipo Sapporo" (virus de Sapporo) y "virus de tipo hepatitis E" (virus de la hepatitis E). El betanodavirus (virus de la necrosis nerviosa del jurel rayado) es el nodavirus representativo. Los coronavirus incluyen coronavirus (virus de la bronquitis infecciosa aviar) y torovirus (virus de Berne). Los arterivirus (virus de la arteritis equina) es el arterivirus representativo. Los togavirus incluyen alfavirus (virus de Sindbis) y rubivirus (virus de la rubeola). Finalmente, los flavivirus incluyen flavivirus (virus de la fiebre amarilla), pestivirus (virus de la diarrea bovina) y hepacivirus (virus de la hepatitis C). En una realización preferida, el virus es hepacivirus, el virus de la hepatitis C. Aunque la lista anterior ejemplifica virus de vertebrados, la presente invención engloba las composiciones y métodos de tratamiento de infecciones y enfermedades provocadas por cualquier virus de ARN d cadena (+) que tiene una 3'-UTR, independientemente del hospedador. Por ejemplo, se describe el tratamiento de enfermedades de plantas provocadas por sequivirus, comovirus, potyvirus, sobemovirus, luteovirus, tombusvirus, tobavirus, tobavirus, bromovirus y closterovirus.

Otro aspecto se refiere a un método de tratamiento de un sujeto infectado con un virus o en riesgo de o aquejado de un trastorno o enfermedad asociado a una infección viral. El método comprende proporcionar un ARNbc, en donde el ARNbc puede inhibir por interferencia por ARN, un gen viral de un gen celular que media en la función viral, por ejemplo, entrada o crecimiento; y administrar una dosis terapéuticamente eficaz de dicho ARNbc a un sujeto, preferentemente un sujeto humano.

Por lo tanto, la divulgación proporciona un método de tratamiento de pacientes infectados por el virus del papiloma humano (VPH) o en riesgo de o aquejado de un trastorno mediado por VPH, por ejemplo, cáncer de cuello uterino. El VPH se asocia a 95 % de carcinomas cervicales y así una terapia antiviral es un método atractivo de tratamiento de estos cánceres y otros síntomas de infección viral.

En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen del VPH. En otra realización preferida, el gen del VPH es uno del grupo de E2, E6 o E7.

En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del VPH.

La divulgación también incluye un método de tratamiento de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por el VIH, por ejemplo, síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA). En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen del VIH. En otro caso preferido, el gen del VIH es CCR5, Gag o Rev. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del VIH. En otro caso preferido, el gen es CD4 o Tsg101.

La divulgación también incluye un método de tratamiento de pacientes infectados por el virus de la hepatitis B (VHB) o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por el VHB, por ejemplo, cirrosis y carcinoma hepatocelular. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen del VHB. En otro caso preferido, el gen del VHB dirigido codifica uno del grupo de la región de cola de la proteína del núcleo del VHB, la región pre-cregious (pre-c), o la región cregious (c). En otro caso preferido, una secuencia de ARN del VHB dirigida comprende la cola de poli(A).

En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del VHB.

La divulgación también proporciona un método de tratamiento de pacientes infectados por el virus de la hepatitis A (VHA), o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por el VHA. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del VHA.

La presente divulgación proporciona un método de tratamiento de pacientes infectados por el virus de la hepatitis C (VHC), o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por el VHC, por ejemplo, cirrosis. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen del VHC. En otro caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del VHC.

La presente divulgación también proporciona un método de tratamiento de pacientes infectados por cualquiera del grupo de las cepas virales de la hepatitis que comprenden hepatitis D, E, F, G, o H, o pacientes en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por cualquiera de estas cepas de hepatitis. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen de la hepatitis, D, E, F, G o H. En otro caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación de la hepatitis D, E, F, G o H.

5 También se proporcionan métodos de tratamiento de pacientes infectados por el virus respiratorio sincitial (VRS) o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por el VRS, por ejemplo, infección de las vías respiratorias inferiores en lactantes y asma infantil, neumonía y otras complicaciones, por ejemplo, en los ancianos. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen del VRS. En otro caso preferido, el gen del VHB dirigido codifica uno del grupo de los genes N, L o P. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del VRS.

10 Se proporcionan métodos para tratar pacientes infectados por el virus del herpes simple (VHS) o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por el VHS, por ejemplo, herpes genital y calenturas, así como enfermedad potencialmente mortal o de alteración de la vista principalmente en pacientes inmunodeprimidos. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen del VHS. En otro caso preferido, el gen del VHS dirigido codifica la ADN polimerasa o la helicasa-primasa. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del VHS.

15 La divulgación también proporciona un método de tratamiento de pacientes infectados por el citomegalovirus del herpes (CMV) o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por CMV, por ejemplo, infecciones víricas congénitas y morbilidad en pacientes inmunodeprimidos. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen del CMV. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del CMV.

20 También se proporcionan métodos para un método de tratamiento de pacientes infectados por el virus de Epstein Barr (VEB) del herpes o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por VEB, por ejemplo, linfoma de linfocitos NK/T, linfoma no Hodgkin y enfermedad de Hodgkin. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen del VEB. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del VEB.

25 También se proporcionan métodos de tratamiento de pacientes infectados por virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (VHSK), también denominado virus del herpes humano 8, o pacientes en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por VHSK, por ejemplo, sarcoma de Kaposi, enfermedad multicéntrica de Castleman y linfoma de efusión primaria asociado al SIDA. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen del VHSK. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del VHSK.

30 La divulgación también incluye un método de tratamiento de pacientes infectados por el virus de JC (JCV) o una enfermedad o trastorno asociado a este virus, por ejemplo, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP). En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen del JCV. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del JCV.

También se proporcionan métodos de la divulgación para el tratamiento de pacientes infectados por el síndrome respiratorio agudo grave (SRAG) o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por el SRAG, así como enfermedad potencialmente mortal o de alteración de la vista principalmente en pacientes inmunodeprimidos. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen del SRAG.

35 También se proporcionan métodos de la divulgación para el tratamiento de pacientes infectados por el myxovirus o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por myxovirus, por ejemplo, gripe. En una realización preferida, se reduce la expresión de un myxovirus. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación de myxovirus.

40 También se proporcionan métodos de tratamiento de pacientes infectados por el rinovirus o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por rinovirus, por ejemplo, el resfriado común. En una realización preferida, se reduce la expresión de un gen de rinovirus. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación de rinovirus.

45 También se proporcionan métodos de tratamiento de pacientes infectados por el coronavirus o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por coronavirus, por ejemplo, el resfriado común. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen de coronavirus. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación de coronavirus.

50 También se proporcionan métodos de tratamiento de pacientes infectados por el flavivirus Nilo Occidental o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por el virus del Nilo Occidental. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen del Nilo Occidental. En otra realización preferida, el gen del virus del Nilo Occidental es uno del grupo que comprende E, NS3, o NS5. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del virus del Nilo Occidental.

55 También se proporcionan métodos de tratamiento de pacientes infectados por el flavivirus de la encefalitis de San Luis, o en riesgo de o aquejados de una enfermedad o trastorno asociado a este virus, por ejemplo, fiebre hemorrágica viral o enfermedad neurológica. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen de la encefalitis de San Luis. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del virus de la encefalitis de San Luis.

5 También se proporcionan métodos de tratamiento de pacientes infectados por el flavivirus de la encefalitis transmitida por garrapatas, o en riesgo de o aquejado de un trastorno mediado por el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, por ejemplo, fiebre hemorrágica viral y enfermedad neurológica. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas.

10 También se proporcionan métodos para métodos de tratamiento de pacientes infectados por el flavivirus de la encefalitis del Valle de Murray, que comúnmente da como resultado fiebre hemorrágica viral y enfermedad neurológica. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen del virus de la encefalitis del Valle de Murray. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del virus de la encefalitis del Valle de Murray.

15 La divulgación también incluye métodos de tratamiento de pacientes infectados por el flavivirus del dengue, o una enfermedad o trastorno asociado a este virus, por ejemplo, fiebre hemorrágica del dengue. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen del virus del dengue. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del virus del dengue.

También se proporcionan métodos de tratamiento de pacientes infectados por el virus simio 40 (SV40) o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por SV40, por ejemplo, tumorigénesis. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen de SV40. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del SV40.

20 La divulgación también incluye métodos de tratamiento de pacientes infectados por el virus linfotrópico de linfocitos T humanos (HTLV), o una enfermedad o trastorno asociado a este virus, por ejemplo, leucemia y mielopatía. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen de HTLV. En otro caso preferido, el gen de HTLV1 es el activador transcripcional de Tax. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación de HTLV.

25 También se proporcionan métodos de la divulgación para el tratamiento de pacientes infectados por el virus de la leucemia murina de Moloney (Mo-MuLV) o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por Mo-MuLV, por ejemplo, leucemia de linfocitos T. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen de Mo-MuLV. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación de Mo-MuLV.

30 También se proporcionan métodos de la divulgación para el tratamiento de pacientes infectados por el virus de la encefalomiocarditis (VEMC) o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por el VEMC, por ejemplo miocarditis. El VEMC conduce a miocarditis en ratones y cerdos y es capaz de infectar células miocárdicas humanas. Este virus es, por tanto, una preocupación para los pacientes que reciben xenotrasplante. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen de VEMC. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del VEMC.

35 La divulgación también incluye un método de tratamiento de pacientes infectados por el virus del sarampión (VS) o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por el VS, por ejemplo, sarampión. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen del VS. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del VS.

40 La divulgación también incluye un método de tratamiento de pacientes infectados por el virus de la varicela zóster (VVZ) o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por VVZ, por ejemplo, varicela o herpes zóster (también llamado zóster). En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen del VVZ. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del VVZ.

45 La divulgación también incluye un método de tratamiento de pacientes infectados por un adenovirus o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por un adenovirus, por ejemplo, infección de las vías respiratorias. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen de adenovirus. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación de adenovirus.

50 La divulgación incluye un método de tratamiento de pacientes infectados por un virus de la fiebre amarilla (VFA) o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por un VFA, por ejemplo, infección de las vías respiratorias. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen del VFA. En otro caso preferido, el gen preferido es uno de un grupo que incluye los genes E, NS2A, o NS3. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del VFA.

55 También se proporcionan métodos de tratamiento de pacientes infectados por el virus de la poliomielitis o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por el virus de la poliomielitis, por ejemplo, polio. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen del virus de la poliomielitis. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del virus de la poliomielitis.

También se proporcionan métodos de tratamiento de pacientes infectados por un poxvirus o en riesgo de o aquejados de un trastorno mediado por un poxvirus, por ejemplo, viruela. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen de poxvirus. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación del poxvirus.

- 5 Se describen métodos de tratamiento de un sujeto infectado con un patógeno, por ejemplo, un patógeno bacteriano, amebico, parasítico o fúngico. El método comprende proporcionar un ARNbc, en donde dicho ARNbc puede inhibir por interferencia por ARN un gen patógeno; y administrar una dosis terapéuticamente eficaz de dicho ARNbc a un sujeto, preferentemente un sujeto humano.

- 10 El gen diana pueden ser uno implicado en el crecimiento, síntesis de pared celular, síntesis de proteínas, transcripción, metabolismo de la energía, por ejemplo, el ciclo de Krebs, o la producción de toxina. Así, se proporciona un método de tratamiento de pacientes infectados por un plasmodio que provoca malaria. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen de plasmodio. En otro caso preferido, el gen es el antígeno 1 de la membrana apical (AMA1). En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación de plasmodio.

- 15 La divulgación también incluye métodos de tratamiento de pacientes infectados por *Mycobacterium ulcerans*, o una enfermedad o trastorno asociado a este patógeno, por ejemplo *Buruli ulcers*. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen de *Mycobacterium ulcerans*. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación de *Mycobacterium ulcerans*.

- 20 La divulgación también incluye métodos de tratamiento de pacientes infectados por *Mycobacterium tuberculosis*, o una enfermedad o trastorno asociado a este patógeno, por ejemplo, tuberculosis. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen de *Mycobacterium tuberculosis*. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación de *Mycobacterium tuberculosis*.

- 25 La divulgación también incluye métodos de tratamiento de pacientes infectados por *Mycobacterium leprae*, o una enfermedad o trastorno asociado a este patógeno, por ejemplo, lepra. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen de *Mycobacterium leprae*. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación de *Mycobacterium leprae*.

- 30 La divulgación también incluye métodos de tratamiento de pacientes infectados por las bacterias *Staphylococcus aureus*, o una enfermedad o trastorno asociado a este patógeno, por ejemplo, infecciones de la piel y membranas mucosas. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen de *Staphylococcus aureus*. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación de *Staphylococcus aureus*.

- 35 La divulgación también incluye métodos de tratamiento de pacientes infectados por las bacterias *Streptococcus pneumoniae*, o una enfermedad o trastorno asociado a este patógeno, por ejemplo, neumonía o infección infantil de las vías respiratorias inferiores. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen de *Streptococcus pneumoniae*. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación de *Streptococcus pneumoniae*.

- La divulgación también incluye métodos de tratamiento de pacientes infectados por las bacterias *Streptococcus pyogenes*, o una enfermedad o trastorno asociado a este patógeno, por ejemplo, amigdalitis o fiebre escarlata. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen de *Streptococcus pyogenes*. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación de *Streptococcus pyogenes*.

- 40 La divulgación también incluye métodos de tratamiento de pacientes infectados por las bacterias *Chlamydia pneumoniae*, o una enfermedad o trastorno asociado a este patógeno, por ejemplo, neumonía o infección infantil de las vías respiratorias inferiores. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen de *Chlamydia pneumoniae*. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación de *Chlamydia pneumoniae*.

- 45 La divulgación también incluye métodos de tratamiento de pacientes infectados por las bacterias *Mycoplasma pneumoniae*, o una enfermedad o trastorno asociado a este patógeno, por ejemplo, neumonía o infección infantil de las vías respiratorias inferiores. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen de *Mycoplasma pneumoniae*. En un caso preferido, se reduce la expresión de un gen humano que se requiere para la replicación de *Mycoplasma pneumoniae*.

- 50 Las composiciones farmacéuticas también se pueden usar para tratar una variedad de trastornos metabólicos, en particular los asociados con la expresión en exceso de un gen o la expresión de un gen mutante. Los ejemplos de enfermedades o trastornos metabólicos incluyen, sin limitación, trastornos del metabolismo de los hidratos de carbono (incluyendo diabetes mellitus, cetoacidosis diabética, cetoacidosis alcohólica, coma hiperosmolar hiperglucémico no cetósico e hipoglucemia), trastornos de la pituitaria, trastornos de la tiroides (incluyendo hipertiroidismo, hipotiroidismo, bocio eutiroideo, síndrome del enfermo eutiroideo, tiroiditis y cánceres de tiroides), trastornos suprarrenales (incluyendo hipofunción de la corteza suprarrenal, hiperfunción de la corteza suprarrenal, feocromocitoma y masas suprarrenales no funcionales), síndromes de neoplasia endocrina múltiple, síndromes de

deficiencia poliglandular, porfirias (es decir, trastornos provocados por deficiencias de enzimas de la vía biosintética hemo), hiperlipidemia, lipodosis, tumores carcinoides, amiloidosis, obesidad y trastornos relacionados con agua, electrolito, mineral y metabolismo ácido-base.

5 Otro aspecto se refiere a un método de tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un ser humano, en riesgo de o aquejado de un trastorno o enfermedad metabólica. El método comprende proporcionar un ARNbc, en donde dicho ARNbc puede inhibir por interferencia por ARN un gen que media en un trastorno o enfermedad metabólica; y administrar una dosis terapéuticamente eficaz de dicho ARNbc a un sujeto, preferentemente un ser humano. En un caso preferido, la enfermedad o trastorno es diabetes mellitus u obesidad. En casos particularmente preferidos, el ARNbc silencia PTP-1B, glucosa-6-fosfatasa, PEPCK, FoxO-1, FoxA-3, fructosa-1,6-bisfosfatasa, SREBP1C, SCAP, 10 ApoB, SERBP-2, LDLR, Dhcr24, HMG Co-reductasa, FAS-ácido graso sintasa, caspasa 8, TGF-beta 1, receptor 1 de TGF-beta 1, colágeno, esteroil-CoA desaturasa 1, proteína de transferencia de triglicéridos microsomales, dipeptidilpeptidasa IV, acetil-CoA-carboxilasa-2, 11-hidroxiesteroide deshidrogenasa 1, APS (proteína adaptadora con dominio de homología a pleckstrina y a 2 de src), GM3 sintasa, acil CoA:DAG aciltransferasa 1, resistina, SHIP-2, lipasa sensible a hormonas, y PCSK-9.

15 La pérdida de heterocigosidad (LOH) puede dar como resultado hemicigosidad para la secuencia, por ejemplo, genes, en el área de LOH. Esto puede dar como resultado una significativa diferencia genética entre células normales y de estado de enfermedad, por ejemplo, células cancerosas, y proporciona una diferencia útil entre células normales y de estado de enfermedad, por ejemplo, células cancerosas. Esta diferencia puede surgir debido a que un gen u otra secuencia es heterocigótica en células euploides, pero es hemicigótica en células que tienen LOH. 20 Las regiones de LOH incluirán frecuentemente un gen, cuya pérdida promueve la proliferación no deseada, por ejemplo, un gen supresor de tumores, y otras secuencias que incluyen, por ejemplo, otros genes, en algunos casos un gen que es esencial para la función normal, por ejemplo, crecimiento. Los métodos de la invención se basan, en parte, en la escisión específica o silenciamiento de un alelo de un gen esencial con un ARNbc de la invención. El ARNbc se selecciona de forma que dirija el alelo individual del gen esencial encontrado en las células que tienen LOH, pero no silencie el otro alelo, que está presente en células que no muestran LOH. En esencia, discrimina entre los dos alelos, silenciando preferencialmente el alelo seleccionado. En esencia, los polimorfismos, por ejemplo, SNP de genes esenciales que son afectados por LOH, se usan como diana para un trastorno caracterizado por células que tienen LOH, por ejemplo, células cancerosas que tienen LOH. Por ejemplo, un experto habitual en la técnica puede identificar genes esenciales que están en la proximidad a genes supresores de tumores, y que están dentro de una región de LOH que incluye el gen supresor de tumores. El gen que codifica la gran subunidad de ARN 30 polimerasa II humana, POLR2A, un gen situado en estrecha proximidad al gen supresor de tumores p53, es dicho gen. Ocurre frecuentemente dentro de una región de LOH en células cancerosas. Otros genes que ocurren dentro de regiones de LOH y se pierden en muchos tipos de células cancerosas incluyen el grupo que comprende la subunidad de 70 kDa de la proteína A de replicación, proteína A de replicación de 32 kD, reductasa de ribonucleótido, timidilato sintasa, factor 2H asociado a TATA, proteína S14 ribosómica, factor 5A de inicio eucariota, alanil ARNt sintetasa, cisteinil ARNt sintetasa, NaK ATPasa, subunidad alfa-1 y receptor de transferrina. 35

Por consiguiente, otro aspecto se refiere a un método de tratamiento de un trastorno caracterizado por LOH, por ejemplo, cáncer. El método comprende opcionalmente determinar el genotipo del alelo de un gen en la región de LOH y preferentemente determinar el genotipo de ambos alelos del gen en una célula normal; proporcionar un 40 ARNbc, en donde dicho ARNbc puede inhibir por interferencia por ARN el alelo encontrado en las células de LOH; y administrar una dosis terapéuticamente eficaz de dicho ARNbc al sujeto, preferentemente un ser humano.

La divulgación también incluye un ARNbc desvelado en el presente documento, por ejemplo, un ARNbc que puede silenciar preferencialmente un alelo de un gen polimórfico.

45 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de escisión o silenciamiento de más de un gen con un ARNbc. En estos casos, el ARNbc se selecciona de manera que tenga homología suficiente con una secuencia encontrada en más de un gen. Por ejemplo, la secuencia AAGCTGGCCCTGGACATGGAGAT (SEQ ID NO: 43) está conservada entre lamina B1 de ratón, lamina B2, gen 1 del complejo 2 de queratina y lamina A/C. Así, un ARNbc dirigido a esta secuencia silenciaría eficazmente toda la colección de genes.

La divulgación también incluye un ARNbc desvelado en el presente documento, que puede silenciar más de un gen.

50 Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante cualquier medio conocido en la técnica que incluye, pero no se limita a, vías oral o parenteral, que incluyen administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, transdérmica, a las vías respiratorias (aerosol), rectal, vaginal y tópica (incluyendo bucal y sublingual). En casos preferidos, las composiciones farmacéuticas se administran por infusión o inyección intravenosa o intraparenteral.

55 VI. Métodos de inhibición de la expresión de un gen diana

En aún otro aspecto, la divulgación se refiere a un método de inhibición de la expresión de un gen diana en una célula u organismo. En un caso, el método comprende administrar el ARNbc inventivo o una composición farmacéutica que comprende el ARNbc a un organismo, tal como un mamífero, de forma que se silencie la expresión

del gen diana. Debido a su estabilidad y biodisponibilidad sorprendentemente mejoradas, el ARNbc de la presente invención inhibe eficazmente la expresión o actividad de genes diana a dosificaciones sorprendentemente bajas. Las composiciones y métodos de inhibición de la expresión de un gen diana usando ARNbc se pueden realizar como se describe en las secciones precedentes, particularmente las Secciones IV y V.

- 5 En este caso, una composición farmacéutica que comprende el ARNbc se puede administrar mediante cualquier medio conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, vías orales o parenterales, que incluyen administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, transdérmica, a las vías respiratorias (aerosol), rectal, vaginal y tópica (incluyendo bucal y sublingual). En casos preferidos, las composiciones farmacéuticas se administran por infusión o inyección intravenosa o intraparenteral.
- 10 Los métodos de inhibición de la expresión de un gen diana se pueden aplicar a cualquier gen de mamífero que se desee silenciar, inhibiéndose así específicamente su expresión. Los ejemplos de genes que pueden ser dirigidos para el silenciamiento incluyen, sin limitación, genes de desarrollo que incluyen, pero no se limitan a, moléculas de adhesión, inhibidores de cinasas de ciclina, miembros de la familia Wnt, miembros de la familia Pax, miembros de la familia de la hélice Winged, miembros de la familia Hox, citocinas/linfocinas y sus receptores, factores de crecimiento/diferenciación y sus receptores, y neurotransmisores y sus receptores; (2) oncogenes que incluyen, pero no se limitan a, ABLI, BCL1, BCL2, BCL6, CBFA2, CBL, CSFIR, ERBA, ERBB, EBRB2, ETS1, ETS1, ETV6, FGR, FOS, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MDM2, MLL, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, NRAS, PIM1, PML, RET, SRC, TAL1, TCL3 y YES; (3) genes supresores de tumores que incluyen, pero no se limitan a, APC, BRCA1, BRCA2, MADH4, MCC, NF1, NF2, RB1, TP53 y WT1; (4) enzimas que incluyen, pero no se limitan a, ACP desaturasas e hidroxilasas, ADP-glucosa piroforilasas, ATPasas, alcohol deshidrogenasas, amilasas, amiloglucosidasas, catalasas, celulasas, ciclooxigenasas, decarboxilasas, dextrinasas, ADN y ARN polimerasas, galactosidasas, glucanasas, glucosa oxidasas, GTPasas, helicasas, hemicelulasas, integrasas, invertasas, isomerasas, cinasas, lactasas, lipasas, lipoxigenasas, lisozimas, pectinesterasas, peroxidadas, fosfatasas, fosfolipasas, fosforilasas, poligalacturonasas, proteinasas y peptidasas, pulanasas, recombinasas, transcriptasas
- 15 20 25 inversas, topoisomerasas y xilanasas, y (5) uno cualquiera de los genes enumerados en la Sección V anterior aún no nombrados en (1) a (4) de este párrafo.

Además de la inhibición de genes *in vivo*, el experto apreciará que los ARNbc de la presente invención son útiles en una amplia variedad de aplicaciones *in vitro*. Dichas aplicaciones *in vitro* incluyen, por ejemplo, investigación científica y comercial (por ejemplo, elucidación de vías fisiológicas, descubrimiento y desarrollo de fármacos), y diagnósticos médicos y veterinarios. En general, el método implica la introducción del ARNbc en una célula usando técnicas conocidas (por ejemplo, absorción mediante procesos celulares, o por agentes auxiliares o dispositivos, tales como electroporación y lipofección), luego mantener la célula durante un tiempo suficiente para obtener la degradación de un transcrito de ARNm del gen diana.

VII. Métodos de identificación de ARNbc que tiene elevada estabilidad

- 35 En aún otro aspecto, la divulgación se refiere a métodos de identificación de ARNbc que tiene elevada estabilidad en tejidos y fluidos biológicos, tales como suero. Los ARNbc que tienen elevada estabilidad tienen resistencia potenciada a la degradación, por ejemplo, por productos químicos o nucleasas (exonucleasas y endonucleasas) que normalmente degradan las moléculas de ARN. Se conocen bien en la técnica los métodos de detección del aumento en la estabilidad de ácido nucleico. Cualquier ensayo capaz de medir o detectar diferencias entre un ARNbc de prueba y un ARNbc de control (es decir, un ARNbc que es estructuralmente similar o idéntico a la molécula de prueba (modificada) de ARNbc, excepto que carece de al menos uno de los nucleótidos sustituidos o modificados presentes en el ARNbc de prueba) en cualquier parámetro físico medible puede ser adecuado para su uso en los métodos de la presente invención. En general, debido al efecto inhibitorio de un ARNbc sobre un gen diana, la actividad o expresión requiere que la molécula siga intacta, la estabilidad de un ARNbc particular se puede evaluar indirectamente observando o midiendo una propiedad asociada a la expresión del gen. Así, se puede determinar la estabilidad relativa de un ARNbc observando o detectando (1) una ausencia o disminución observable en el nivel de la proteína codificada por el gen diana, (2) una ausencia o disminución observable en el nivel del producto de ARNm del gen diana, y (3) un cambio o pérdida en el fenotipo asociado a la expresión del gen diana. En el contexto de un tratamiento médico, se puede evaluar la estabilidad de un ARNbc basándose en el grado de la inhibición de la expresión o función del gen diana, que a su vez se puede evaluar basándose en un cambio en la patología del paciente, tal como reducción en síntomas, remisión, o un cambio en el estado de enfermedad.

En un caso, el método comprende preparar un ARNbc como se describe en la Sección III anterior (por ejemplo, mediante síntesis química), incubar el ARNbc con una muestra biológica, luego analizar e identificar los ARNbc que presentan una elevada estabilidad en comparación con un ARNbc de control.

- 55 En un caso a modo de ejemplo, el ARNbc se produce *in vitro* mezclando/hibridando cadenas complementarias de ARN monocatenario, preferentemente en una relación molar de al menos aproximadamente 3:7, más preferentemente en una relación molar de aproximadamente 4:6, y lo más preferentemente en cantidades molares esencialmente iguales (es decir, una relación molar de aproximadamente 5:5). Preferentemente, las cadenas de ARN monocatenario se desnaturalizan antes de la mezcla/hibridación, y el tampón en que tiene lugar la mezcla/reacción de hibridación contiene una sal, preferentemente cloruro de potasio. Se pueden sintetizar cadenas

de ARN monocatenarias por síntesis en fase sólida usando, por ejemplo, un sintetizador Expedite 8909 (Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Alemania), como se ha descrito anteriormente.

Se incuban ARNbc con una muestra biológica en las condiciones suficientes u óptimas para la función enzimática. Después de incubar con una muestra biológica, se analiza la estabilidad del ARNbc por medios convencionales en la técnica, por ejemplo usando electroforesis en gel de ARN como se ejemplifica en el presente documento. Por ejemplo, cuando la muestra es suero, el ARNbc se puede incubar a una concentración de 1-10 μM , preferentemente 2-8 μM , más preferentemente 3-6 μM , y lo más preferentemente 4-5 μM . La temperatura de incubación es preferentemente entre 25 °C y 45 °C, más preferentemente entre 35 °C y 40 °C, y lo más preferentemente aproximadamente 37 °C.

La muestra biológica usada en la etapa de incubación se puede obtener de tejidos, células, líquidos biológicos o aislados de los mismos. Por ejemplo, la muestra biológica se puede aislar de un sujeto, tal como un organismo entero o un subconjunto de sus tejidos o células. La muestra biológica también puede ser una parte componente del sujeto, tal como un líquido corporal, que incluye, pero no se limita a, sangre, suero, moco, líquido linfático, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, saliva, líquido amniótico, sangre del cordón amniótico, orina, líquido vaginal y semen. Preferentemente, la muestra biológica es un suero derivado de una muestra de sangre de un sujeto. El sujeto es preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano.

En otro caso, el método comprende seleccionar un ARNbc que tiene elevada estabilidad midiendo los niveles de expresión de proteína de un gen diana en una célula tras la introducción del ARNbc. En este caso, el ARNbc de la invención inhibe la expresión de un gen diana en la célula, y así el método comprende seleccionar un ARNbc que induce una reducción medible en la expresión de un gen diana en comparación con un ARNbc de control. Los ensayos que miden los niveles de expresión de proteínas se pueden realizar aproximadamente 24 horas tras la captación del ARNbc por la célula (por ejemplo, usando técnicas de transferencia Northern, ensayos de protección de RNasa, o ensayos de QC-PCR como se conocen en la técnica). Preferentemente, además de probar los niveles de proteína de un gen diana a intervalos de tiempo regulares tras la absorción del ARNbc de prueba, los niveles de proteína del gen diana también se miden en los mismos puntos de tiempo tras la absorción de un ARNbc de control. Entonces se comparan los niveles de proteína de la muestra de prueba y la muestra de control. Se selecciona el ARNbc de prueba por tener elevada estabilidad cuando existe una reducción medible en los niveles de expresión en comparación con el ARNbc de control. Se pueden hacer mediciones de proteína usando cualquier técnica reconocida en la técnica (véanse, por ejemplo, Chiang, M.Y., et al., *J. Biol Chem.* (1991) 266:18162-71; y Fisher, T, et al., *Nucl. Acids Res.* (1993) 21:3857).

Se puede medir la capacidad de una composición de ARNbc para inhibir la síntesis de proteínas usando una variedad de técnicas que se conocen en la técnica. Por ejemplo, se puede usar análisis de transferencia Northern para medir la presencia de ARN que codifica una proteína diana. Se pueden medir el nivel del ARNm específico producido por la proteína diana, por ejemplo, usando PCR. Debido a que ARNbc dirige la degradación específica de secuencia de ARNm endógeno a través de iARN, los métodos de selección de la invención engloban cualquier técnica que sea capaz de detectar una reducción medible en el ARN diana. En otro ejemplo más, se pueden usar transferencias Western para medir la cantidad de proteína diana presente. En aún otro caso, se puede detectar un fenotipo influido por la cantidad de la proteína. Se conocen bien en la técnica las técnicas para realizar transferencias Western (véase, por ejemplo, Chen, et al., *J. Biol. Chem.* 271:28259).

Se pueden fusionar una porción del gen diana con un gen indicador de manera que se transcriba el gen indicador. Monitorizando un cambio en la expresión del gen indicador en presencia del ARNbc, es posible determinar la eficacia del ARNbc en la inhibición de la expresión del gen indicador. Entonces se comparan los niveles de expresión del gen indicador en presencia del ARNbc de prueba frente a un ARNbc de control. Se selecciona el ARNbc de prueba por tener elevada estabilidad cuando existe una reducción medible en niveles de expresión del gen indicador en comparación con el ARNbc de control. Los ejemplos de genes indicadores útiles para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, los que codifican luciferasa, cloranfenicol acetil transferasa (CAT), β -galactosidasa y fosfatasa alcalina. Se describen genes indicadores adecuados, por ejemplo, en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York (Ausubel, F.A., et al., eds., 1989); Gould, S. J., y S. Subramani, *Anal. Biochem.* (1988) 7:404-408; Gorman, C. M., et al., *Mol. Cell. Biol.* (1982) 2:1044-1051; y Selden, R., et al., *Mol. Cell. Biol.* (1986) 6:3173-3179.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención. Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Ejemplos

La invención que se describe ahora, en general, será más fácilmente entendida como referencia a los siguientes ejemplos, que están incluidos simplemente para fines de ilustración de ciertos aspectos y casos de la presente invención, y no pretenden limitar la invención.

5 Ejemplo 1Síntesis de ARN

Se produjeron ARN monocatenarios por síntesis en fase sólida usando un sintetizador Expedite 8909 (Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Frankfurt Str. 129b, 64293 Darmstadt, Alemania). Se obtuvieron otros fosforamiditos de ribonucleósido convencionales y nucleósidos inmovilizados sobre CPG (vidrio de poro controlado), un material de soporte poroso, de ChemGenes Corp. (Ashland Technology Center, 200 Homer Ave., Ashland, MA 01721), o de Proliga Biochemie GmbH (Georg Hyken Str. 14, Hamburgo, Alemania). Se obtuvieron otros reactivos de síntesis de Mallinckrodt Baker Co. (Im Leuschnerpark 4, 64347 Griesheim, Alemania). Se purificaron productos de síntesis en bruto con HPLC (System Gold, Beckman Coulter GmbH, 85702 Unterschleissheim, Alemania) usando una columna de intercambio aniónico (DNAPac PA 100, Dionex GmbH, Am Wörtzgarten 10, 65510 Idstein). Se determinó el rendimiento logrado por medio de absorción de luz UV a 260 nm.

Se produjeron los ARN usados en el estudio calentando cantidades equimolares de ARN sentido y antisentido monocatenarios en tampón de hibridación (NaCl 100 mM, Na₃PO₄ 20 mM, pH 6,8) a 90 ± 5 °C y luego enfriándolos lentamente hasta temperatura ambiente durante aproximadamente 3 horas.

Ejemplo 2**20** Extracción de suero humano

Para la coagulación, se incubó inmediatamente una muestra de sangre en un tubo de recogida oscuro (SST Vacutainer 9,5 mL; BD Vacutainer Systems, Becton Dickinson & Co., Belliver Industrial Estate, Plymouth PL6 7BP, Gran Bretaña) durante 2 horas a 20 °C. Después de eso, se separó suero como líquido de sobrenadante de la sangre aglutinada en una centrifugadora a 4 °C y 3000 x g durante 15 minutos (Megafuge 1.0; Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products, 37520 Osterode, Alemania), se transfirió a recipientes de reactivo estériles de 1,5 mL (La Fontaine, International GmbH & Co. KG, Daimlerstr. 14, 68753 Waghäusel, Alemania), y se almacenaron a -20 °C.

Ejemplo 3Incubación de ARNbc con suero

Se dispusieron 60 µL de suero sobre hielo en cada uno de los recipientes de reactivo de 1,5 mL. Posteriormente, se añadieron 12 µL de una disolución 25 µM de ARNbc a cada uno y se mezcló minuciosamente durante 5 segundos usando un Vortex Genie2 (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY 11716). La concentración de ARNbc fue 4,16 µM en un volumen de 72 µL. Entonces se incubaron las muestras en un bloque térmico a 37 °C durante 15, 30, 60, 120 y 240 minutos, y luego se ultracongelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Se ultracongeló una muestra en nitrógeno sin incubación a 37 °C inmediatamente después de que se añadiera ARNbc al suero. Las muestras se almacenaron a -80 °C.

Ejemplo 4Aislamiento de ARNbc

Con la excepción de una disolución de fenol, se esterilizaron por filtración todos los reactivos usados para el aislamiento y se enfriaron sobre hielo antes de uso.

Las muestras que se almacenaron a -80 °C se dispusieron sobre hielo; entonces se añadieron 450 µL de una disolución 0,5 M de NaCl a cada una, y se mezclaron minuciosamente después de descongelar durante 5 segundos.

Se hizo la extracción de ARNbc de la disolución de muestra en recipientes de reactivo Phase Lock Gel (Eppendorf AG, 22331 Hamburgo, Alemania). Entonces se centrifugaron recipientes de reactivo Phase Lock Gel durante 2 minutos a 16.100 x g y 4 °C, y luego se dispusieron sobre hielo. Posteriormente, las muestras se transfirieron a los recipientes de reactivo Phase Lock Gel, a los que se añadieron 500 µL de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (Roti-Phenol, Carl Roth GmbH & Co., Schoemperlenstr. 1-5, 76185 Karlsruhe, Alemania) y 300 µL de cloroformo. Entonces se mezclaron minuciosamente las muestras durante 30 segundos con un VXR basic Vibrax de IKA, tipo VX2E (IKA Works do Brasil, Ltd, Taquora, RJ 22713-000, Brasil). La posterior separación de fases se hizo por medio de centrifugación a 4 °C y 16.100 x g durante 15 minutos. Se transfirió cuidadosamente la fase acuosa superior a un nuevo recipiente de región estéril. Después de eso, se añadieron 40 µL de disolución 3 M de acetato sódico enfriada en hielo (pH 5,2) a la fase acuosa. Se mezcló minuciosamente la disolución resultante durante 20 segundos. Después de la adición de 1 µL de Pellet Paint (coprecipitante de NF, Novagen, 441 Charmony Drive,

Madison WI 53719) se mezcló durante 5 segundos. A partir de aquí, se añadió 1 mL de etanol enfriado en hielo y se agitó durante 20 segundos. Para precipitar el ARNbc, la disolución se enfrió durante una hora a -80 °C.

5 Se sedimentó el ARNbc precipitado por medio de centrifugación a 12.000 x g durante 30 minutos a 4 °C; entonces se vertió cuidadosamente el líquido de sobrenadante, y se lavó el sedimento con 500 µL de etanol al 70 % enfriado en hielo (Mallinckrodt Baker B.V., 7400 AA Deventer, Holanda). Después de agitar durante 2 segundos, se centrifugó nuevamente a 12.000 x g y 4 °C durante 10 minutos, y se vertió el líquido de sobrenadante por encima del ARNbc sedimentado. Se recogió la disolución restante en la parte inferior del recipiente centrifugando durante 20 segundos a 16.100 x g y 4 °C, y luego se pipeteó. Se secó el ARNbc sedimentado sin cubrir durante 5 minutos a temperatura ambiente.

10 Entonces se disolvió el ARNbc secado mezclando minuciosamente durante 2 minutos en 30 µL de tampón de aplicación de gel (95 % v/v de formamida, EDTA 10 mM, 0,025 % p/v de xilencianol, 0,025 % p/v de azul de bromofenol).

Ejemplo 5

Análisis por estabilidad de ARNbc

15 Se hizo análisis del ARNbc por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante en geles de 0,8 mm de espesor y 200 x 280 mm de tamaño con urea 8 M y 16 % v/v de formamida.

Composición de un gel (50 mL):

24 g de urea	(99,5 % de p.a.; Carl Roth GmbH & Co., Schoemperlenstr. 1-5, 76185 Karlsruhe, Alemania),
18 mL de acrilamida	(gel Rotiphoresis 29:1 [40 %]; Carl Roth GmbH & Co., Schoemperlenstr. 1-5, 76185 Karlsruhe, Alemania),
5 mL 10 x TBE	(Tris 1 M [ultra-calidad; Carl Roth GmbH & Co., Schoemperlenstr. 1-5, 76185 Karlsruhe, Alemania]
Ácido bórico 1 M	[99,8 % de p.a., %; Carl Roth GmbH & Co., Schoemperlenstr. 1-5, 76185 Karlsruhe, Alemania],
EDTA 25 mM	[Sigma-Aldrich Chemie GmbH P.O. 1120, 89552 Steinheim, Alemania] en agua desionizada),
Formamida 8 mM	(Merck-Schuchardt, 85662 Hohenbrunn, Alemania),
50 µL de TEMED	(N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH P.O. 1120, 89552 Steinheim, Alemania), y
200 µL de APS	Persulfato de amonio (10 % p/v) (Gibco BRL Life Technologies, Invitrogen GmbH, Karlsruhe Technology Park, Emmy Noether Str. 10, 76131 Karlsruhe, Alemania).

20 Después de verter el gel entre dos placas de vidrio y polimerizarlo durante aproximadamente 30 minutos, se hizo una primera serie en un aparato ejecutado en gel durante aproximadamente 30 minutos a 45 mA (fuente de potencia: Power PAC 3000; Bio Rad Laboratories 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547). Se usó 1 x TBE como tampón de electroforesis en gel. Para ecualizar la temperatura del gel se fijó una placa de aluminio de 3 mm de espesor a una de las placas de vidrio.

25 Antes de la aplicación sobre el gel, se calentaron las muestras durante 5 minutos hasta 100 °C, se enfriaron sobre hielo, y se centrifugaron durante 20 segundos a 13.000 x g y 4 °C. Se aplicaron 10 µL de cada muestra. Además, se aplicó una muestra de ARNbc que no se incubó con suero (2 µL de ARNbc 25 µM en 10 µL de tampón de aplicación de gel).

30 Se hizo electroforesis durante 90 minutos a 45 mA. Finalmente, el gel se tiñó durante 30 minutos con Stains-all (40 mg de Stains-all (bromuro de 1-etil-2-[3(3-etilnafto[1,2-d]tiazolina-2-ilidino)-2-metilpropenil]nafto-[1,2-d]tiazolio); Sigma-Aldrich Chemie GmbH P.O. 1120, 89552 Steinheim, Alemania) + 400 mL de formamida (Merck-Schuchardt, 85662 Hohenbrunn, Alemania) + 400 mL de H₂O), y luego se destiñó en un baño de agua durante aproximadamente 30-60 minutos. Los geles desteñidos se digitalizaron usando un aparato de fotodocumentación (Imagen Master VDS Pharmacia Biotech; Amersham Biosciences Europe GmbH, Munzinger Str. 9, 79111 Friburgo; por D & R, Israel) y luego se barrieron en modo de color (Silver Fast, UMAX Technologies, Inc., 10460 Brockwood Road, Dallas, TX 75238; Adobe Photoshop Elements, Adobe Systems, Inc., 345 Park Ave., San Jose, CA 95110-2704).

35 Se analizaron las estabilidades en suero de cada uno de los siguientes ARNbc.

1. BCL20, cuya cadena S1 no codificante es complementaria a una secuencia de la cadena codificante del gen BCL-2 humano (número de acceso de Gene Bank M13994):

S2: 5'- GGC GAC UUC GCC GAG AUG UCC-3' (SEQ ID NO: 7)

S1: 3'-CG CCG CUG AAG CGG CUC UAC AGG-5' (SEQ ID NO: 8)

2. B133, cuya cadena S1 no codificante es complementaria a una secuencia de la cadena codificante del gen bcl-2 humano (Nº de acceso de Gene Bank M13994):

S2: 5'- ACC GGG CAU CUU CUC CUC CCA-3' (SEQ ID NO: 9)

S1: 3'-CG UGG CCC GUA GAA GAG GAG GGU-5' (SEQ ID NO: 10)

3. P3, cuya cadena S1 no codificante es complementaria a una secuencia de la cadena codificante del gen PLK1 humano (Nº de acceso de Gene Bank X75932):

S2: 5'-GAU CAC CCU CCU UAA AUA UUU-3' (SEQ ID NO: 11)

S1: 3'-CG CUA GUG GGA GGA AUU UAU AAA-5' (SEQ ID NO: 12)

- 5 Las Figuras 1 a 3 muestran cada una de izquierda a derecha una separación electroforética en gel de un ARNbc sin y después de 0, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos de incubación en suero. La Figura 1 muestra la separación electroforética en gel de ARNbc de BCL20, que muestra degradaciones despreciables durante la incubación. Figura 2, separación electroforética en gel de ARNbc de B133, en la que ninguno de los pares terminales es pares G-C. B133 se degrada a una mayor velocidad que ARNbc de BCL20. Figura 3, separaciones electroforéticas en gel de ARNbc de P3. ARNbc convencional, tal como el ARNbc de P3 mostrado en la Figura 3, se degrada casi inmediatamente en suero. El ARNbc de P3 presenta pares de nucleótidos G-C complementarios solo en un extremo de la estructura bicatenaria.

Ejemplo 6

Temperatura de fusión elevada de ARNip específicos de Plk1 modificados

- 15 Se determinaron las temperaturas de fusión de dos ARNip específicos de Plk1 (es decir, P2 y P4) que se diferencian solo en sus extremos protuberantes de nucleótidos de 3'. Se sintetizaron los siguientes dos ARNip por métodos convencionales:

1. P2: 5'-UCAGACACCUCACUUAUUAUU-3' (SEQ ID NO: 44)

3'-UUAGUCUGUGGAGUGAAUAA-5' (SEQ ID NO: 45)

2. P4: 5'-GCAGACACCUCACUUAUUAUU-3' (SEQ ID NO: 46)

3'-CGCGUCUGUGGAGUGAAUAA-5' (SEQ ID NO: 47)

- 20 Para hibridar las estructuras de dúplex, se calentaron disoluciones 20 µM en PBS/NaCl 100 mM hasta 95 °C y luego se enfriaron a una velocidad de 1 °C/min. Se diluyeron las disoluciones 1:4 con el mismo tampón. Se midieron las temperaturas de fusión (Tm) para los dúplex en un espectrómetro de UV/VIS Beckmann Coulter a 260 nm. Se aumentó la temperatura desde 30 °C hasta 95 °C a 0,5 °C y se midió la absorbancia de la disolución después de cada aumento de 1 °C. A partir de aquí, se siguió el mismo procedimiento en el enfriamiento. Se calculó la Tm usando el algoritmo promedio de 2 puntos incluido en el paquete de software proporcionado con el espectrómetro de UV.

- 25 Se determina la Tm como 67 °C para P2 y 69,6 °C para P4. Puesto que la única diferencia entre las estructuras de dúplex se encuentra en el extremo protuberante de 3', es razonable llegar a la conclusión de que el extremo protuberante está causando esta diferencia.

- 30 Se puede entender la elevada Tm mirando las contribuciones de energía libre de los extremos protuberantes de nucleótidos. El extremo protuberante CG de 3' contribuye a la mayor disminución en la energía libre para el dúplex (véase Freier, S.M., et al., PNAS 1986, 83:9373-9377). Esto reduce eficazmente la cantidad de deshilachado (es decir, apertura y cierre) de los extremos de cadena. Puesto que se cree que es necesaria la apertura del dúplex para que las exonucleasas accedan para degradar los extremos de cadena, esta elevada estabilidad termodinámica del extremo de dúplex se traduce en una mayor resistencia a la degradación exonucleolítica.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ALNYLAM EUROPE AG

<120> ÁCIDO RIBONUCLEICO BICATENARIO CON ELEVADA EFICACIA EN UN ORGANISMO

5

<130> P3104 EP/2

<150> EP 03013296.3

<151> 13-06-2003

10

<150> 60/479.354

<151> 18-06-2003

<150> EP 04002374.9

15

<151> 03-02-2004

<160> 47

<170> PatentIn Ver. 3.3

20

<210> 1

<211> 22

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 1

caggaccucg ccgcugcaga cc 22

30

<210> 2

<211> 24

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

ES 2 905 724 T3

<400> 2

ggucugcagc ggcgaggucc uggc 24

<210> 3

5

<211> 22

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 3

gccuuugugg aacuguacgg cc 22

15

<210> 4

<211> 24

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 4

ggccguacag uuccacaaag gcau 24

25

<210> 5

<211> 24

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 5

35

cuucuccgcc ucacaccgcu gcaa 24

<210> 6

ES 2 905 724 T3

<211> 22

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 6

gcagcggugu gagcggaga ag 22

10

<210> 7

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 7

20

ggcgacuucg ccgagaugc c 21

<210> 8

<211> 23

<212> ARN

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30

<400> 8

ggacaucucg gcaagucgc cgc 23

<210> 9

<211> 21

35

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

ES 2 905 724 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 9

5 accgggcauc uucuccuccc a 21

<210> 10

<211> 23

<212> ARN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 10

ugggaggaga agaugcccg ugc 23

<210> 11

<211> 21

20 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25

<400> 11

gaucaccuc cuuaauuu u 21

<210> 12

30 <211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 12

ES 2 905 724 T3

aaauuuuaa ggaggugau cgc 23

<210> 13

<211> 21

5 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

10

<400> 13

acggcuagcu gugaaagguc c 21

<210> 14

15 <211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 14

ggaccuuuca cagcuagccg uga 23

25 <210> 15

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 15

caaggagcag ggacaaguua c 21

35

<210> 16

<211> 23

ES 2 905 724 T3

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 16

guaacuuguc ccugcuccuu gaa 23

10 <210> 17

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 17

cacguacgcg gaauacuucg aaa 23

20

<210> 18

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 18

30 ucgaaguauu ccgcuacgu g 21

<210> 19

<211> 21

<212> ARN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 905 724 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 19

ccgcuugacu gcagagagug c 21

5

<210> 20

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 20

15

acucucugca gucaagcggc u 21

<210> 21

<211> 22

<212> ARN

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25

<400> 21

caucuucuuc aaggacgacg gc 22

<210> 22

<211> 22

30

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35

<400> 22

cgucguccuu gaagaagaug gu 22

<210> 23

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 23

10 gguggcgcug gaugguaagc cgc 23

<210> 24

<211> 23

<212> ARN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 24

20 ggcuuaccu ccagcgccac cau 23

<210> 25

<211> 22

25 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30

<400> 25

ucccaggag gccugcgga gc 22

<210> 26

35 <211> 22

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

ES 2 905 724 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 26

5 ucccgaggc cuccugggga gg 22

<210> 27

<211> 22

<212> ARN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 27

ugcagcuucg aagccucaca ga 22

<210> 28

<211> 22

20 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25

<400> 28

ugugaggcuu cgaagcugca gc 22

<210> 29

30 <211> 22

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 29

ES 2 905 724 T3

uggggagaga guucugagga uu 22

<210> 30

<211> 22

5 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

10

<400> 30

uccucagaac ucucucccca gc 22

<210> 31

15 <211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 31

accuccgcaa caacuacgcg c 21

25 <210> 32

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 32

gcguaguugu ugcgaggua g 21

35

<210> 33

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 33

guagaccuug cuacugccug c 21

10 <210> 34

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 34

aggcaguagc aaggucuacc a 21

20

<210> 35

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 35

30 caugacggaa cuagagacag c 21

<210> 36

<211> 21

<212> ARN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 905 724 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 36

ugucucuagu uccgucaugg u 21

5

<210> 37

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 37

15

cucuacgcuu guacgaggag c 21

<210> 38

<211> 21

<212> ARN

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25

<400> 38

uccucguaca agcguagaga c 21

<210> 39

<211> 21

30

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35

<400> 39

cagacuucgg aguaccugcg c 21

ES 2 905 724 T3

<210> 40
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 40
gcagguacuc cgaagucugu u 21

10

<210> 41
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 41
caucuucuuc aaggacgacg gc 22

20

<210> 42
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30

<400> 42
cgucguccuu gaagaagaug gu 22

<210> 43
<211> 23
<212> DNA
<213> Mus sp.

35

ES 2 905 724 T3

<400> 43

aagctggccc tggacatgga gat 23

<210> 44

5

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 44

ucagacaccu cacuuuuuau u 21

15

<210> 45

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 45

aauaaaga gaggugucug auu 23

25

<210> 46

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 46

35

gcagacaccu cacuuuuuau u 21

<210> 47

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 47

aauaaaga gaggugucg cgc 23

10

REIVINDICACIONES

1. Un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), en donde dicho ARNbc comprende una cadena de ARN antisentido y una cadena de ARN sentido, en donde dicha cadena de ARN antisentido tiene una secuencia de nucleótidos de menos de 30 nucleótidos de longitud y es sustancialmente complementaria a un ARN diana, en donde
- 5 (a) al menos un extremo de dicho ARNbc comprende un extremo protuberante de 1 a 2 nucleótidos,
- (b) dicho ARNbc comprende al menos un nucleótido químicamente modificado, en donde dicho al menos un nucleótido químicamente modificado es un nucleótido de 2'-O-metilo,
- (c) el nucleótido sin emparejar adyacente al par de bases del nucleótido terminal comprende una base de purina,
- 10 (d) dicho ARNbc está conjugado con un ligando, en donde dicho ligando se selecciona de
- (i) agrupaciones de hidratos de carbono,
- (ii) polietilenglicoles,
- (iii) péptidos de administración,
- (iv) agentes de reticulación, y
- 15 (v) conjugados de porfirina,
- (e) al menos un nucleótido del ARNbc comprende un grupo fosforotioato o fosforoditioato, y en donde sustancialmente complementario significa que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia
2. El ARNbc de la reivindicación 1, en donde dicho ligando es una agrupación de hidratos de carbono.
3. El ARNbc de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha cadena antisentido de ARN tiene 20 a 23 nucleótidos de longitud
- 20 4. El ARNbc de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los pares de bases terminales en ambos extremos de dichos ARNbc son pares G-C, o al menos dos de los cuatro pares de bases terminales consecutivos en ambos extremos son pares de bases G-C.

Figura 1

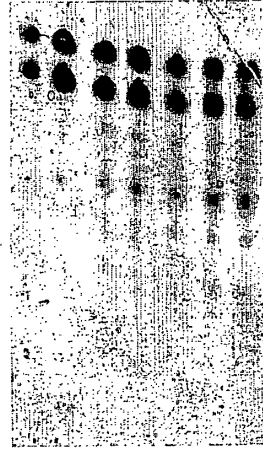


Figura 2

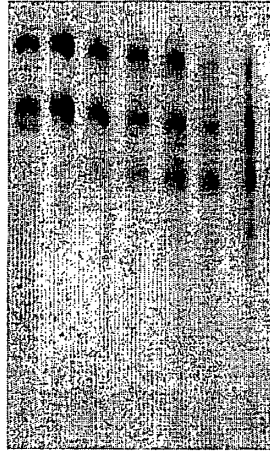


Figura 3

