



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 872 349**

⑮ Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/713 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2013** PCT/US2013/059341

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014** WO14043289

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2013** E 13773450 (5)

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.05.2021** EP 2895607

⑭ Título: **Moléculas de oligonucleótidos bicatenarios para DDIT4 y métodos de uso de las mismas**

⑩ Prioridad:

12.09.2012 US 201261699884 P

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.11.2021

⑬ Titular/es:

QUARK PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
7999 Gateway Boulevard, Suite 310
Newark, CA 94560, US

⑭ Inventor/es:

FEINSTEIN, ELENA;
AVKIN-NACHUM, SHARON;
KALINSKI, HAGAR y
METT, IGOR

⑭ Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 872 349 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

Moléculas de oligonucleótidos bicatenarios para DDIT4 y métodos de uso de las mismas

Listado de secuencias

5 Esta aplicación incorpora secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos que están presentes en el archivo denominado "232_PCT1_ST25.txt", que tiene un tamaño de 13 kilobytes, y que fue creado el 12 de septiembre de 2013 en formato de máquina IBM-PCT, que tiene un sistema operativo compatible con MS-Windows.

Campo de la invención

10 En este documento se proporcionan moléculas de ácido nucleico, composiciones farmacéuticas que las comprenden y métodos de uso de las mismas para la regulación a la baja de la expresión de DDIT4, cuya inhibición es útil para tratar a un paciente que padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o un trastorno asociado con la expresión del gen DDIT4.

Antecedentes de la invención

DDIT4

15 El gen DDIT4 (RTP801, REDD1) fue informado por primera vez por el cesionario de la presente solicitud. Las patentes de los Estados Unidos Nos. 6,455,674, 6,555,667, y 6,740,738, y las patentes relacionadas del cesionario de la presente solicitud, describen el polinucleótido y polipéptido RTP801 y los anticuerpos dirigidos hacia el polipéptido. RTP801 representa una diana genética única para el factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1) que puede regular la patogénesis inducida por hipoxia independientemente de factores de crecimiento tales como el VEGF. Las moléculas de ARN bicatenario, que regulan negativamente el DDIT4, se describen, entre otras, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 20

7,741,299; 8,067,570; 7,872,119 y la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2011/0028531, al cesionario de la presente solicitud. Se describen moléculas adicionales en la Patente de los Estados Unidos No. 7,655,788 y la Publicación de la Patente de los Estados Unidos No. 2010/0285038.

20 Las Publicaciones de Solicitud de los Estados Unidos Nos. 2010/0292301 y 2011/0112168, y las Publicaciones de Patentes Nos. PCT WO 2011/066475, WO 2011/084193, WO 2011/085056 y WO 2012/078536 al cesionario de la presente solicitud, describen secuencias de ácido nucleico y modificaciones útiles para generar moléculas de ARNbc.

25 Las Publicaciones de Solicitud de los Estados Unidos Nos. 2011/0142917, 2011/0229557 y 2012/0141378 al cesionario de la presente solicitud, describen composiciones y métodos de uso que comprenden ARNbc de DDIT4.

Una solicitud de patente que describe unidades estructurales fenil hidrocarbilo útiles para unir covalentemente a ARNbc, al cesionario de la presente solicitud, se presenta concomitantemente con la solicitud actual.

30 Moléculas, composiciones, métodos y kits útiles para la regulación a la baja de DDIT4 y que exhiben al menos uno de biodisponibilidad aumentada, biodistribución mejorada, mayor tiempo de circulación del suero, mayor estabilidad del suero, disminución del aclaramiento del suero, captación celular mejorada, actividad fuera de la diana reducida, inmunogenicidad reducida, liberación endosomal mejorada, entrega específica mejorada al tejido o célula diana y una mayor actividad de eliminación en comparación con las contrapartes de ARNbc sin modificar.

35 Sumario de la invención

Se proporcionan en este documento moléculas de ácido nucleico útiles para regular negativamente la expresión de DDIT4, composiciones y kits que las comprenden y métodos de uso de los mismos. Las composiciones, métodos y kits pueden implicar el uso de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ácido nucleico de interferencia corto (ANip), ARN de interferencia corto (ARNip), ARN bicatenario (ARNbc), micro-ARN (miARN), ARNmc (ARN monocatenario), ARNbc sustrato dicer, ARNip asimétrico o ARN corto de la horquilla (ARNhp, sintético o expresado de forma recombinante)) que se unen a una secuencia de nucleótidos (tal como una secuencia de ARNm) o porción de la misma, que codifica DDIT4, por ejemplo, la secuencia codificante de ARNm (SEQ ID NO: 1) para DDIT4 humano, que codifica el polipéptido exemplificado por SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones preferidas o ejemplos descritos en este documento, las moléculas, composiciones, métodos y kits descritos en este documento regulan a la baja o inhiben la expresión del gen DDIT4. En diversas realizaciones o ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico es un compuesto de ARNbc no modificado o químicamente modificado tal como un ARNip o ARNhp que regula negativamente la expresión de DDIT4.

40 Las moléculas y composiciones de ácido nucleico químicamente modificadas proporcionadas en este documento exhiben propiedades beneficiosas, que incluyen al menos una de estabilidad sérica aumentada, captación celular mejorada, actividad fuera de la diana reducida, inmunogenicidad reducida, liberación endosómica mejorada, administración específica mejorada al tejido o célula diana y una mayor actividad de desactivación/regulación a la baja en comparación con las correspondientes moléculas de ácido nucleico no modificadas.

Además, en este documento se describen métodos de tratamiento de o prevenir la incidencia o la gravedad de un trastorno, enfermedad, lesión o afección en un sujeto que lo necesite, en los que la enfermedad o afección y/o un síntoma o patología asociada con la misma se asocia con la expresión del gen DDIT4, tal como un trastorno, enfermedad, lesión, afección o patología seleccionada entre trastornos respiratorios, enfermedades y afecciones oculares, deficiencias auditivas (incluida la pérdida de audición), trastornos neurodegenerativos, lesión de la médula espinal, trastornos microvasculares, enfermedades y trastornos de atrofia de la piel, enfermedades relacionadas con la angiogénesis y la apoptosis. En algunos aspectos, el sujeto es un mamífero. En un aspecto preferido, el sujeto es un sujeto humano.

Otras afecciones en las que la expresión de DDIT4 juega un papel en la etiología de la enfermedad o en la progresión de la enfermedad están abarcadas por los métodos y usos descritos en este documento.

10 El objeto de la presente invención es una molécula de ácido nucleico bicatenario como se define en la reivindicación 1, cuya molécula de ácido nucleico bicatenario es capaz de regular negativamente la expresión de ARNm de DDIT4 (SEQ ID NO: 1). Las reivindicaciones dependientes se refieren a realizaciones particulares de las mismas.

De acuerdo con lo anterior, se proporciona en este documento según la presente invención una molécula de ácido nucleico bicatenario capaz de regular negativamente la expresión de ARNm de DDIT4 (SEQ ID NO: 1) que tiene la estructura (A2) 15 que se establece a continuación:



en la que cada uno de N², N y N' es un ribonucleótido modificado o no modificado, o una unidad estructural no convencional;

20 en la que cada uno de (N)x y (N')y es un oligonucleótido en la que cada N o N' consecutivo está unido al N o N' adyacente mediante un enlace covalente;

en la que cada uno de x y y es 18;

en la que N² está unido covalentemente a (N')y;

25 en la que N¹ está unido covalentemente a (N)x y se empareja erróneamente con el ARNm de DDIT4 (SEQ ID NO: 1), y se selecciona del grupo que consiste en: uridina natural o modificada, y desoxirribouridina;

en la que z'' puede estar presente o ausente, pero si está presente es una unidad estructural de protección o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 5' de N2-(N')y;

30 en la que cada uno de Z y Z' está presente o ausente independientemente, pero si está presente tiene independientemente 1-5 nucleótidos consecutivos, unidades estructurales no nucleótidos, unidades estructurales no convencionales o una combinación de los mismos o una unidad estructural de fármaco o vitamina unida covalentemente en el terminal 3' de la hebra en la que está presente;

en la que la secuencia de (N')y es complementaria a la secuencia de (N)x; y en la que la secuencia de N²-(N')y comprende una hebra sentido y N¹-(N)x comprende una hebra antisentido expuesta en el par de oligonucleótidos SEQ ID NOS: 21 y 30.

35 Otro objeto de la presente invención es una composición como se define en la reivindicación 13 que comprende la molécula de ácido nucleico bicatenario de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

Otro objeto de la presente invención es el uso como se define en la reivindicación 14 en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto mediante el cual la expresión del gen DDIT4 se asocia con la etiología o progresión de la enfermedad o trastorno.

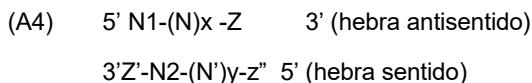
40 Se describen además en este documento moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ARNbc) capaces de dirigirse al ARNm de DDIT4 (SEQ ID NO: 1); en la que (a) la molécula de ácido nucleico es un dúplex que incluye una hebra sentido y una hebra antisentido complementaria; (b) cada hebra de la molécula de ácido nucleico tiene independientemente de 18 a 49 nucleótidos de longitud; (c) una secuencia de 18 a 49 nucleótidos de la hebra antisentido es complementaria a una secuencia de 18 a 49 nucleótidos consecutiva en el ARNm de DDIT4; y (d) la hebra sentido y la hebra antisentido comprenden pares de oligonucleótidos expuestos en cualquiera de las SEQ ID NOS:3 y 12; SEQ ID NOS:4 y 13; SEQ ID NOS:5 y 14; SEQ ID NOS:6 y 15; SEQ ID NOS:7 y 16; SEQ ID NOS:8 y 17; SEQ ID NOS:9 y 18; SEQ ID NOS:10 y 19; o SEQ ID NOS:11 y 20; o

una sal farmacéuticamente aceptable de tal molécula.

45 En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico comprende ribonucleótidos no modificados y/o ribonucleótidos modificados y/o unidades estructurales no convencionales. En algunos ejemplos descritos

en este documento, la molécula de ácido nucleico comprende además una vitamina, una unidad estructural de fármaco, una unidad estructural de protección y/o salientes terminales 3'.

En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico comprende un desajuste con el ARNm diana de DDIT4 en la posición 1 de la hebra antisentido (terminal 5'). En otros ejemplos descritos en este documento, las 5 moléculas de ácido nucleico comprenden una unidad estructural de ADN en la posición 1 de la hebra antisentido. Tales estructuras dúplex se describen en este documento como estructura (A4), que se establece a continuación:



en la que cada N1, N2, N y N' es independientemente un nucleótido modificado o no modificado, o una unidad estructural 10 no convencional;

en la que cada uno de (N)x y (N')y es un oligonucleótido en la que cada N o N' consecutivo está unido al N o N' adyacente mediante un enlace covalente;

en la que cada uno de x y y es independientemente un número entero entre 17 y 39;

en la que N2 está unido covalentemente a (N')y;

15 en la que N¹ está unido covalentemente a (N)x y se empareja erróneamente con el ARNm de DDIT4 o es un nucleótido de ADN complementario del ARNm de DDIT4 y se selecciona del grupo que consiste en natural o modificado: uridina, desoxirribouridina, ribotimidina, desoxirribotimidina, adenosina o desoxiadenosina;

en la que z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es una unidad estructural de protección o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 5' de N2-(N')y;

20 en la que cada uno de Z y Z' está presente o ausente independientemente, pero si está presente tiene independientemente 1-5 nucleótidos consecutivos, unidades estructurales no nucleótidos, unidades estructurales no convencionales o una combinación de los mismos o una unidad estructural de fármaco o vitamina unida covalentemente en el terminal 3' de la hebra en la que está presente; en la que la secuencia de (N')y es complementaria a la secuencia de (N)x; y en la que la secuencia de (N')y comprende una hebra sentido y (N)x comprende una hebra antisentido expuesta en una cualquiera de los pares de oligonucleótidos SEQ ID NOS:3 y 12; SEQ ID NOS:4 y 13; SEQ ID NOS:5 y 14; SEQ ID NOS:6 y 15; SEQ 25 ID NOS:7 y 16; SEQ ID NOS:8 y 17; SEQ ID NOS:9 y 18; SEQ ID NOS:10 y 19; o SEQ ID NOS:11 y 20.

Las moléculas abarcadas por la descripción de la estructura (A4) como se describe adicionalmente en este documento también se denominan en este documento "18+1" o "18+1 mer". En los ejemplos preferidos descritos en este documento, N¹ (nucleótido en la posición 1 de la hebra antisentido) se empareja erróneamente con el ARNm de DDIT4 y la hebra sentido y la hebra antisentido comprenden pares de secuencias establecidos en cualquiera de las SEQ ID NOS:22 y 31; SEQ ID NOS:23 y 32; SEQ ID NOS:24 y 33; SEQ ID NOS:25 y 34; SEQ ID NOS:26 y 35; SEQ ID NOS:27 y 36; SEQ ID NOS:28 y 37; o SEQ ID NOS:29 y 38.

En las estructuras A2 y A4, la hebra antisentido se muestra en la orientación 5'>3' y la hebra sentido se muestra en la orientación 3'>5', mientras que en la SEQ ID NO y las tablas las secuencias se proporcionan en la orientación 5'>3'.

35 En algunos ejemplos descritos en este documento, la hebra sentido (N')y y la hebra antisentido (N)x cada una de las cuales tiene 18 nucleótidos de longitud, útiles para generar compuestos de ARNbc, se presentan en la tabla 1. Las hebras sentido preferidas y hebras antisentido complementarias, cada una de las cuales tiene 19 nucleótidos de longitud, se muestran en la tabla 2, más adelante.

40 En determinados ejemplos de la estructura (A4), (N)x de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARNbc) como se describe en este documento incluye una secuencia correspondiente a una cualquiera de las secuencias antisentido SEQ ID NO: 12-20. En determinados ejemplos preferidos, la molécula de ácido nucleico es un dúplex de 19 nucleótidos de longitud y (N)x y (N')y comprenden los pares de secuencias que se muestran en la tabla 1. En determinados ejemplos preferidos, la molécula de ácido nucleico es un dúplex de 19 nucleótidos de longitud y N1-(N)x y N2-(N')y comprenden los pares de secuencias que se muestran en la tabla 2.

45 En algunos ejemplos de la estructura (A4), la secuencia de (N')y es completamente complementaria a la secuencia de (N)x. En diversos ejemplos, la secuencia de N2-(N')y es completamente complementaria a la secuencia de N1-(N)x. En algunos ejemplos, (N)x comprende una secuencia antisentido que es completamente complementaria de aproximadamente 17 a aproximadamente 39 nucleótidos consecutivos en el ARNm de DDIT4 establecido en SEQ ID NO: 1. En otros ejemplos, (N)x comprende una secuencia antisentido que es sustancialmente complementaria de 50 aproximadamente 17 a aproximadamente 39 nucleótidos consecutivos en el ARNm de DDIT4 establecido en SEQ ID NO: 1.

En algunos ejemplos de la estructura (A4), N1 y N2 forman un par de bases Watson-Crick. En otros ejemplos, N1 y N2 forman un par de bases que no es Watson-Crick.

En algunos ejemplos de la estructura (A4), $x=y=18$, $x=y=19$ o $x=y=20$. En ejemplos preferidos, $x=y=18$. Cuando $x=18$ en N1-(N)x, N¹ se refiere a la posición 1 y las posiciones 2-19 se incluyen en (N)18 en la hebra antisentido. Cuando $y=18$ en N2-(N')y, N2 se refiere a la posición 19 y las posiciones 1-18 se incluyen en (N')18 en la hebra sentido.

En algunos ejemplos de la estructura (A4), N1 está unido covalentemente a (N)x y se empareja erróneamente con el ARNm de DDIT4 establecido en SEQ ID NO: 1. En diversos ejemplos, N1 está unido covalentemente a (N)x y es una unidad estructural de ADN complementaria al ARNm de DDIT4 establecido en SEQ ID NO: 1. En algunos ejemplos, se forma un par de bases entre un desoxirribonucleótido y un ribonucleótido, por ejemplo entre T y rA o entre dU y rA.

10 En algunas realizaciones de la estructura (A2) o ejemplos de la estructura (A4), la molécula de ácido nucleico bicatenario es un ARNip, ANip o miARN. Las moléculas de ácido nucleico bicatenario que se proporcionan en este documento también se denominan "dúplex". En algunas realizaciones de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ARNbc) según la estructura (A2) o ejemplos de la estructura (A4) como se describe en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario es un ARNip químicamente modificado.

15 En algunos ejemplos descritos en este documento, N1 se empareja erróneamente con la secuencia diana de ARNm de DDIT4 y es una uridina natural o una uridina modificada (por ejemplo, modificada con 2'OMe azúcar). En algunos ejemplos descritos en este documento, N1 se empareja erróneamente con la secuencia diana de ARNm de DDIT4 y es una riboadenosina natural o una riboadenosina modificada.

20 En algunos ejemplos descritos en este documento, $x=y=18$ y N1 se selecciona de una uridina natural, un uracilo modificado, una adenosina natural, una adenina modificada.

En algunos ejemplos descritos en este documento, $x=y=18$ y N1 es un nucleótido de ARN no modificado o modificado (esto es, modificado con 2'-O-metil azúcar) complementario a la secuencia diana de ARNm de DDIT4.

En algunos ejemplos descritos en este documento, $x=y=18$ y N1 es un nucleótido de ADN complementario a la secuencia diana de ARNm de DDIT4 y es una desoxiuridina, una desoxiadenosina o una timidina.

25 En algunos ejemplos descritos en este documento, N1 es una adenosina o desoxiadenosina y se empareja erróneamente con la guanosina o la citosina en el ARNm diana (SEQ ID NO: 1).

En algunos ejemplos descritos en este documento, N1 es uridina o desoxiuridina y se empareja erróneamente con la guanosina o la citosina en el ARNm diana (SEQ ID NO: 1).

30 En algunos ejemplos descritos en este documento, N1 es una adenosina o desoxiadenosina y se empareja erróneamente con la adenosina en el ARNm diana (SEQ ID NO: 1).

En algunos ejemplos descritos en este documento, N1 es uridina o desoxiuridina y se empareja erróneamente con la uridina en el ARNm diana (SEQ ID NO: 1).

En los ejemplos preferidos descritos en este documento, N2 es complementario de N1.

35 En algunos ejemplos de la estructura (A4), N1 es una uridina modificada con 2'OMe azúcar o una adenosina modificada con 2'OMe azúcar. En determinados ejemplos de la estructura (A4), N2 es un ribonucleótido modificado con 2'OMe azúcar o un desoxirribonucleótido.

En algunas realizaciones según la presente invención, la molécula de ácido nucleico bicatenario comprende una hebra sentido y una hebra antisentido descritas como DDIT4_41a (SEQ ID NOS:21 y 30). En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario comprende una hebra sentido y una hebra antisentido descritas como DDIT4_43a (SEQ ID NOS:22 y 31). En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario comprende una hebra sentido y una hebra antisentido descritas como DDIT4_46a (SEQ ID NOS:23 y 32). En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario comprende una hebra sentido y una hebra antisentido descritas como DDIT4_55a (SEQ ID NOS:24 y 33). En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario comprende una hebra sentido y una hebra antisentido descritas como DDIT4_59a (SEQ ID NOS:25 y 34). En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario comprende una hebra sentido y una hebra antisentido descritas como DDIT4_60a (SEQ ID NOS:26 y 35). En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario comprende una hebra sentido y una hebra antisentido descritas como DDIT4_61a (SEQ ID NOS:27 y 36). En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario comprende una hebra sentido y una hebra antisentido descritas como DDIT4_62a (SEQ ID NOS:28 y 37). En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario comprende una hebra sentido y una hebra antisentido descritas como DDIT4_63u (SEQ ID NOS:29 y 38).

40 45 50 En algunos ejemplos, el ARNbc incluye una hebra antisentido y una hebra sentido que tiene secuencias antisentido y sentido de DDIT4 seleccionadas de una cualquiera de los pares establecidos en la tabla 2. En algunas realizaciones

según la presente invención, las hebras antisentido y sentido se seleccionan de los pares de oligonucleótidos identificados en este documento como DDT4_41a (SEQ ID NOS: 21 y 30). En algunos ejemplos descritos en este documento, las hebras antisentido y sentido se seleccionan de los pares de oligonucleótidos identificados en este documento como DDT4_43a (SEQ ID NOS: 22 y 31), DDT446a (SEQ ID NOS: 23 y 32), DDT4_55a (SEQ ID NOS: 24 y 33), DDT4_59a (SEQ ID NOS: 25 y 34), DDT4_60a (SEQ ID NOS: 26 y 35), DDT4_61a (SEQ ID NOS: 27 y 36), DDT4_62a (SEQ ID NOS: 28 y 37), y DDT4_63u (SEQ ID NOS: 29 y 38).

5 En algunas realizaciones según la presente invención, la molécula de ácido nucleico bicatenario incluye la hebra antisentido establecida en SEQ ID NO: 30 y la hebra sentido establecida en SEQ ID NO: 21; identificada en este documento como DDT4_41a. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico bicatenario tiene la estructura

5' UAUGCUACAGUACUGAGGG -Z 3' (SEQ ID NO: 30 antisentido)



3' Z'-AUACGAUGUCAUGACUCCC – z" 5' (SEQ ID NO: 21 sentido)

10

en la que cada uno de A, C, G, U es independientemente un ribonucleótido modificado o no modificado, o una unidad estructural no convencional;

en la que cada "l" representa el apareamiento de bases entre los ribonucleótidos/unidades estructurales no convencionales;

15

en la que cada uno de Z y Z' está presente o ausente independientemente, pero si está presente tiene de 1-5 nucleótidos consecutivos independientemente, unidades estructurales no nucleótidos, unidades estructurales no convencionales o una combinación de los mismos o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 3' de la hebra en la que está presente; y

20

en la que z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es una unidad estructural de protección o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 5' de N2-(N')y; o

una sal farmacéuticamente aceptable de tal molécula.

25

En algunas realizaciones, se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la hebra antisentido (SEQ ID NO: 30) incluye una o más pirimidinas y/o purinas modificadas con 2'OMe azúcar, un 2'-5' ribonucleótido en la posición 5, 6, 7 u 8, y un saliente de nucleótido o no nucleótido terminal 3'(terminal 3'). En algunas realizaciones, la hebra sentido (SEQ ID NO: 21) incluye una o más pirimidinas y/o purinas modificadas con 2'OMe azúcar, opcionalmente 4 o 5 2'5' nucleótidos consecutivos en las posiciones 3' terminal o penúltima, un nucleótido o una unidad estructural no nucleótido unida covalentemente en el terminal 3' y una unidad estructural de caperuza unida covalentemente en el terminal 5' (terminal 5'). En otras realizaciones, la hebra sentido (SEQ ID NO: 21) incluye una o más pirimidinas 2'OMe, una unidad estructural nucleótido o no nucleótido unida covalentemente en el terminal 3' y una unidad estructural de caperuza unida covalentemente en el terminal 5'.

30

En algunas realizaciones, se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la hebra antisentido (SEQ ID NO: 30) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones (5'>3') 1, 3, 8, 11 y 15, un 2'-5' ribonucleótido en la posición 6, y una unidad estructural C3Pi-C30H o C3Pi-C3Pi unida covalentemente al terminal 3'; y la hebra sentido (SEQ ID NO: 21) se selecciona de una hebra sentido que incluye

35

a) ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones (5'>3') 16 y 18, una unidad estructural C3OH o C3Pi unida covalentemente en el terminal 3'; y una unidad estructural de desoxirribonucleótido abásica invertida unida covalentemente en el terminal 5'; o

b) ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones (5'>3') 16 y 18, una unidad estructural C30H o C3Pi unida covalentemente en el terminal 3'; y una unidad estructural amino C6 unida covalentemente en el terminal 5'; o

40

c) ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones (5'>3') 16 y 18, una unidad estructural C30H o C3Pi unida covalentemente en el terminal 3'; y una unidad estructural THNB unida covalentemente en el terminal 5'; o

d) ribonucleótidos unidos en 2'-5' en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19, una unidad estructural C30H o C3Pi unida covalentemente en el terminal 3' y opcionalmente una unidad estructural de protección (esto es, unidad estructural desoxirribonucleótido abásica invertida) unida covalentemente en el terminal 5'.

Tales moléculas incluyen opcionalmente un Pi (fosfato inorgánico) o una unidad estructural conjugada unida covalentemente al terminal 5' de la hebra sentido en lugar de una unidad estructural de protección.

Se proporciona en este documento una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la hebra antisentido (SEQ ID NO: 30) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones (5'>3') 1, 3, 8, 11 y 15, un 2'-5' ribonucleótido en la posición 6, y una unidad estructural C3Pi-C3Pi unida covalentemente al terminal 3'; y la hebra sentido (SEQ ID NO: 21) que tiene ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones (5'>3') 16 y 18, un saliente terminal C3Pi 3'; y una unidad estructural de desoxirribonucleótido abásica invertida unida covalentemente en el terminal 5'.

5 En este documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la hebra antisentido (SEQ ID NO: 30) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones (5'>3') 1, 3, 8, 11 y 15, un 2'-5' ribonucleótido en la posición 6, y una unidad estructural C3Pi-C3Pi unida covalentemente al terminal 3'; y la hebra sentido (SEQ ID NO: 21) que tiene ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones (5'>3') 16 y 18, un saliente terminal C3Pi 3'; y una unidad estructural amino C6 unida covalentemente en el terminal 5'.

10 En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario incluye la hebra antisentido establecida en SEQ ID NO: 31 y la hebra sentido establecida en SEQ ID NO: 22; identificada en este documento como DDIT4_43a. En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario tiene la estructura

5' UGUCUGUAAGAUAGCUGCC -Z 3' (SEQ ID NO: 31 antisentido)



3' Z'-ACAGACAUUCUAUCGACGG -z" 5' (SEQ ID NO: 22 sentido)

20 en la que cada uno de A, C, G, U es independientemente un ribonucleótido modificado o no modificado, o una unidad estructural no convencional;

en la que cada "l" representa el apareamiento de bases entre los ribonucleótidos/unidades estructurales no convencionales;

25 en la que cada uno de Z y Z' está presente o ausente independientemente, pero si está presente tiene independientemente 1-5 nucleótidos consecutivos, unidades estructurales no nucleótidos, unidades estructurales no convencionales o una combinación de los mismos o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 3' de la hebra en la cual está presente; y

en la que z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es una unidad estructural de protección o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 5' de N2-(N')y; o una

sal farmacéuticamente aceptable de tal molécula.

30 En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario incluye la hebra antisentido establecida en SEQ ID NO: 32 y la hebra sentido establecida en SEQ ID NO: 23; identificada en este documento como DDIT4_46a. En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario tiene la estructura

5' UACUCGCAGUCCGAGCUCU -Z 3' (SEQ ID NO: 32 antisentido)



3' Z'-AUGAGCGUCAGGCUCGAGA -z" 5' (SEQ ID NO: 23 sentido)

35 en la que cada uno de A, C, G, U es independientemente un ribonucleótido modificado o no modificado, o una unidad estructural no convencional;

en la que cada "l" representa el apareamiento de bases entre los ribonucleótidos/unidades estructurales no convencionales;

en la que cada uno de Z y Z' está presente o ausente independientemente, pero si está presente tiene independientemente 1-5 nucleótidos consecutivos, unidades estructurales no nucleótidos, unidades estructurales no convencionales o una combinación de los mismos o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 3' de la hebra en la cual está presente; y

5 en la que z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es una unidad estructural de protección o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 5' de N2-(N')y; o una sal farmacéuticamente aceptable de tal molécula.

En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario incluye la hebra antisentido establecida en SEQ ID NO: 33 y la hebra sentido establecida en SEQ ID NO: 24; identificada en este documento como 10 DDIT4_55a. En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario tiene la estructura

5' UGUUCUAGAUGGAAGACCC -Z 3' (SEQ ID NO: 33 antisentido)



3' Z'-ACAAGAUCUACCUUCUGGG – z" 5' (SEQ ID NO: 24 sentido)

en la que cada uno de A, C, G, U es independientemente un ribonucleótido modificado o no modificado, o una unidad estructural no convencional;

15 en la que cada "l" representa el apareamiento de bases entre los ribonucleótidos/unidades estructurales no convencionales;

en la que cada uno de Z y Z' está presente o ausente independientemente, pero si está presente tiene de 1-5 nucleótidos consecutivos independientemente, unidades estructurales no nucleótidos, unidades estructurales no convencionales o una combinación de los mismos o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 3' de la hebra 20 en la que está presente; y

en la que z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es una unidad estructural de protección o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 5' de N2-(N')y; o

una sal farmacéuticamente aceptable de tal molécula.

En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario incluye la hebra antisentido establecida en la SEQ ID NO: 34 y la hebra sentido establecida en la SEQ ID NO: 25; identificada en este documento como DDIT4_59a. En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario tiene la estructura

5' UCUGCCUCUAGUCUCCACC -Z 3' (SEQ ID NO: 34 antisentido)



3' Z'-AGACGGAGAUCAGAGGUGG – z" 5' (SEQ ID NO: 25 sentido)

en la que cada uno de A, C, G, U es independientemente un ribonucleótido modificado o no modificado, o una unidad estructural no convencional;

en la que cada "l" representa el apareamiento de bases entre los ribonucleótidos/unidades estructurales no convencionales;

en la que cada uno de Z y Z' está presente o ausente independientemente, pero si está presente tiene de 1-5 nucleótidos consecutivos independientemente, unidades estructurales no nucleótidos, unidades estructurales no convencionales o una combinación de los mismos o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 3' de la hebra 35 en la que está presente; y

en la que z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es una unidad estructural de protección o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 5' de N2-(N')y; o

una sal farmacéuticamente aceptable de tal molécula.

En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario incluye la hebra antisentido establecida en SEQ ID NO: 35 y la hebra sentido establecida en SEQ ID NO: 26; identificada en este documento como DDIT4_60a. En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario tiene la estructura

5' UUCGUCUCUGUCUUGGAGG -Z 3' (SEQ ID NO: 35 antisentido)



3' Z'-AAGCAGAGACAGAACCUCC -z" 5' (SEQ ID NO: 26 sentido)

en la que cada uno de A, C, G, U es independientemente un ribonucleótido modificado o no modificado, o una unidad estructural no convencional;

10 en la que cada "l" representa el apareamiento de bases entre los ribonucleótidos/unidades estructurales no convencionales;

en la que cada uno de Z y Z' está presente o ausente independientemente, pero si está presente tiene independientemente 1-5 nucleótidos consecutivos, unidades estructurales no nucleótidos, unidades estructurales no convencionales o una combinación de los mismos o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 3' de la hebra en la cual está presente; y

15 en la que z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es una unidad estructural de protección o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 5' de N2-(N')y; o

una sal farmacéuticamente aceptable de tal molécula.

En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario incluye la hebra antisentido establecida en SEQ ID NO: 36 y la hebra sentido establecida en SEQ ID NO: 27; identificada en este documento como DDIT4_61a. En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario tiene la estructura

5' UACAACUCAAUGAGCUUCC -Z 3' (SEQ ID NO: 36 antisentido)



3' Z'-AUGUUGAGUUACUCGAAGG -z" 5' (SEQ ID NO: 27 sentido)

en la que cada uno de A, C, G, U es independientemente un ribonucleótido modificado o no modificado, o una unidad estructural no convencional;

25 en la que cada "l" representa el apareamiento de bases entre los ribonucleótidos/unidades estructurales no convencionales;

en la que cada uno de Z y Z' está presente o ausente independientemente, pero si está presente tiene independientemente 1-5 nucleótidos consecutivos, unidades estructurales no nucleótidos, unidades estructurales no convencionales o una combinación de los mismos o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 3' de la hebra en la 30 cual está presente; y

en la que z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es una unidad estructural de protección o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 5' de N2-(N')y; o

una sal farmacéuticamente aceptable de tal molécula.

En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario incluye la hebra antisentido establecida en SEQ ID NO: 37 y la hebra sentido establecida en SEQ ID NO: 28; identificada en este documento como DDIT4_62a. En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario tiene la estructura

5' UAGGCUUAAACGCAGCUGC -Z 3' (SEQ ID NO: 37 antisentido)



3' Z'-AUCCGAAUUUGCGUCGACG -z" 5' (SEQ ID NO: 28 sentido)

en la que cada uno de A, C, G, U es independientemente un ribonucleótido modificado o no modificado, o una unidad estructural no convencional;

5 en la que cada "l" representa el apareamiento de bases entre los ribonucleótidos/unidades estructurales no convencionales;

en la que cada uno de Z y Z' está presente o ausente independientemente, pero si está presente tiene independientemente 1-5 nucleótidos consecutivos, unidades estructurales no nucleótidos, unidades estructurales no convencionales o una combinación de los mismos o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 3' de la hebra en la cual está presente; y

10 en la que z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es una unidad estructural de protección o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 5' de N2-(N')y; o una sal farmacéuticamente aceptable de tal molécula.

En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario incluye la hebra antisentido establecida en SEQ ID NO: 38 y la hebra sentido establecida en SEQ ID NO: 29; identificada en este documento como DDIT4_63u. En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario tiene la estructura

15

5' AUUCAUGCUACAGUACUG -Z 3' (SEQ ID NO: 38 antisentido)

3' Z'-UAAAGUACGAUGUCAUGAC -z" 5' (SEQ ID NO: 29 sentido)

en la que cada "l" representa el apareamiento de bases entre los ribonucleótidos;

20 en la que cada uno de A, C, G, U es independientemente un ribonucleótido modificado o no modificado, o una unidad estructural no convencional;

en la que cada "l" representa el apareamiento de bases entre los ribonucleótidos/unidades estructurales no convencionales; en la que cada uno de Z y Z' está presente o ausente independientemente, pero si está presente tiene independientemente 1-5 nucleótidos consecutivos, unidades estructurales no nucleótidos, unidades estructurales no convencionales o una combinación de los mismos o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 3' de la hebra en la cual está presente; y

25 en la que z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es una unidad estructural de protección o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 5' de N2-(N')y; o una sal farmacéuticamente aceptable de tal molécula.

En realizaciones preferidas, la hebra sentido y la hebra antisentido tienen cada una de 19 nucleótidos de longitud y la molécula de ácido nucleico comprende el par de secuencias SEQ ID NOS: 21 y 30. En los ejemplos preferidos descritos en este documento, la hebra sentido y la hebra antisentido tienen cada una 19 nucleótidos de longitud y la molécula de ácido nucleico comprende un par de secuencias seleccionado de cualquiera de las SEQ ID NOS:22 y 31; SEQ ID NOS:23 y 32; SEQ ID NOS:24 y 33; SEQ ID NOS:25 y 34; SEQ ID NOS:26 y 35; SEQ ID NOS:27 y 36; SEQ ID NOS:28 y 37; o SEQ ID NOS:29 y 38.

30

35 Los ácidos nucleicos proporcionados en este documento son preferiblemente moléculas de ARNbc que poseen modificaciones que pueden aumentar la actividad, aumentar la estabilidad, facilitar la captación celular y la liberación endosómica, potenciar la retención de plasma y/o minimizar la toxicidad en comparación al correspondiente compuesto de ARNbc sin modificar. Estas moléculas, cuando se mezclan con un vehículo farmacéutico, proporcionan compuestos

terapéuticos eficaces, seguros y compatibles con el paciente, útiles en el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos.

Las moléculas de ARNbC proporcionadas en este documento son oligonucleótidos modificados químicamente bicatenarios. En algunos ejemplos descritos en este documento, el oligonucleótido sentido y el oligonucleótido antisentido útiles para generar las moléculas de ARNbC modificadas químicamente, los ARN se seleccionan de oligonucleótidos de hebra sentido establecidos en SEQ ID NOS: 3-11 y el oligonucleótido de cadena antisentido correspondiente establecido en SEQ ID NOS: 12-20. En los ejemplos preferidos descritos en este documento, la hebra antisentido es complementaria a una secuencia contigua de 18 nucleótidos en el ARNm de DDIT4 y el ribonucleótido terminal 3' de la hebra antisentido (esto es, la posición 19 en un 19-mer) se empareja erróneamente con el ARNm de DDIT4. En los ejemplos preferidos descritos en este documento, una G o C en el ARNm de DDIT4 diana se empareja erróneamente con una U, A o T en el terminal 5' de la hebra antisentido (posición 1 de AS). En los ejemplos preferidos descritos en este documento, la hebra sentido y la hebra antisentido comprenden pares de secuencias establecidos en cualquiera de SEQ ID NOS:22 y 31; SEQ ID NOS:23 y 32; SEQ ID NOS:24 y 33; SEQ ID NOS:25 y 34; SEQ ID NOS:26 y 35; SEQ ID NOS:27 y 36; SEQ ID NOS:28 y 37; o SEQ ID NOS:29 y 38.

En diversos ejemplos descritos en este documento, en una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, molécula de ARNbC) como se describe en este documento, la hebra antisentido puede tener de 18 a 49 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o 49 nucleótidos de longitud); o 18-35 nucleótidos de longitud; o 18-30 nucleótidos de longitud; o 18-25 nucleótidos de longitud; o 18-23 nucleótidos de longitud; o 19-21 nucleótidos de longitud; o 25-30 nucleótidos de longitud; o 26-28 nucleótidos de longitud. En algunos ejemplos descritos en este documento, el ARNbC es una molécula asimétrica, por ejemplo, 15 nucleótidos en la hebra sentido y 18-25 nucleótidos en la hebra antisentido. En algunos ejemplos descritos en este documento, el ARNbC es una molécula en tandem o ARNestrella con tres brazos de ARNbC. En algunos ejemplos descritos en este documento, el ARNbC es un sustrato dicer, por ejemplo, de 27 a 49 nucleótidos de longitud. En algunos ejemplos de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARNbC) como se describe en este documento, la hebra antisentido tiene 19 nucleótidos de longitud. De manera similar, la hebra sentido de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, molécula de ARNbC) como se describe en este documento puede tener de 15 a 49 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o 49 nucleótidos de longitud); o 15-35 nucleótidos de longitud; o 15-30 nucleótidos de longitud; o 15-25 nucleótidos de longitud; o 18-23 nucleótidos de longitud; o 19-21 nucleótidos de longitud; o 25-30 nucleótidos de longitud; o 26-28 nucleótidos de longitud. En algunos ejemplos de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARNbC) como se describe en este documento, la hebra sentido tiene 19 nucleótidos de longitud. En algunos ejemplos de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARNbC) como se describe en este documento, cada una de las hebras antisentido y la hebra sentido tienen 19 nucleótidos de longitud. La región dúplex de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, molécula de ARNbC) como se describe en este documento puede tener de 18-49 nucleótidos de longitud (por ejemplo, Aproximadamente 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o 49 nucleótidos de longitud), 18-35 nucleótidos de longitud; o 18-30 nucleótidos de longitud; o 18-25 nucleótidos de longitud; o 18-23 nucleótidos de longitud; o 18-21 nucleótidos de longitud; o 25-30 nucleótidos de longitud; o 25-28 nucleótidos de longitud. En diversos ejemplos de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARNbC) como se describe en este documento, la región dúplex tiene 19 nucleótidos de longitud. En algunos ejemplos descritos en este documento, se prefiere un ARNip asimétrico corto (como se describe en Chu and Rana, 2008).

En determinados ejemplos descritos en este documento, la hebra sentido y la hebra antisentido de un ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico de ARNbC) como se proporciona en este documento son hebras de oligonucleótidos separadas. En algunos ejemplos descritos en este documento, la hebra sentido separada y la hebra antisentido forman una estructura bicatenaria, también conocida como dúplex, mediante enlaces de hidrógeno, por ejemplo, apareamiento de bases Watson-Crick. En algunos ejemplos descritos en este documento, uno o más pares de nucleótidos forman un apareamiento de bases que no son de Watson-Crick. En algunos ejemplos descritos en este documento, la hebra sentido y la hebra antisentido son dos hebras separadas que están unidas covalentemente entre sí. En otros ejemplos descritos en este documento, la hebra sentido y las hebras antisentido son parte de un único oligonucleótido que tiene una región tanto de sentido como antisentido; en algunos ejemplos preferidos descritos en este documento, el oligonucleótido tiene una estructura de horquilla.

En determinados ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico bicatenario (ARNbc) que es simétrica con respecto a los salientes y tiene un extremo romo en ambos extremos. En otros ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ARNbC que es simétrica con respecto a los salientes y tiene un nucleótido o un no nucleótido o una combinación de un saliente de nucleótidos y no nucleótidos en ambos extremos de la molécula de ARNbC. En determinados ejemplos preferidos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ARNbC que es asimétrica con respecto a los salientes y tiene un extremo romo en un extremo de la molécula y un saliente en el otro extremo de la molécula. En algunos ejemplos descritos en este documento, una molécula de ARNbC asimétrica tiene un saliente 3'en un lado de un dúplex que se encuentra en la hebra sentido; y un extremo romo en el otro lado de la molécula que se encuentra tanto en el terminal 5' de la hebra sentido como en el terminal 5' de la hebra antisentido. En algunos ejemplos descritos en este documento, una molécula de ARNbC asimétrica tiene un saliente 5' en un lado de un dúplex que se encuentra en la hebra sentido; y un

extremo romo en el otro lado de la molécula que se encuentra tanto en el terminal 3' de la hebra sentido como en el terminal 3' de la hebra antisentido. En otros ejemplos descritos en este documento, una molécula de ARNbc asimétrica tiene un saliente 3'en un lado de un dúplex que se encuentra en la hebra antisentido; y un extremo romo en el otro lado de la molécula que se encuentra tanto en el terminal 5' de la hebra sentido como en el terminal 5' de la hebra antisentido.

5 En algunos ejemplos descritos en este documento, una molécula de ARNbc asimétrica tiene un saliente 5' en un lado de un dúplex que se encuentra en la hebra antisentido; y un extremo romo en el otro lado de la molécula que se encuentra tanto en el terminal 3' de la hebra sentido como en el terminal 3' de la hebra antisentido. En algunos ejemplos descritos en este documento, los salientes son salientes de nucleótidos, en otros ejemplos descritos en este documento, los salientes son salientes no nucleótidos. En algunos ejemplos descritos en este documento, los salientes son salientes 5'; en los ejemplos alternativos descritos en este documento, los salientes son salientes 3'.

10 En algunos ejemplos descritos en este documento, la hebra sentido incluye una unidad estructural de protección o una unidad estructural conjugada (z")

En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico tiene una estructura de horquilla (que tiene la hebra sentido y la hebra antisentido en un oligonucleótido), con una estructura de bucle en un extremo y un extremo romo en el otro extremo. En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico tiene una estructura de horquilla, con una estructura de bucle en un extremo y un extremo saliente en el otro extremo; en determinados ejemplos descritos en este documento, el saliente es un saliente 3'; en determinados ejemplos descritos en este documento, el saliente es un saliente 5'; en determinados ejemplos descritos en este documento, el saliente está en la hebra sentido; en determinados ejemplos descritos en este documento, el saliente está en la hebra antisentido.

15 20 La molécula de ácido nucleico (por ejemplo, molécula de ARNbc) descrita en este documento puede incluir una o más modificaciones o nucleótidos modificados tales como los descritos en este documento. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARNbc) como se proporciona en este documento puede incluir un nucleótido modificado que tiene un azúcar modificado; un nucleótido modificado que tiene una nucleobase modificada; o un nucleótido modificado que tiene un grupo fosfato modificado. De manera similar, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARNbc) como se proporciona en este documento puede incluir un esqueleto de fosfodiéster modificado y/o puede incluir un grupo fosfato terminal modificado.

25 Una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, molécula de ARNbc) como se proporciona en este documento puede tener uno o más ribonucleótidos que incluyen una unidad estructural de azúcar modificado, por ejemplo, como se describe en este documento. Un ejemplo no limitante de una unidad estructural de azúcar modificado es una unidad estructural de azúcar modificado con 2'alcoxi. En algunos ejemplos preferidos descritos en este documento, el ácido nucleico comprende al menos un ribonucleótido modificado con 2'-O-metil azúcar.

30 Una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, molécula de ARNbc) como se proporciona en este documento puede tener una o más nucleobase (s) modificadas (s), por ejemplo, como se describe en este documento.

35 Una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, molécula de ARNbc) como se proporciona en este documento puede tener una o más modificaciones en el esqueleto del fosfodiéster, por ejemplo, como se describe en este documento.

40 Una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARNbc) como se proporciona en este documento puede tener uno o más grupo (s) fosfato modificado (s), por ejemplo, como se describe en este documento.

45 En diversos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico proporcionada (por ejemplo, molécula de ARNbc) puede incluir una hebra antisentido no modificada y una hebra sentido que tiene una o más modificaciones. En algunos ejemplos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico proporcionada (por ejemplo, molécula de ARNbc) puede incluir una hebra sentido no modificada y una hebra antisentido que tiene una o más modificaciones. En los ejemplos preferidos descritos en este documento, la molécula de ácido nucleico proporcionada (por ejemplo, molécula de ARNbc) puede incluir uno o más nucleótidos modificados tanto en la hebra sentido como en la hebra antisentido.

50 Una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ARNbc) como se proporciona en este documento puede incluir un grupo fosfato escindible o no escindible en el terminal 5' de la hebra sentido y/o antisentido (esto es, un grupo fosfato 5' terminal). En algunos ejemplos descritos en este documento, una molécula de ARNbc descrita en este documento puede incluir un grupo fosfato en el terminal 5' de la hebra antisentido.

Una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ARNbc) como se proporciona en este documento puede incluir un grupo fosfato en el terminal 3' de la hebra sentido y/o antisentido (esto es, un grupo fosfato terminal 3'). En algunos ejemplos descritos en este documento, una molécula de ARNbc descrita en este documento puede incluir un grupo fosfato en el terminal 3' de la hebra antisentido.

En algunos ejemplos descritos en este documento, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ARNbc) descrita en este documento puede incluir un grupo fosfato en el terminal 3' de la hebra antisentido y la hebra sentido.

En algunos ejemplos descritos en este documento, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ARNbc) descrita en este documento, la hebra antisentido y la hebra sentido de la molécula de ácido nucleico no están fosforiladas ni en el terminal 3' ni en el terminal 5'.

5 En algunos ejemplos descritos en este documento, se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la hebra antisentido se selecciona de cualquiera de las SEQ ID NOS: 30-38 e incluye un nucleótido espejo o un ribonucleótido unido 2'-5' en una o más de las posiciones 5, 6, 7 u 8 (5'-3'), y una unidad estructural nucleótido o no nucleótido unida covalentemente en el terminal 3'. En algunos ejemplos descritos en este documento, la hebra antisentido incluye además uno o más ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar. En algunos ejemplos descritos en este documento, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 ribonucleótidos de pirimidina en la hebra antisentido son ribonucleótidos de pirimidina 10 modificados con 2'OMe azúcar. En algunos ejemplos descritos en este documento, la hebra sentido se selecciona de las secuencias complementarias establecidas en SEQ ID NOS: 21-29 e incluye 4 o 5 nucleótidos consecutivos enlazados 2'-5' en las posiciones 3' terminal o penúltima, una unidad estructural nucleótido o no nucleótido unida covalentemente en el terminal 3', uno o más ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar y una unidad estructural de protección unida covalentemente en el terminal 5'. La molécula de ARNbc puede incluir un fosfato 5' en la hebra antisentido.

15 15 En algunas realizaciones, se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la hebra sentido se establece en SEQ ID NO: 21 e incluye ribonucleótidos (5'>3') modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones 16 y 18, y un saliente de nucleótido o no nucleótido terminal 3' unido covalentemente al terminal 3'; y la hebra antisentido se establece en SEQ ID NO: 30 incluye ribonucleótidos (5'>3') modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones 1, 3, 8, 11 y 15, un saliente de nucleótido o no nucleótido terminal 3'; y una unidad estructural de protección unida covalentemente en el terminal 5'. En algunas realizaciones, la hebra antisentido incluye además un ribonucleótido unido en 2'-5' en la posición 20 6, en la posición 7 o en las posiciones 6 y 7. En algunas realizaciones, la unidad estructural de protección se selecciona de una unidad estructural desoxiabásica invertida, una unidad estructural amino c6 y THNB. En algunas realizaciones, la hebra sentido comprende un saliente de dTdT terminal 3' o un saliente de no nucleótidos C3Pi o C30H. En algunas 25 realizaciones, la hebra sentido incluye además ribonucleótidos modificados con 2'-O'metil azúcar en una o más de las posiciones 5, 8, 11 o 13.

30 En algunas realizaciones, se proporciona una molécula de ácido nucleico de doble hebra en la que la hebra con sentido se establece en SEQ ID NO: 21 e incluye (5' > 3') ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones 16 y 18, y un saliente de C3Pi no nucleotídico 3' terminal unido covalentemente al terminal 3'; y la hebra antisentido se establece en SEQ ID NO: 30 incluye (5' > 3') ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones 1, 3, 8, 11 y 15, un saliente C3Pi-C3OH no nucleótido terminal 3'; y una unidad estructural de protección unido covalentemente en el terminal 5'. En algunas realizaciones, la unidad estructural de protección se selecciona de una unidad estructural desoxiabásico invertida, una unidad estructural amino c6 y THNB. En algunas realizaciones, la hebra sentido incluye además ribonucleótidos modificados con 2'-O'metil azúcar en las posiciones 5, 8, 11 o 13.

35 40 En algunos ejemplos descritos en este documento, se proporciona una molécula de ácido nucleico de doble hebra en la que la hebra con sentido se establece en SEQ ID NO: 29 e incluye ribonucleótidos (5'>3') modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones 1, 4, 7, 9, 12 y 14, y un saliente de nucleótido o no nucleótido terminal 3' unido covalentemente al terminal 3'; y la hebra antisentido se expone en SEQ ID NO: 38 incluye ribonucleótidos modificados con azúcar (5' > 3') 2'OMe en las posiciones 3, 5 y 18, un saliente de nucleótido o no nucleótido terminal 3'; y una unidad estructural de protección unida covalentemente en el terminal 5'. En algunos ejemplos descritos en este documento, la hebra antisentido incluye además un ribonucleótido unido en 2'-5' en la posición 6, en la posición 7 o en las posiciones 6 y 7. En algunos ejemplos descritos en este documento, la unidad estructural de protección se selecciona de una unidad estructural desoxiabásica invertida, una unidad estructural amino c6 y THNB. En algunos ejemplos descritos en este documento, la hebra sentido comprende un saliente de dTdT terminal 3' o un saliente de no nucleótido C3Pi o C30H. En algunos ejemplos descritos en este documento, la hebra antisentido incluye además ribonucleótidos modificados con 2'-O'metil azúcar en 45 una o más de las posiciones 10, 11, 12 o 13.

50 En algunos ejemplos descritos en este documento, se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la hebra sentido se establece en SEQ ID NO: 29 e incluye ribonucleótidos (5'>3') modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones 3, 5 y 18, y un saliente de C3Pi no nucleótido terminal 3' unido covalentemente al terminal 3'; y la hebra antisentido se establece en SEQ ID NO: 38 incluye ribonucleótidos (5'>3') modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones 1, 3, 8, 11 y 15, un saliente C3Pi-C3OH no nucleótido terminal 3'; y una unidad estructural de protección unida covalentemente en el terminal 5'. En algunos ejemplos descritos en este documento, la unidad estructural de protección se selecciona de una unidad estructural desoxiabásica invertida, una unidad estructural amino c6 y THNB. En algunos ejemplos descritos en este documento, la hebra sentido incluye además ribonucleótidos modificados con 2'-O'metil azúcar en las posiciones 10 y 12 u 11 y 13.

55 60 En algunas realizaciones de la estructura (A2) o ejemplos de la estructura (A4), cada N en (N)x de SEQ ID NOS: 30-38 consiste en un ribonucleótido no modificado. En algunas realizaciones de la estructura (A2) o ejemplos de la estructura (A4), cada N' en (N')y de SEQ ID NOS: 21-29 consiste en un ribonucleótido no modificado. En ejemplos preferidos, al menos uno de N y/o N' comprende un ribonucleótido modificado químicamente o una unidad estructural no convencional. En algunos ejemplos, la unidad estructural no convencional se selecciona de un nucleótido espejo, un nucleótido unido a 2'5', un desoxirribonucleótido, un ácido nucleico treosa (TNA) y un análogo de ácido nucleico modificado con base de pirazolotriazina. En algunos ejemplos, la unidad estructural no convencional es un ribonucleótido unido a 2'5', un TNA o

un nucleótido espejo (esto es, una unidad estructural de L-ADN). En algunos ejemplos, al menos uno de N o N' comprende un ribonucleótido modificado con 2'OMe azúcar. En algunos ejemplos, al menos uno de N o N' que es un ribonucleótido de pirimidina comprende un ribonucleótido modificado con 2'OMe azúcar

5 En algunas realizaciones de la estructura (A2) o ejemplos de la estructura (A4), el compuesto de ARNbc tiene extremos romos, por ejemplo, en los que cada uno de z", Z y Z' está ausente. En un ejemplo alternativo, al menos uno de z", Z o Z' está presente.

10 En diversos ejemplos, Z y Z' incluyen independientemente uno o más nucleótidos modificados o no modificados unidos covalentemente, incluidos desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos, o una o más unidades estructurales no convencionales, por ejemplo, unidad estructural desoxirribosa abásica invertida, unidad estructural ribosa abásica, un nucleótido espejo o un análogo de nucleótido de pirazolotriazina; una o más unidades estructurales C3 no nucleótidos o un derivado de las mismas, unidad estructural C4 no nucleótido o un derivado de la misma o unidad estructural C5 no nucleótido o un derivado de la misma, una unidad estructural amino C6 no nucleótido o un derivado de la misma, como se define en este documento, y similares o una unidad estructural conjugada. En algunos ejemplos, Z' está ausente y Z está presente e incluye una o más unidades estructurales C3 no nucleótidos. En algunos ejemplos, Z está ausente y Z' está presente e incluye una o más unidades estructurales C3 que no nucleótidos. En algunos ejemplos, cada uno de Z y Z' comprende independientemente uno o más dT, unidades estructurales C3 no nucleótidos o una unidad estructural conjugada. En algunos ejemplos, Z y/o Z' es una unidad estructural conjugada seleccionado de una vitamina, un fármaco, un lípido, una polialquilamina, un péptido o un fluoróforo unido covalentemente al término en el que está presente. En algunos ejemplos, z" está presente y es una unidad estructural de protección seleccionada entre un nucleótido espejo, una unidad estructural abásica, una unidad estructural amino C6, una unidad estructural fenil hidrocarbilo y una unidad estructural abásica invertida o es una unidad estructural conjugada. En algunas realizaciones de la estructura (A2) o ejemplos de la estructura (A4), cada uno de Z y Z' incluye una unidad estructural abásica, por ejemplo, una unidad estructural desoxirribobásica (denominada en este documento "dAb") o una unidad estructural ribobásica (denominada en este documento "rAb"). En algunos ejemplos, cada uno de Z y/o Z' comprende dos unidades estructurales abásicas unidas covalentemente y es, por ejemplo, dAb-dAb o rAb-rAb o dAb-rAb o rAb-dAb, en la que cada unidad estructural está unida covalentemente a una unidad estructural adyacente, preferiblemente a través de un enlace basado en fosfo. En algunos ejemplos, el enlace basado en fosfo incluye un enlace fosforotioato, un fosfonoacetato o fosfodiéster. En los ejemplos preferidos, el enlace basado en fosfo es un enlace fosfodiéster.

15 En algunos ejemplos, cada uno de Z y/o Z' incluye independientemente una unidad estructural alquilo, opcionalmente una unidad estructural propano $[(CH_2)_3]$ (C3) o un derivado de la misma que incluye propanol (C3OH) y fosfo derivado de propanodiol ("C3Pi"). En algunos ejemplos, cada uno de Z y/o Z' incluye dos unidades estructurales alquilo y en algunos ejemplos es C3Pi-C3OH o C3Pi-C3Pi. En el ejemplo de C3Pi-C3OH, el terminal 3' de la hebra antisentido y/o el terminal 3' de la hebra sentido está unida covalentemente a una unidad estructural C3 a través de un enlace basado en fosfo y la unidad estructural C3 está unida covalentemente a una unidad estructural C3OH a través de un enlace basado en fosfo. En algunos ejemplos, los enlaces basados en fosfo incluyen un enlace fosforotioato, un fosfonoacetato o un fosfodiéster. En ejemplos preferidos, el enlace basado en fosfo es un enlace fosfodiéster.

20 En algunas realizaciones específicas de la estructura (A2) o ejemplos de la estructura (A4), Z comprende C3Pi-C3OH o C3Pi-C3Pi. En algunas realizaciones específicas de la estructura (A2) o ejemplos de la estructura (A4), Z' comprende C3Pi o C3OH. En algunas realizaciones de la estructura (A2) o ejemplos de la estructura (A4), una molécula de ácido nucleico bicatenario incluye una unidad estructural C3Pi-C3Pi unida covalentemente al terminal 3' de la hebra antisentido y una unidad estructural C3Pi o C3OH unida covalentemente al terminal 3' de la hebra sentido.

25 En otras realizaciones, un compuesto de la estructura (A2) o un ejemplo de la estructura (A4) incluye al menos un ribonucleótido modificado en su residuo de azúcar. En algunos ejemplos, el compuesto comprende una modificación en la posición 2' del residuo de azúcar. En algunos ejemplos, la modificación en la posición 2' comprende la presencia de una unidad estructural amino, fluoro, alcoxi o alquilo. En determinados ejemplos, la modificación 2' incluye una unidad estructural alcoxi. En ejemplos preferidos, la unidad estructural alcoxi es una unidad estructural metoxi (también denominado 2'-O-metilo; 2'OMe; 2'-OCH₃). En algunos ejemplos, un compuesto de ácido nucleico incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar alternos en una o ambas de la hebra antisentido y la hebra sentido. En otros ejemplos, un compuesto incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar en la hebra antisentido, N¹-(N)x, únicamente. En algunos ejemplos, los ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar alternan con nucleótidos no modificados. En determinados ejemplos, el ribonucleótido medio de la hebra antisentido; por ejemplo, el ribonucleótido en la posición 10 en una hebra de 19-mer no está modificado. En diversos ejemplos, el compuesto de ácido nucleico incluye al menos 5 ribonucleótidos alternos modificados con 2'OMe azúcar y ribonucleótidos no modificados. En realizaciones adicionales, un compuesto de la estructura (A2) incluye ribonucleótidos modificados en posiciones alternas en las que cada ribonucleótido en el terminal 5' y en el terminal 3' de N¹-(N)x está modificado en su residuo de azúcar, y cada ribonucleótido en el terminal 5' y en el terminal 3' de o N²-(N)y no está modificado en su residuo de azúcar. En diversos ejemplos, los ribonucleótidos en posiciones alternas se modifican en la posición 2' del residuo de azúcar.

30 En algunos ejemplos, la molécula de ácido nucleico comprende ribonucleótidos no modificados, ribonucleótidos modificados y unidades estructurales no convencionales. En algunos ejemplos, (N)x (SEQ ID NOS: 30-38) comprende ribonucleótidos sin modificar y modificados con 2'-O-metil (2'OMe) azúcar, y opcionalmente un 2'-5' ribonucleótido en al menos una de las posiciones 5, 6 o 7; y (N')y (SEQ ID NOS: 22-29) comprende ribonucleótidos no modificados, al menos

35

40

45

50

55

60

un ribonucleótido 2'5' y/o un ribonucleótido modificado con 2'OMe; z" está presente; y cada uno de Z y Z' está presente y consiste en una unidad estructural no nucleótido o una unidad estructural conjugada unida covalentemente al terminal 3' de la hebra en la que está presente. En los ejemplos preferidos, (N)x comprende ribonucleótidos de pirimidina modificados con 2'OMe azúcar y (N')y comprende ribonucleótidos de pirimidina modificados con 2'OMe azúcar. En los ejemplos preferidos, z" comprende una unidad estructural abásica invertida, una unidad estructural amino C6 o una unidad estructural THNB; Z' comprende una unidad estructural C3Pi; y Z comprende una unidad estructural C3Pi-C30H o C3Pi-C3Pi.

En algunos ejemplos, el compuesto de ácido nucleico incluye al menos 5 ribonucleótidos alternos modificados con 2'OMe azúcar y ribonucleótidos no modificados, por ejemplo en las posiciones 1, 3, 5, 7 y 9 o en las posiciones 11, 13, 15, 17, 19 (5'>3'). En algunas realizaciones, N1-(N)x de la estructura (A2) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19. En algunas realizaciones, N1-(N)x de la estructura (A2) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19. En algunas realizaciones, N1-(N)x de la estructura (A2) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar en una o más pirimidinas. En algunos ejemplos, N1-(N)x de la estructura (A4) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19. En algunos ejemplos, N1-(N)x de la estructura (A4) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19. En algunos ejemplos, N1-(N)x de la estructura (A4) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar en una o más pirimidinas.

En algunas realizaciones de la estructura (A2) o ejemplos de la estructura (A4), ni la hebra sentido ni la hebra antisentido están fosforiladas en el terminal 3' y en el terminal 5'. En otros ejemplos, una o ambas de la hebra sentido y/o la hebra antisentido están fosforiladas en el terminal 3'. En otros ejemplos, una o ambas de la hebra sentido y/o la hebra antisentido se fosforilan en el terminal 5'.

En algunos ejemplos, la molécula bicatenaria descrita en este documento incluye una o más de las siguientes modificaciones, en particular para un dúplex de 19 mer:

25 N en al menos una de las posiciones 5, 6, 7, 8 o 9 del terminal 5' de la hebra antisentido se selecciona de un ADN, TNA, un nucleótido de 2'5' o un nucleótido espejo;

N' en al menos una de las posiciones 9 o 10 del terminal 5' de la hebra sentido se selecciona entre un TNA, un 2'5' nucleótido y una pseudouridina;

N' en 4, 5 o 6 posiciones consecutivas en el terminal 3' de (N')y comprende un ribonucleótido de 2'5';

30 uno o más ribonucleótidos de pirimidina son azúcares 2' modificados en la hebra sentido, la hebra antisentido o tanto la hebra sentido como la hebra antisentido;

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, o 19 N' es un TNA;

1, 2 o 3 N' es un análogo de nucleótido modificado con base de pirazolotriazina.

En algunos ejemplos, la molécula bicatenaria descrita en este documento incluye una combinación de las siguientes modificaciones,

35 la hebra antisentido incluye un ADN, TNA, un nucleótido 2'5' o un nucleótido espejo en al menos una de las posiciones 5, 6, 7, 8, o 9 desde el terminal 5';

la hebra sentido incluye al menos uno de un TNA, un 2'5' nucleótido y una pseudouridina en las posiciones 9 o 10 desde el terminal 5'; y

40 uno o más ribonucleótidos de pirimidina están modificados en 2' en la hebra sentido, la hebra antisentido o tanto la hebra sentido como la hebra antisentido.

En algunos ejemplos, la molécula bicatenaria descrita en este documento incluye una combinación de las siguientes modificaciones

la hebra antisentido incluye un ADN, un 2'5' nucleótido o un nucleótido espejo en al menos una de las posiciones 5, 6, 7, 8 o 9 del terminal 5';

45 la hebra de sentido incluye 4, 5 o 6 2'5' nucleótidos consecutivos en las posiciones penúltima 3' o terminal 3'; y

uno o más ribonucleótidos de pirimidina son modificados con 2' azúcar en la hebra sentido, la hebra antisentido o tanto la hebra sentido como la hebra antisentido.

En algunas realizaciones de la estructura (A2) o ejemplos de la estructura (A4), (N)y incluye al menos una unidad estructural no convencional seleccionada de un nucleótido espejo, un ribonucleótido unido a 2'5' y un TNA. En algunos ejemplos, la unidad estructural no convencional es un nucleótido espejo. En diversos ejemplos, el nucleótido espejo se selecciona de un L-ribonucleótido (L-ARN) y un L-desoxirribonucleótido (L-ADN). En ejemplos preferidos, el nucleótido

espejo es L-ADN. En determinados ejemplos, la hebra sentido comprende una unidad estructural no convencional en la posición 9 o 10 (desde el terminal 5'). En ejemplos preferidos, la hebra sentido incluye una unidad estructural no convencional en la posición 9 (desde el terminal 5'). En algunos ejemplos, la hebra sentido tiene 19 nucleótidos de longitud y comprende 4, 5 o 6 unidades estructurales no convencionales consecutivas en las posiciones 15 (desde el terminal 5').

5 En algunos ejemplos, la hebra sentido incluye 4 2'5' ribonucleótidos consecutivos en las posiciones 15, 16, 17 y 18. En algunos ejemplos, la hebra sentido incluye 5 2'5' ribonucleótidos consecutivos en las posiciones 15, 16, 17, 18. y 19. En diversos ejemplos, la hebra sentido comprende además Z'. En algunos ejemplos, Z' incluye una unidad estructural C30H o una unidad estructural C3Pi.

10 En algunas realizaciones de la estructura (A2) o ejemplos de la estructura (A4), (N)y comprende al menos una unidad estructural no convencional seleccionada de un nucleótido espejo y un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace fosfato 2'-5' internucleótido (2'5' enlazado). En algunos ejemplos, la unidad estructural no convencional es un nucleótido espejo. En diversos ejemplos, el nucleótido espejo se selecciona de un L-ribonucleótido (L-ARN) y un L-desoxirribonucleótido (L-ADN). En ejemplos preferidos, el nucleótido espejo es L-ADN.

15 En algunas realizaciones de la estructura (A2) o ejemplos de la estructura (A4), (N)y comprende al menos una unidad estructural de L-ADN. En algunos ejemplos, $x=y=18$ y $N^2-(N')y$, consta de ribonucleótidos sin modificar en las posiciones 1-17 y 19 y un L-ADN en la posición penúltima 3' (posición 18). En otros ejemplos, $x=y=18$ y $N^2-(N')y$ consta de ribonucleótidos no modificados en las posiciones 1-16 y 19 y dos L-ADN consecutivos en la posición penúltima 3' (posiciones 17 y 18). En diversos ejemplos, la unidad estructural no convencional es un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace fosfato 2'-5' internucleótido. Según diversos ejemplos, $N^2-(N')y$ comprende 2, 3, 4, 5 o 6 ribonucleótidos consecutivos en el terminal 3' unidos por enlaces 2'-5' internucleótidos. En un ejemplo, cuatro ribonucleótidos consecutivos en el terminal 3' de $N^2-(N')y$ están unidos por tres enlaces 2'-5' fosfodiéster, en los que uno o más de los 2'-5' ribonucleótidos que forman los enlaces 2'-5' fosfodiéster comprenden además una modificación de 3'-O-metil (3'OMe) azúcar. En algunos ejemplos, el ribonucleótido terminal 3' de $N^2-(N')y$ comprende una modificación de 2'OMe azúcar. En determinados ejemplos, $x=y=18$ y $N^2-(N')y$ comprende dos o más nucleótidos consecutivos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19 unidos a un nucleótido adyacente por un enlace 2'-5' internucleótido. En diversos ejemplos, el nucleótido que forma el enlace 2'-5' internucleótido comprende un nucleótido 3' desoxirribosa o un nucleótido 3'metoxi. En diversos ejemplos, el ribonucleótido que forma el enlace 2'-5' internucleótido comprende un 3' desoxirribosa ribonucleótido o un 3' metoxi ribonucleótido. En algunos ejemplos, $x=y=18$ y $N^2-(N')y$ comprende nucleótidos unidos al nucleótido adyacente por un enlace 2'-5' internucleótido entre las posiciones 16-17 y 17-18 o entre las posiciones 17-18 y 18-19 o entre las posiciones 15-16 y 17-18. En diversos ejemplos, los nucleótidos que forman el enlace 2'-5' internucleótido comprenden ribonucleótidos. En diversos ejemplos, los nucleótidos que forman el enlace 2'-5' internucleótido son ribonucleótidos. En otros ejemplos, un ribonucleótido de pirimidina (rU, rC) en $(N')y$ comprende un ribonucleótido unido al ribonucleótido adyacente por un enlace 2'-5' internucleótido.

25 En realizaciones adicionales de la estructura (A2) o ejemplos de la estructura (A4), (N')y comprende 1-8 ribonucleótidos modificados en los que el ribonucleótido modificado es un nucleótido desoxirribosa (ADN). En determinadas realizaciones $(N')y$ comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o hasta 8 unidades estructurales de ADN.

30 En algunos ejemplos descritos en este documento, las hebras antisentido y sentido comprenden los pares de oligonucleótidos identificados en este documento como DDIT441 (SEQ ID NOS:3 y 12), DDIT4_43 (SEQ ID NOS:4 y 14), DDIT4_46 (SEQ ID NOS:5 y 14), DDIT4_55 (SEQ ID NOS:6 y 15), DDIT4_59 (SEQ ID NOS:7 y 16), DDIT4_60 (SEQ ID NOS:8 y 17), DDIT4_61 (SEQ ID NOS:9 y 18), DDIT4_62 (SEQ ID NOS:10 y 19), y DDIT4_63 (SEQ ID NOS:11 y 20). Por ejemplo, las hebras antisentido y sentido comprenden los pares de oligonucleótidos identificados en este documento como DDIT4_41 (SEQ ID NOS:3 y 12) o DDIT4_63 (SEQ ID NOS:11 y 20).

35 Ciertos dúplex modificados químicamente preferidos se establecen en este documento a continuación en la tabla 4.

40 En un segundo aspecto, se proporcionan composiciones que comprenden uno o más de dichos compuestos de ácido nucleico descritos en este documento; y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos ejemplos, la molécula de ARNbc se administra como ARNbc desnudo. En otros ejemplos, la molécula de ARNbc se mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable. En otros ejemplos más, el ARNbc está encapsulado en un portador de fármacos.

45 En un tercer aspecto, se proporciona el uso de las moléculas descritas en este documento para tratar a un sujeto que padece una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de DDIT4. Tales métodos implican administrar a un mamífero que necesite dicho tratamiento una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una o más de tales moléculas, que inhiben o reducen la expresión o actividad de DDIT4.

50 En otro aspecto, se proporcionan métodos de tratamiento de, incluida la prevención, la incidencia o gravedad de una enfermedad o trastorno en la que la expresión de DDIT4 está asociada con la etiología o progresión de dicha enfermedad o trastorno.

55 En un aspecto, se proporcionan métodos de tratamiento de, incluida la prevención, la incidencia o gravedad de la pérdida auditiva en los que la expresión del DDIT4 está asociada con la etiología o progresión del trastorno auditivo/pérdida auditiva.

En otro aspecto, se proporcionan métodos de tratamiento de, incluida la prevención, la incidencia o gravedad de un trastorno respiratorio cuya expresión del DDIT4 está asociada con la etiología o progresión del trastorno respiratorio.

En otro aspecto, se proporcionan métodos de tratamiento de, incluida la prevención, la incidencia o gravedad de enfermedades y afecciones oculares en las que la expresión del DDIT4 está asociada con la etiología o progresión de las enfermedades y afecciones oculares.

En otro aspecto más, se proporcionan métodos de tratamiento de, incluida la prevención, la incidencia o gravedad de un trastorno neurodegenerativo cuya expresión del DDIT4 está asociada con la etiología o progresión del trastorno neurodegenerativo.

En un aspecto, se proporcionan métodos de tratamiento de, incluida la prevención, la incidencia o gravedad de atrofia muscular o atrofia cutánea cuya expresión del DDIT4 está asociada con la etiología o progresión de la atrofia cutánea o atrofia muscular.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para proporcionar neuroprotección a una neurona, en los que la expresión del DDIT4 está asociada con la muerte o degeneración neuronal.

Se proporciona además en este documento un método del tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto mediante el cual la expresión del gen DDIT4 se asocia con la etiología o progresión de la enfermedad o trastorno, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de molécula o composición descrita en este documento, tratando así la enfermedad o trastorno en el sujeto.

Se proporciona además un método para regular negativamente la expresión de un DDIT4 en una célula, que comprende introducir en la célula la molécula o composición descrita en este documento en una cantidad eficaz para regular negativamente la expresión de DDIT4. En algunos ejemplos, la célula es una célula de la piel, una célula del riñón o una célula del ojo.

Se proporciona además un método para proporcionar neuroprotección a una neurona, que comprende introducir en la neurona una molécula o composición descrita en este documento en una cantidad eficaz para regular negativamente la expresión de DDIT4. En algunos ejemplos, la neurona es una célula del nervio óptico o una célula ganglionar de la retina.

Los métodos, materiales y ejemplos preferidos que se describirán ahora son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes; Los materiales y métodos similares o equivalentes a los descritos en este documento se pueden usar en la práctica o probando los ejemplos o realizaciones de la divulgación. Otras características y ventajas serán evidentes a partir de las siguientes figuras, descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A-1F muestran la actividad de eliminación en el objetivo (% de ARNm residual) de moléculas de ARNbc químicamente modificadas DDIT4_41a y DDIT4_63u en comparación con moléculas de ARNbc de DDIT4_2 en células 293 (1A) y Be2C (1B-1E). El eje X en las figuras 1A y 1B muestra una concentración decreciente de las moléculas de ARNbc, de derecha a izquierda 100nM, 33 nM, 11 nM, 3.7 nM, 1,3 nM, 0,4 nM, 0,137 nM, 0,045 nM, 0,015 nM y en algunos 0,005 nM. El eje X en las figuras 1C, 1D y 1E muestra una concentración decreciente de moléculas de ARNbc a 20 nM, 5 nM y 0,5 nM. La figura 1A muestra que DDIT4_41a_S2012 y _S2013 exhiben una mejor actividad de eliminación que la molécula de DDIT2 en células 293 en todas las concentraciones. La figura 1B muestra que DDIT4_41a_S2012 y _S2013 exhiben una mejor actividad de eliminación que la molécula DDIT4_2 a concentraciones clínicamente relevantes entre 3.7 nM -0,045 nM en células B22C. La figura 1C muestra que la actividad DDIT4_63u en comparación con la molécula DDIT4_2 en las células Be2C. La figura 1D y 1E muestran que la actividad DDIT4_41a en comparación con la molécula DDIT4_2 en las células Be2C. La figura 1F muestra que DDIT4_41_S2071 exhibe una mejor actividad de eliminación que la molécula DDIT4_1 en células Be2C en todas las concentraciones.

La figura 2 muestra la estabilidad de algunas de las moléculas de ARNbc descritas en este documento en plasma de ratón (plasma de ratón), plasma de rata (plasma de rata), plasma humano (plasma humano) y fluido vítreo de conejo a las 3 h, 8 h, y 24 h, en comparación con 25 ng de ARNbc de control ("caja"). DDIT4_63u_S2009, DDIT4_41a_S2013, _S2015, _S2016 son las moléculas más estables en todos los fluidos corporales. Se muestra el gel de bromuro de etidio.

Las figuras 3A-3D muestran exposiciones de la estabilidad de la hebra sentido y antisentido en diversos fluidos corporales. La figura 3A muestra la estabilidad de DDIT4_41a_S2012 y S2013 en plasma humano (plasma humano) y fluido vítreo de conejo (vítreo de conejo) a las 3 h, 8 h y 24 h, en comparación con el control ("caja"), la figura 3B muestra la estabilidad de DDIT4_41a_S2071 y S2072 en plasma humano (plasma humano) y fluido vítreo de conejo (vítreo de conejo) a las 3 h, 8 h y 24 h, en comparación con el control ("caja"). La figura 3C muestra la estabilidad de DDIT4_41a_S2073 en plasma humano (plasma humano) y fluido vítreo de conejo (vítreo de conejo) a las 3 h, 8 h y 24 h, en comparación con el control ("caja"). La figura 3D muestra la estabilidad de la hebra sentido DDIT4_41a_S2071 en el extracto citosólico de HCT116 a las 3 h, 8 h y 24 h, en comparación con el control ("caja").

Las figuras 4A y 4B muestran la actividad medida por % de ARNm residual para las moléculas DDIT4_41a_S2071, DDIT4_41a_S2072 y DDIT4_41a_S2073. La figura 4A muestra la actividad diana de la hebra antisentido y la figura 4B

muestra la actividad fuera de la diana de la hebra sentido (Psi-CHECK). La diferencia entre las tres moléculas está en la unidad estructural de protección de la hebra sentido. _S2071 incluye una unidad estructural de protección desoxiabásica invertida, _S2072 incluye una unidad estructural amino C6 y _S2073 incluye una unidad estructural THNB. 12 y 13 se refieren a DDIT4_41a_S2012 y S2013, respectivamente

5 Las figuras 5A-5C muestran los resultados de la escisión del ARNm en la retina de rata como se muestra por RACE de la molécula DDIT4_41a_S2071 después de la inyección intravítreo (IVT), en comparación con DDIT4_1 (SEQ ID NO: 45 y 46) alternando modificaciones sin modificar y 2'OMe con (S500) o sin (S073) 3' fosfato., DDIT4_41a_S2071, DDIT4_1_S73 o DDIT4_1_S500 se inyectaron bilateralmente en ojos de rata a 2 ug, 6 ug o 20 g por ojo. La escisión del ARNm se probó mediante RACE. El producto de amplificación RACE se separó mediante electroforesis en gel de agarosa y se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio (EtBr). Los productos separados se analizaron mediante hibridación por transferencia Southern usando una sonda específica para la unión de escisión RACE predicha. La imagen superior de cada figura muestra la tinción de EtBr y la imagen inferior muestra los resultados de la hibridación. Las bandas claras tanto en el EtBr como en la tinción de hibridación en las muestras tomadas de la retina tratada con DDIT4_41a_S2071 indican la generación específica del producto adecuado predicho para la escisión mediada de ARNi de ARNm de DDIT4 en la retina de rata inyectada con ARNip de DDIT4_41a_S2071.

10

15

Descripción detallada de la invención

En este documento se proporcionan moléculas de ácido nucleico bicatenario que se dirigen al DDIT4, composiciones que comprenden esas moléculas para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece enfermedades y trastornos. Se demostró que la inhibición de la expresión de DDIT4 es beneficiosa en el tratamiento de muchas enfermedades y trastornos en los que la expresión de DDIT4 está asociada con la etiología o progresión de la enfermedad o trastorno.

En este documento se proporcionan moléculas, métodos y composiciones de ARNbc para inhibir la expresión de un gen DDIT4 diana *in vitro* e *in vivo*. En general, los métodos incluyen la administración de oligoribonucleótidos, tales como moléculas de ARNbc que incluyen pequeños ARN interferentes (esto es, ARNbc) que se dirigen al DDIT4 e hibridan o interactúan con el ARNm en condiciones biológicas (dentro de la célula), o un material de ácido nucleico que puede producir ARNip en una célula, en una cantidad suficiente para regular negativamente la expresión de DDIT4. Sin desear ceñirse a la teoría, la regulación a la baja puede estar regulada por un mecanismo de interferencia de ARN.

25 Los ARNbc descritos en este documento poseen estructuras y modificaciones que pueden, por ejemplo, aumentar la actividad, aumentar la estabilidad y minimizar la toxicidad; las moléculas de ARNbc modificadas químicamente descritas en este documento son útiles para prevenir o atenuar la expresión del gen diana, en particular los genes diana discutidos en este documento.

30 En algunos ejemplos descritos en este documento, las moléculas de ácido nucleico bicatenario comprenden una unidad estructural de ADN o un apareamiento incorrecto con la diana en la posición 1 de la hebra antisentido (terminal 5'). Dicha estructura dúplex se describe en este documento. Según un ejemplo descrito en este documento, se proporcionan moléculas de ARNbc bicatenaria que tienen una estructura (A4) que se establece a continuación:

35 (A4) 5' N¹-(N)x-Z 3' (hebra antisentido)
3'Z'-N²-(N')y-z" 5' (hebra sentido)

en la que cada N1, N2, N y N' es independientemente un nucleótido modificado o no modificado, o una unidad estructural no convencional;

40 en la que cada uno de (N)x y (N')y es un oligonucleótido en la que cada N o N' consecutivo está unido al N o N' adyacente mediante un enlace covalente;

en la que cada uno de x y y es independientemente un número entero entre 17 y 39;

en la que N2 está unido covalentemente a (N')y;

en la que N1 está unido covalentemente a (N)x y se empareja erróneamente con el ARNm diana (SEQ ID NO: 1-11) o es una unidad estructural de ADN complementaria al ARNm diana;

45 en la que N1 es una unidad estructural seleccionada del grupo que consiste en natural o modificado: uridina, desoxirribouridina, ribotimidina, desoxirribotimidina, adenosina o desoxiadenosina;

en la que z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es una unidad estructural de protección o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 5' de N2-(N')y;

50 en la que cada uno de Z y Z' está presente o ausente independientemente, pero si está presente tiene independientemente 1-5 nucleótidos consecutivos, unidades estructurales no nucleótidos consecutivas, unidades estructurales consecutivas no convencionales o una combinación de los mismos o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 3' de la hebra en la que está presente; y

en la que la secuencia de (N')y es complementaria a la secuencia de (N)x; y en la que la secuencia de (N)x comprende una secuencia antisentido y (N')y comprende una secuencia con sentido establecida en SEQ ID NOS:3 y 12; SEQ ID NOS:4 y 13; SEQ ID NOS:5 y 14; SEQ ID NOS:6 y 15; SEQ ID NOS:7 y 16; SEQ ID NOS:8 y 17; SEQ ID NOS:9 y 18; SEQ ID NOS:10 y 19; o SEQ ID NOS:11 y 20. En los ejemplos preferidos descritos en este documento, la hebra sentido y la hebra antisentido comprenden pares de secuencias establecidos en cualquiera de las SEQ ID NOS:22 y 31; SEQ ID NOS:23 y 32; SEQ ID NOS:24 y 33; SEQ ID NOS:25 y 34; SEQ ID NOS:26 y 35; SEQ ID NOS:27 y 36; SEQ ID NOS:28 y 37; o SEQ ID NOS:29 y 38. Según la presente invención, la molécula de ácido nucleico bicatenario tiene la estructura (A2), y la hebra sentido y la hebra antisentido comprenden pares de secuencias establecidos en cualquiera de SEQ ID NOS: 21 y 30.

5 10 Definiciones

Por conveniencia, en este documento se describen determinados términos empleados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones.

Se debe observar que, como se usa en este documento, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen formas plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

15 20 25 30 35 40 45 50 55 Cuando los aspectos o realizaciones de la invención o los ejemplos descritos en este documento se describen en términos de grupos de Markush u otra agrupación de alternativas, los expertos en la técnica reconocerán que la invención también se describe de ese modo en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo.

Un "inhibidor" es un compuesto que es capaz de reducir (parcial o totalmente) la expresión de un gen o la actividad del producto de tal gen hasta un grado suficiente para lograr un efecto biológico o fisiológico deseado. El término "inhibidor", como se usa en este documento, se refiere a uno o más de un inhibidor de oligonucleótidos, que incluye ARNip, ARNhp, ARNhp sintético; miARN, ARNmc, ARN y ADN antisentido y ribozimas.

Una "molécula de ARNbc" o "inhibidor de ARNbc" es un compuesto que es capaz de regular negativamente o reducir la expresión de un gen o la actividad del producto de tal gen en un grado suficiente para lograr un efecto biológico o fisiológico deseado e incluye uno o más de un ARNip, ARNhp, ARNhp sintético; miARN. La inhibición también puede denominarse regulación a la baja o, para el ARNi, silenciamiento.

El término "inhibir", como se usa en este documento, se refiere a reducir la expresión de un gen o la actividad del producto de dicho gen hasta un grado suficiente para lograr un efecto biológico o fisiológico deseado. La inhibición es completa o parcial.

Como se usa en este documento, el término "inhibición" de un gen diana significa inhibición de la expresión génica (transcripción o traducción) o actividad polipeptídica del gen DDIT4 en la que un SNP (polimorfismo de un solo nucleótido) u otras variantes del mismo. Los términos "secuencia de polinucleótidos de ARNm", "secuencia de ARNm" y "ARNm" se usan indistintamente.

Como se usa en este documento, los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se pueden usar indistintamente y se refieren a secuencias de nucleótidos que comprenden ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). Se debe entender que los términos incluyen, como equivalentes, análogos de ya sea ARN o ADN preparados a partir de análogos de nucleótidos. A lo largo de esta solicitud, las secuencias de ARNm se establecen como representativas de los genes correspondientes.

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

"Sustancialmente complementario" se refiere a una complementariedad de más de aproximadamente 84 % con otra secuencia. Por ejemplo, en una región dúplex que consiste en 19 pares de bases, un desapareamiento da como resultado una complementariedad del 94.7 %, dos desapareamientos dan como resultado aproximadamente un 89.5 % de complementariedad y 3 desapareamientos dan como resultado aproximadamente un 84.2 % de complementariedad, lo que hace que la región dúplex sea sustancialmente complementaria. De acuerdo con lo anterior, sustancialmente idéntico se refiere a una identidad de más de aproximadamente 84 % con otra secuencia.

"Nucleótido" pretende abarcar desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos, que pueden ser naturales o sintéticos, y/o modificados o no modificados. Las modificaciones incluyen cambios en la unidad estructural de azúcar, la unidad estructural de base y/o los enlaces entre ribonucleótidos en el oligoribonucleótido. Como se usa en este documento, el término "ribonucleótido" abarca ribonucleótidos naturales y sintéticos, no modificados y modificados. Las modificaciones incluyen cambios en la unidad estructural de azúcar, en la unidad estructural de base y/o en los enlaces entre ribonucleótidos en el oligonucleótido.

Los nucleótidos se pueden seleccionar de bases modificadas sintéticas o de origen natural. Las bases de origen natural incluyen adenina, guanina, citosina, timina y uracilo. Las bases modificadas de nucleótidos incluyen inosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil, 2-propil y otras alquil adeninas, 5-halo uracilo, 5-halo citosina, 6-aza citosina y 6-aza timina, pseudo uracilo, 4-tiouracilo, 8-halo adenina, 8-aminoadenina, 8-tiol adenina, 8-tiolalquil adeninas, 8-hidroxil adenina y otras adeninas 8-sustituidas, 8-haloguaninas, 8-amino guanina, 8-tiol guanina, 8-tiolalquil guaninas, 8-hidroxil guanina y otras guaninas sustituidas, otras aza y deaza adeninas, otras aza y deaza guaninas, 5-trifluorometil uracilo, análogos de ácidos nucleicos a base de pirazolotriazina y 5-trifluorocitosina. En algunos ejemplos, uno o más nucleótidos de un oligómero se sustituyen por inosina.

Según algunos ejemplos, la presente invención proporciona compuestos oligonucleotídicos inhibidores que comprenden nucleótidos modificados y no modificados y/o unidades estructurales no convencionales. El compuesto comprende al menos un nucleótido modificado seleccionado del grupo que consiste en una modificación de azúcar, una modificación de base y una modificación de enlace internucleotídico y puede contener ADN y nucleótidos modificados tales como LNA (ácido nucleico bloqueado), ENA (ácido nucleico con puente de etileno), PNA (ácido nucleico peptídico), arabinósido, fosfonocarboxilato o nucleótido fosfinocarboxilato (nucleótido PACE), nucleótido espejo o nucleótidos con un azúcar de 6 carbonos.

Todos los análogos o modificaciones de un nucleótido/oligonucleótido se emplean con la presente invención, siempre que dicho análogo o modificación no afecte sustancialmente de forma adversa a la función del nucleótido/oligonucleótido. Las modificaciones aceptables incluyen modificaciones de la unidad estructural de azúcar, modificaciones de la unidad estructural de base, modificaciones en los enlaces internucleotídicos y combinaciones de los mismos.

Una modificación de azúcar incluye una modificación en la unidad estructural 2' del residuo de azúcar y abarca amino, fluoro, alcoxi, por ejemplo, metoxi, alquilo, amino, fluoro, cloro, bromo, CN, CF, imidazol, carboxilato, tioato, alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alcarilo o aralquilo, OCF₃, OCN, O-, S- o N-alquilo; O-, S o N-alquenilo; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂, N₃; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino o sililo sustituido, como se describe, entre otros, en las Patentes Europeas EP 0 586 520 B1 o EP 0 618 925 B1.

En un ejemplo, la molécula de ARNbc comprende al menos un ribonucleótido que comprende una modificación 2' en la unidad estructural de azúcar ("modificación 2' azúcar"). En determinados ejemplos, el compuesto comprende 2'O-alquilo o 2'-fluoro o 2'Oalilo o cualquier otra modificación 2', opcionalmente en posiciones alternas. También son posibles otras modificaciones estabilizantes (por ejemplo, modificaciones terminales). En algunos ejemplos, un 2'O-alquilo preferido es una modificación de 2'O-metil (metoxi) azúcar.

En algunos ejemplos, el esqueleto de los oligonucleótidos está modificado y comprende entidades de fosfato-D-ribosa pero también puede contener entidades de tiofosfato-D-ribosa, triéster, tioato, esqueleto con puente 2'-5' (también se puede denominar como 5'-2'), PACE y similares. Las modificaciones de enlaces internucleotídicos adicionales incluyen enlaces fosfotriéster lábiles o reversibles tales como los descritos en los documentos US20090093425 y US20110294869, respectivamente.

Como se usa en este documento, los términos "análogo de nucleótido de apareamiento sin bases" significa un análogo de nucleótido que comprende una unidad estructural de apareamiento sin bases que incluye, pero no se limita a: 6 des amino adenosina (Nebularina), 4-Me-indol, 3-nitropirrol, 5-nitroindol, Ds, Pa, N3-Me ribo U, N3-Me riboT, N3-Me dC, N3-Me-dT, N1-Me-dG, N1-Me-dA, N3-etyl-dC, N3-Me dC. En algunos ejemplos, el análogo de nucleótido de apareamiento sin bases es un ribonucleótido. En otros ejemplos, es un desoxirribonucleótido. Además, se pueden preparar análogos de polinucleótidos en los que la estructura de uno o más nucleótidos se altera fundamentalmente y se adapta mejor como reactivos terapéuticos o experimentales. Un ejemplo de un análogo de nucleótido es un ácido nucleico peptídico (PNA) en la que el esqueleto de desoxirribosa (o ribosa) fosfato en el ADN (o ARN) se reemplaza por un esqueleto de poliamida que es similar a la que se encuentra en los péptidos. Se ha demostrado que los análogos de PNA son resistentes a la degradación enzimática y tienen una estabilidad prolongada *in vivo* e *in vitro*. Otras modificaciones que se pueden hacer a los oligonucleótidos incluyen esqueletos de polímeros, esqueletos cíclicos, esqueletos acíclicos, esqueletos de tiofosfato-D-ribosa, esqueletos de triéster, esqueletos de tioato, esqueletos con puentes 2'-5', ácidos nucleicos artificiales, ácidos morfolinucleicos, ácido nucleico glicol (GNA), ácido treosa nucleico (TNA), arabinósido y nucleósido espejo (por ejemplo, beta-L-desoxirribonucleósido en lugar de beta-D-desoxirribonucleósido). Se describen ejemplos de moléculas de ARNbc que comprenden nucleótidos de LNA en Elmen et al., (NAR 2005, 33(1):439-447).

Las modificaciones preferidas incluyen la incorporación de unidades estructurales de TNA en la hebra sentido y/o hebra antisentido. Ejemplos de ARNbc que comprenden unidades estructurales de TNA se describen en PCT/US11/063365, del cessionario de la presente invención. En algunos ejemplos, se pueden sustituir 1-19 ribonucleótidos en la hebra sentido por TNA.

Las modificaciones preferidas incluyen la incorporación de unidades estructurales de nucleótidos modificados con base de pirazolotriazina en la hebra sentido y/o hebra antisentido. Ejemplos de unidades estructurales de pirazolotriazina y ARNbc que comprenden unidades estructurales de pirazolotriazina se describen en PCT/IL2013/050465, coasignado al cessionario de la presente invención. Los análogos de ADN o ARN de pirazolotriazina se incorporan preferiblemente en una hebra antisentido de 19 mer en las posiciones 1, 5, 6 o 7 (5'>3'). En algunos ejemplos, se prefieren los análogos de

ARN de pirazolotriazina. Los análogos de ADN o ARN de pirazolotriazina también pueden unirse covalentemente al terminal 3' de la hebra sentido o antisentido, como salientes terminales 3'.

El término "unidad estructural conjugada" como se usa en este documento se refiere a una unidad estructural que incluye un péptido, lípido, fármaco, vitamina, mineral, fluoróforo que es capaz de unirse covalentemente a la molécula de ácido nucleico, preferiblemente en uno o más del terminal 5' o terminal 3'. Sin desear estar ligado a la teoría, la unidad estructural conjugada altera la biodistribución, escape endosomal, captación celular, retención de plasma, dirección de la molécula, sin afectar adversamente la actividad de la molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, una vitamina preferida es una unidad estructural de vitamina D, vitamina A o vitamina E; un lípido preferido es un esfingolípido o colesterol o derivado del colesterol.

10 Los compuestos de la presente invención se pueden sintetizar usando uno o más nucleótidos invertidos, por ejemplo timidina invertida o adenina invertida (véase, por ejemplo, Takei, et al., 2002, JBC 277(26):23800-06).

Un nucleótido "espejo" es un nucleótido con quiralidad inversa al nucleótido de origen natural o comúnmente empleado, esto es, una imagen espectral (nucleótido L) del (nucleótido D) de origen natural, también denominado L-ARN. en el caso de un ribonucleótido espejo y "spiegelmer". El nucleótido puede ser un ribonucleótido o un desoxirribonucleótido y puede comprender además al menos un azúcar, una base o una modificación del esqueleto. Véase la Patente de los Estados Unidos No. 6,586,238. Además, la Patente de los Estados Unidos No. 6,602,858 describe catalizadores de ácido nucleico que comprenden al menos una sustitución de L-nucleótido.

15 Otras modificaciones incluyen modificaciones terminales en la parte 5' y/o 3' de los oligonucleótidos y también se conocen como unidades estructurales de protección. Tales modificaciones terminales se seleccionan de un nucleótido, un nucleótido modificado, un lípido, un péptido, un azúcar y una unidad estructural abásica invertida.

20 Una "unidad estructural alquilo o derivado de la misma" se refiere a unidades estructurales y unidades estructurales de carbono de cadena lineal o ramificada per se o que comprenden además un grupo funcional que incluye alcoholes, fosfodiéster, fosforotioato, fosfonoacetato y también incluye aminas, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas aldehídos. "unidad estructural de hidrocarburo" y "unidad estructural de alquilo" se usan indistintamente.

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

Se proporcionan métodos y composiciones para inhibir la expresión del gen diana *in vivo*. En general, el método incluye la administración de oligoribonucleótidos, en particular ARN interferentes pequeños (esto es, ARNip) que se dirigen a un ARNm transcrita del gen diana en una cantidad suficiente para regular negativamente la expresión de un gen diana mediante un mecanismo de interferencia de ARN. En particular, el método objeto se puede usar para inhibir la expresión 30 del gen diana para el tratamiento de una enfermedad. En este documento se proporcionan moléculas de ARNbc dirigidas a un gen diana descrito en este documento y que son útiles como agentes terapéuticos para tratar diversas patologías del sistema óptico y vestibular.

35 Se proporcionan métodos y composiciones para inhibir la expresión de un gen asociado con la pérdida auditiva *in vivo*. Sin desear ceñirse a la teoría, el método incluye administrar un oligoribonucleótido, en particular un ARN bicatenario (tal como, por ejemplo, ARNip), que se dirige al ARNm de DDIT4, o composiciones farmacéuticas que los comprenden, en una cantidad suficiente para regular negativamente la expresión de un DDIT4 mediante un mecanismo de interferencia de ARN. En particular, el método objeto se puede usar para inhibir la expresión de DDIT4 para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno o una afección descrita en este documento.

40 En algunos ejemplos, el ARNbc tiene extremos romos, en uno o ambos extremos. Más específicamente, el ARNbc puede tener extremos romos en el extremo definido por el terminal 5' de la primera hebra y el terminal 3' de la segunda hebra, o el extremo definido por el terminal 3' de la primera hebra y el terminal 5' de la segunda hebra.

45 En otros ejemplos, al menos una de las dos hebras puede tener un saliente de al menos un nucleótido en el terminal 5'; el saliente puede consistir en al menos un desoxirribonucleótido. Al menos una de las hebras también puede tener opcionalmente un saliente de al menos un nucleótido en el terminal 3'. El saliente puede constar desde aproximadamente 1 a aproximadamente 5 nucleótidos.

En algunos ejemplos, la hebra antisentido incluye un Pi escindible o no escindible. Sin desear estar ligado a la teoría, el 5' Pi puede facilitar la carga de la hebra antisentido en el complejo RISC.

50 En algunos ejemplos, la hebra sentido incluye una unidad estructural de protección o una unidad estructural conjugada (z"). Sin desear estar ligado a la teoría, z" puede dificultar la carga de la hebra sentido en el complejo RISC y/o puede facilitar captación celular y escape endosomal.

La longitud del dúplex de ARN es de aproximadamente 18 a aproximadamente 40 ribonucleótidos, preferiblemente de 19 a 23 ribonucleótidos. Además, la longitud de cada hebra (oligómero) puede tener independientemente una longitud seleccionada del grupo que consta de aproximadamente 18 a aproximadamente 40 bases, preferiblemente de 18 a 23 bases y más preferiblemente de 19, 20 o 21 ribonucleótidos.

Adicionalmente, en determinados ejemplos preferidos, la complementariedad entre dicha primera hebra y el ácido nucleico diana es perfecta. En algunos ejemplos, las hebras son sustancialmente complementarias, esto es, tienen uno, dos o hasta tres desapareamientos entre dicha primera cadena y el ácido nucleico diana.

5 Además, el terminal 5' de la primera hebra del ARNip se puede unir al terminal 3' de la segunda hebra, o el terminal 3' de la primera hebra se puede unir al terminal 5' de la segunda hebra, siendo dicho enlace a través de un enlazante de ácido nucleico que por lo general tiene una longitud entre 3 y 100 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 nucleótidos.

10 Las moléculas de ARNbc descritas en este documento poseen estructuras y modificaciones que imparten una o más de actividad aumentada, estabilidad aumentada, toxicidad reducida, efecto fuera de la diana reducido y/o respuesta inmunitaria reducida. Las estructuras de ARNip de la presente invención se aplican de manera beneficiosa al ARN bicatenario útil para prevenir o atenuar la expresión de genes diana, en particular los genes diana discutidos en este documento.

15 Según un aspecto, la presente invención proporciona un oligonucleótido bicatenario químicamente modificado que comprende al menos un nucleótido modificado seleccionado del grupo que consiste en una modificación de azúcar, una modificación de base y una modificación de enlace internucleotídico. De acuerdo con lo anterior, los compuestos oligonucleotídicos bicatenarios químicamente modificados de la invención pueden contener nucleótidos modificados tales como ADN, LNA (ácido nucleico bloqueado), ENA (ácido nucleico con puente de etileno), PNA (ácido nucleico peptídico), arabinósido, PACE, nucleósido espejo o nucleótidos, con un azúcar de 6 carbonos. Se describen ejemplos de nucleótidos y análogos de PACE en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,693,187 y 7,067,641. El oligonucleótido puede 20 comprender además 2'-O-metilo o 2'-fluoro o 2'-O-alilo o cualquier otra modificación 2', opcionalmente en posiciones alternas. También son posibles otras modificaciones estabilizantes, que no reducen significativamente la actividad (por ejemplo, modificaciones terminales). El esqueleto de la parte activa de los oligonucleótidos puede comprender entidades de fosfato-D-ribosa pero también puede contener entidades de tiofosfato-D-ribosa, triéster, tioato, esqueleto con puente 2'-5' (también se puede denominar 5'-2'), PACE o cualquier otro tipo de modificación. También son posibles modificaciones 25 terminales en la parte 5' y/o 3' de los oligonucleótidos. Tales modificaciones terminales pueden ser lípidos, péptidos, azúcares, unidades estructurales abásicas invertidas u otras moléculas.

La presente invención también se refiere a compuestos que regulan negativamente la expresión de los genes descritos en este documento, en particular a nuevos ARNbc, y al uso de estos nuevos ARNbc en el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones médicas. Las enfermedades y afecciones particulares que se va a tratar están relacionadas 30 con la pérdida de audición o los trastornos descritos en este documento. Las listas de ARNip que se usarán en la presente invención se proporcionan en las tablas 2A-10D. Las secuencias de ARNip de 21 o 23-mer también se pueden generar mediante la extensión 5' y/o 3' de las secuencias de 19-mer descritas en este documento. Preferiblemente, tal extensión es complementaria a la secuencia de ARNm correspondiente. Los ARNbc de la presente invención poseen estructuras y modificaciones que pueden incrementar la actividad, incrementar la estabilidad, reducir el efecto fuera de la diana, reducir 35 la respuesta inmune y/o reducir la toxicidad. Las estructuras de ARNbc de la presente invención se aplican de forma beneficiosa al ARN bicatenario útil para prevenir o atenuar la expresión de uno o más de los genes diana descritos en este documento.

40 Los métodos, moléculas y composiciones de la presente invención que inhiben los genes descritos en este documento se analizan en profundidad en este documento, y cualquiera de dichas moléculas y/o composiciones se emplean de manera beneficiosa en el tratamiento de un sujeto que padece una o más de dichas afecciones.

Cuando los aspectos o realizaciones de la invención o los ejemplos descritos en este documento se describen en términos de grupos Markush u otra agrupación de alternativas, los expertos en la técnica reconocerán que la invención también se describe en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo.

Interferencia de ARNbc y ARN

45 La interferencia de ARN (ARNi) es un fenómeno que implica el silenciamiento postranscripcional específico de genes dependiente de ARN bicatenario (bc). Los intentos iniciales de estudiar este fenómeno y manipular células de mamíferos experimentalmente se vieron frustrados por un mecanismo de defensa antivírico no específico activo que se activó en respuesta a moléculas de ARNbc largas (Gil et al., Apoptosis, 2000, 5:107-114). Más tarde, se descubrió que los dúplex sintéticos de ARN de 21 nucleótidos podrían mediar el ARNi específico de genes en células de mamíferos, sin estimular 50 los mecanismos de defensa antivirales genéricos (Elbashir et al. Nature 2001, 411:494-498 y Caplen et al. PNAS 2001, 98:9742-9747). Como resultado, los ARN interferentes pequeños (ARNip), que son ARN bicatenarios cortos, se han usado ampliamente para inhibir la expresión génica y comprender la función de los genes.

55 La interferencia de ARN (ARNi) está mediada por pequeños ARN de interferencia (ARNip) (Fire et al, Nature 1998, 391:806) o microARN (miARN) (Ambros V. Nature 2004, 431:350-355); y Bartel DP. Cell. 2004 116(2):281-97). El procedimiento correspondiente se denomina comúnmente silenciamiento génico postranscripcional específico cuando se observa en plantas y como extinción cuando se observa en hongos.

Un compuesto de ARNip es un ARN bicatenario que regula negativamente o silencia (esto es, inhibe total o parcialmente) la expresión de un gen/ARNm endógeno o exógeno. La interferencia del ARN se basa en la capacidad de ciertas especies de ARNbc para ingresar a un complejo proteico específico, donde luego se dirigen a ARN celulares complementarios y los degrada específicamente. De este modo, la respuesta de interferencia de ARN presenta un complejo de endonucleasa que contiene un ARNip, comúnmente conocido como complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que media la escisión de ARN monocatenario que tiene una secuencia complementaria a la hebra antisentido del dúplex de ARNip. La escisión del ARN diana puede tener lugar en el medio de la región complementaria a la hebra antisentido del dúplex de ARNip (Elbashir, et al., *Genes Dev.*, 2001, 15:188). Con más detalle, los ARNbc más largos se digieren en fragmentos cortos (17-29 pb) de ARNbc (también denominados ARN inhibidores cortos o "ARNip") por las RNAsas de tipo III (DICER, 5 DROSHA, etc., (véase Bernstein et al., *Nature*, 2001, 409:363-6 y Lee et al., *Nature*, 2003, 425:415-9). El complejo de proteínas RISC reconoce estos fragmentos y el ARNm complementario. Todo el procedimiento culmina con la escisión por endonucleasa del ARNm diana (McManus and Sharp, *Nature Rev Genet*, 2002, 3:737-47; Paddison and Hannon, *Curr Opin Mol Ther.* 2003, 5(3): 217-24). (para obtener información adicional sobre estos términos y los mecanismos propuestos, véase, por ejemplo, Bernstein, et al., *RNA*. 2001, 7(11):1509-21; Nishikura, *Cell*. 2001, 107(4):415-8 y la Publicación PCT No. WO 01/36646).

Se ha informado ampliamente sobre la selección y síntesis de compuestos de ARNbc correspondientes a genes conocidos; véase, por ejemplo, Ui-Tei et al., *J Biomed Biotechnol*. 2006; 65052; Chalk et al., *BBRC*. 2004, 319(1):264-74; Sioud and Leirdal, *Met. Mol Biol.*; 2004, 252:457-69; Levenkova et al., *Bioinform*. 2004, 20(3):430-2; Ui-Tei et al., *NAR* 2004, 32(3):936-48. Para ejemplos del uso y producción de ARNip modificado, véanse Braasch et al., *Biochem.*, 2003, 20(26):7967-75; Chiu et al., *ARN*, 2003, 9(9):1034-48; publicaciones PCT WO 2004/015107 (atugen); WO 02/44321 (Tuschl et al), y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,898,031 y 6,107,094.

Diversos grupos han descrito el desarrollo de vectores basados en ADN capaces de generar ARNip dentro de las células. El método generalmente implica la transcripción de ARN en horquilla cortos que se procesan eficientemente para formar ARNip dentro de las células (Paddison et al. *PNAS USA* 2002, 99:1443-1448; Paddison et al. *Genes & Dev* 2002, 16:948-958; Sui et al. *PNAS USA* 2002, 8:5515-5520; y Brummelkamp et al. *Science* 2002, 296:550-553). Estos informes describen métodos para generar ARNip capaces de dirigirse específicamente a numerosos genes expresados de forma endógena y exógena.

Los estudios han revelado que el ARNip puede ser eficaz *in vivo* tanto en mamíferos como en seres humanos. Específicamente, Bitko et al., demostraron que los ARNip específicos dirigidos contra el gen de la nucleocápsida N del virus respiratorio sincitial (RSV) son eficaces en el tratamiento de ratones cuando se administran por vía intranasal (Nat. Med. 2005, 11(1):50-55). Para revisiones de aplicaciones terapéuticas de ARNip, véase por ejemplo Barik (Mol. Med 2005, 83: 764-773) y Chakraborty (Current Drug Targets 2007 8(3):469-82). Además, se han realizado estudios clínicos con ARNip cortos que se dirigen al receptor VEGFR1 para tratar la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) en pacientes humanos (Kaiser, *Am J Ophthalmol.* 2006 142(4):660-8). Se puede encontrar más información sobre el uso de ARNip como agentes terapéuticos en Durcan, 2008. *Mol. Pharma.* 5(4):559-566; Kim and Rossi, 2008. *BioTechniques* 44:613-616; Grimm and Kay, 2007, *JCI*, 117(12):3633-41.

Síntesis química

Los compuestos de la presente invención se pueden sintetizar mediante cualquiera de los métodos que son bien conocidos en la técnica para la síntesis de oligonucleótidos ribonucleicos (o desoxirribonucleicos). Tal síntesis se describe, entre otros, en Beaucage and Iyer, *Tetrahedron* 1992; 48:2223-2311; Beaucage and Iyer, *Tetrahedron* 1993; 49: 6123-6194 y Caruthers, et. al., *Methods Enzymol.* 1987; 154: 287-313; la síntesis de tioatos se describe, entre otros, en Eckstein, *Annu. Rev. Biochem.* 1985; 54: 367-402, la síntesis de moléculas de ARN se describe en Sproat, en *Humana Press* 2005 editado por Herdewijn P.; Kap. 2: 17-31 y los respectivos procedimientos posteriores se describen, entre otros, en Pingoud et. al., en *IRL Press* 1989 editado por Oliver R.W.A.; Kap. 7: 183-208.

45 Se conocen en la técnica otros procedimientos sintéticos, por ejemplo los procedimientos descritos en Usman et al., 1987, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 7845; Scaringe et al., 1990, *NAR.*, 18, 5433; Wincott et al., 1995, *NAR.* 23, 2677-2684; y Wincott et al., 1997, *Methods Mol. Bio.*, 74, 59, y estos procedimientos pueden hacer uso de grupos protectores y de acoplamiento de ácidos nucleicos comunes, tales como dimetoxitritilo en el terminal 5' y fosforamiditas en el terminal 3'. Los nucleótidos modificados (por ejemplo, 2'-ometilados) y los nucleótidos no modificados se incorporan según se deseé.

50 Los oligonucleótidos descritos en este documento se pueden sintetizar por separado y unirse post-sintéticamente, por ejemplo, mediante ligación (Moore et al., 1992, *Science* 256, 9923; Draper et al., *International Patent Publication No. WO 93/23569*; Shabarova et al., 1991, *NAR* 19, 4247; Bellon et al., 1997, *Nucleosides & Nucleotides*, 16, 951; Bellon et al., 1997, *Bioconjugate Chem.* 8, 204), o por hibridación después de la síntesis y/o desprotección.

55 Se observa que se puede usar una máquina disponible comercialmente (disponible, *inter alia*, de Applied Biosystems); los oligonucleótidos se preparan según las secuencias descritas en este documento. Los pares superpuestos de fragmentos sintetizados químicamente se pueden ligar usando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, véase la Patente de los Estados Unidos No. 6,121,426). Las hebras se hibridaron por separado y luego se hibridan entre sí en el tubo. Luego, las moléculas bicatenarias se separan de los oligonucleótidos monocatenarios que no se hibridaron (por ejemplo, debido al exceso de uno de ellos) mediante HPLC. En relación con los fragmentos de ARNbc o ARNip descritos

en este documento, se pueden sintetizar dos o más de tales secuencias y enlazar entre sí para su uso en la presente invención.

Las moléculas también se pueden sintetizar a través de la metodología de síntesis en tándem, como se describe, por ejemplo, en la Publicación de la Patente de los Estados Unidos No. US 2004/0019001 (McSwiggen) en la que ambas 5 cadenas de ARNip se sintetizan como un único fragmento o cadena de oligonucleótidos contiguos separados por un enlazante escindible que se escinde posteriormente para proporcionar fragmentos o hebras de ARNip separados que hibridan y permiten la purificación del dúplex de ARNip. El enlazante puede ser un enlazante polinucleotídico o un enlazante no nucleotídico.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende dos o más moléculas de ARNip 10 para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades y afecciones mencionadas en este documento, por lo que dichas dos moléculas se pueden mezclar físicamente en la composición farmacéutica en cantidades que generan una actividad igual o beneficiosa de otro modo, o se pueden unir covalentemente o no covalentemente, o unirse por un enlazante de ácido nucleico de una longitud que varía desde 2-100, preferiblemente de 2-50 o de 2-30 nucleótidos. En un ejemplo, las moléculas de ARNip están compuestas por una estructura de ácido nucleico bicatenario como se describe en este 15 documento, en la que las dos moléculas de ARNbc se seleccionan entre los oligonucleótidos descritos en este documento. De este modo, las moléculas de ARNip se pueden unir o unir covalentemente o no covalentemente mediante un enlazante para formar un compuesto de ARNip en tándem. Tales moléculas de ARNbc en tándem que comprenden dos secuencias de ARNip son por lo general de 38-150 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de 38 o 40-60 nucleótidos de longitud y, de acuerdo con lo anterior, más largas si se incluyen más de dos secuencias de ARNip en la molécula en tándem.

20 También se prevé un compuesto en tándem más largo que consta de dos o más secuencias más largas que codifican ARNip producido mediante procesamiento celular interno, por ejemplo, ARNbc largos, al igual que una molécula en tándem que codifica dos o más ARNhp. Estas moléculas en tándem también se consideran parte de la divulgación. Se prevé un compuesto que comprende dos (tándem) o más (RNAiestrella) secuencias de ARNbc descritas en este documento. Ejemplos de moléculas en "tándem" o "estrella" se proporcionan en la publicación de patente PCT núm. WO 25 2007/091269, asignado al cesionario de la presente solicitud.

Las moléculas de ARNbc que se dirigen al DDIT4 pueden ser el principal componente activo en una composición farmacéutica, o pueden ser un componente activo de una composición farmacéutica que contiene dos o más ARNbc (o 30 moléculas que codifican o producen endógenamente dos o más ARNbc, ya sea una mezcla de moléculas o una o más moléculas en tándem que codifican dos o más ARNbc), comprendiendo además dicha composición farmacéutica una o más moléculas de ARNbc adicionales que se dirigen a uno o más genes adicionales. La inhibición simultánea de dicho (s) gen (es) adicional (es) probablemente tendrá un efecto aditivo o sinérgico para el tratamiento de las enfermedades descritas en este documento.

Adicionalmente, el ARNbc descrito en este documento o cualquier molécula de ácido nucleico que comprenda o codifique tal ARNbc se puede unir o unir (covalente o no covalentemente) a anticuerpos (incluidas moléculas aptámeros) contra las 35 moléculas internalizables de la superficie celular expresadas en las células diana, con el fin de lograr una mejor dirección para el tratamiento de las enfermedades descritas en este documento. Por ejemplo, el anticuerpo anti-Fas (preferiblemente un anticuerpo neutralizante) se puede combinar (covalentemente o no covalentemente) con cualquier ARNbc. En otro ejemplo, un aptámero que puede actuar como ligando/anticuerpo se puede combinar (covalentemente o no covalentemente) con cualquier ARNbc.

40 Las moléculas de ácido nucleico descritas en este documento se pueden administrar ya sea directamente o con vectores virales o no virales. Cuando se administran directamente, las secuencias generalmente se vuelven resistentes a las nucleasas. Alternativamente, las secuencias se pueden incorporar en cassetes o construcciones de expresión de manera que la secuencia se exprese en la célula como se describe a continuación en este documento. Generalmente, la construcción contiene la secuencia reguladora o el promotor apropiados para permitir que la secuencia se exprese en la célula diana. Los vectores usados opcionalmente para la administración de los compuestos de la presente invención están 45 disponibles comercialmente y se pueden modificar con el fin de administrar los compuestos de la presente invención mediante métodos conocidos para un experto en la técnica.

Modificaciones químicas

Todos los análogos o modificaciones de un nucleótido/oligonucleótido se pueden emplear con la presente invención, 50 siempre que dicho análogo o modificación no afecte sustancialmente a la función del nucleótido/oligonucleótido. Los nucleótidos se pueden seleccionar de bases modificadas sintéticas o de origen natural. Las bases de origen natural incluyen adenina, guanina, citosina, timina y uracilo. Las bases modificadas de nucleótidos se describen en este documento.

Además, se pueden preparar análogos de polinucleótidos en la que la estructura de uno o más nucleótidos está 55 fundamentalmente alterada y es más adecuada como reactivos terapéuticos o experimentales. Un ejemplo de un análogo de nucleótido es un ácido nucleico peptídico (PNA) en la que el esqueleto de desoxirribosa (o ribosa) fosfato en el ADN (o ARN se reemplaza por un esqueleto de poliamida que es similar a la que se encuentra en los péptidos. Se ha demostrado que los análogos de PNA son resistentes a la degradación enzimática y tener una estabilidad extendida in vivo e in vitro. Otras modificaciones que se pueden hacer a los oligonucleótidos incluyen esqueletos poliméricos,

5 esqueletos cílicos, esqueletos acíclicos, esqueletos de tiofosfato-D-ribosa, esqueletos de triéster, esqueletos de tioato, esqueleto en puente 2'-5', ácidos nucleicos artificiales, ácidos nucleicos morfolino, ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico de glicol (GNA), ácido nucleico treosa (TNA), arabinósido y nucleósido espejo (por ejemplo, beta-L-desoxinucleósido en lugar de beta-D-desoxinucleósido). Se describen ejemplos de moléculas de ARNbc que comprenden nucleótidos de LNA en Elmen et al., (NAR 2005, 33(1):439-447).

Los compuestos de ácido nucleico de la presente invención se pueden sintetizar usando uno o más nucleótidos invertidos, por ejemplo timidina invertida o adenina invertida (véase, por ejemplo, Takei, et al., 2002, JBC 277(26):23800-06).

10 El término "unidad estructural no convencional", como se usa en este documento, incluye un desoxirribonucleótido, un desoxirribonucleótido modificado, un nucleótido espejo (L-ADN y L-ARN), un análogo de nucleótido de apareamiento sin bases y un nucleótido unido a un nucleótido adyacente por un enlace fosfato 2'-5' internucleótido; unidades estructurales C3, C4, C5 y C6; ácidos nucleicos de treosa (TNA, análogos de ácidos nucleicos modificados con base de pirazolotriazina (Pyr); morfolino; ácidos nucleicos con puente que incluyen LNA y ácidos nucleicos con puente de etileno (ENA).

15 El término "unidad estructural de protección", como se usa en este documento, incluye unidad estructural de ribosa abásica, unidad estructural de desoxirribosa abásica, modificaciones de ribosa abásica y unidades estructurales de desoxirribosa abásica que incluyen modificaciones de 2'O alquilo; unidades estructurales de ribosa abásica invertida y desoxirribosa abásica y modificaciones de las mismas; C6-imino-Pi; un nucleótido espejo que incluye L-ADN y L-ARN; 5'OMe nucleótido; y análogos de nucleótidos que incluyen 4',5' metileno nucleótido; 1-(β -D-eritrofuranosil)nucleótido; 4'-tio nucleótido, carbocíclico nucleótido; fosfato de 5'-aminoalquilo; fosfato de 1,3-diamino-2-propilo, fosfato de 3-aminopropilo; fosfato de 6-aminohexil; fosfato de 12-aminododecilo; fosfato de hidroxipropilo; 1,5-anhidrohexitol nucleótido; alfa-nucleótido; treo-pentofuranosil nucleótido; 3',4'-seco nucleótido acíclico; 3,4-dihidroxibutil nucleótido; 3,5-dihidroxipentil nucleótido, unidad estructural abásica 5'-5'-invertida; fosfato de 1,4-butanediol; 5'-amino; metilfosfonato puente o no puente, unidades estructurales 5'-mercaptopo o una unidad estructural fenil hidrocárgalo, por ejemplo THNB

20

25 La unidad estructural de desoxirribosa abásica incluye, por ejemplo, desoxiribosa-3'-fosfato abásica; 1,2-didesoxi-D-ribofuranosa-3-fosfato; 1,4-anhidro-2-desoxi-D-ribitol-3-fosfato. La unidad estructural de desoxirribosa abásica invertida incluye desoxiriboabásico invertido; desoxiriboabásico 5' fosfato 3',5' invertido.

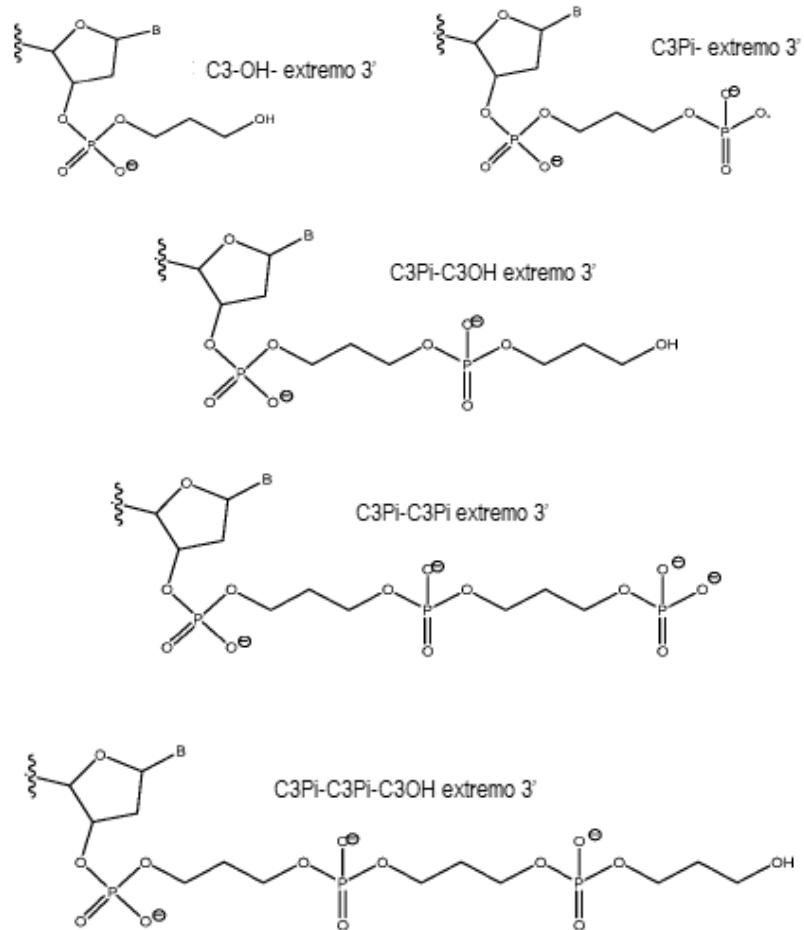
30 Un nucleótido "espejo" es un nucleótido con quiralidad inversa al nucleótido de origen natural o comúnmente empleado, esto es, una imagen especular (nucleótido L) del (nucleótido D) de origen natural. El nucleótido puede ser un ribonucleótido o un desoxirribonucleótido y puede comprender además al menos una modificación azúcar, base y/o del esqueleto. La Patente de los Estados Unidos No. 6,602,858 describe catalizadores de ácido nucleico que comprenden al menos una sustitución de L-nucleótido. El nucleótido espejo incluye, por ejemplo, L-ADN (L-desoxiriboadenosina-3'-fosfato (espejo dA); L-desoxirribocitidina-3'-fosfato (espejo dC); L-desoxirriboguanosina-3'-fosfato (espejo dG); L- desoxiribotimidina-3'-fosfato (imagen especular dT)) y L-ARN (L-riboadenosina-3'-fosfato (espejo rA); L-ribocitidina-3'-fosfato (espejo rC); L-riboguanosina-3'-fosfato (espejo rG); L-ribouracil-3'-fosfato (espejo rU)).

35 En diversas realizaciones de la estructura (A2) o ejemplos de la estructura (A4), Z y Z' están ausentes. En otros ejemplos, Z o Z' está presente. En algunos ejemplos, cada uno de Z y/o Z' incluye independientemente una unidad estructural alquilo C2, C3, C4, C5 o C6, opcionalmente una unidad estructural C3 [propano, -(CH₂)₃] o un derivado de la misma que incluye propanol (C3-OH/C3OH), propanodiol y derivado fosfodiéster de propanodiol ("C3Pi"). En los ejemplos preferidos, cada uno de Z y/o Z' incluye dos unidades estructurales hidrocarbonados y en algunos ejemplos es C3Pi-C3OH o C3Pi-C3Pi. Cada C3 se conjuga covalentemente a un C3 adyacente mediante un enlace covalente, preferiblemente un enlace basado en fosfo. En algunos ejemplos, el enlace basado en fosfo es un enlace fosforotioato, fosfonoacetato o fosfodiéster.

40 En realizaciones específicas de la estructura (A2) o ejemplos de la estructura (A4), x=y=18 y Z comprende al menos un saliente de alquilo C3. En algunos ejemplos, el saliente C3-C3 está unido covalentemente al terminal 3' de (N)x o (N')y mediante un enlace covalente, preferiblemente un enlace fosfodiéster. En algunos ejemplos, el enlace entre un primer C3 y un segundo C3 es un enlace fosfodiéster. En algunos ejemplos, el saliente de no nucleótidos 3' es C3Pi-C3Pi. En algunos ejemplos, el saliente de no nucleótidos 3' es C3Pi-C3Ps. En algunos ejemplos, el saliente de no nucleótidos 3' es C3Pi-C3OH (OH es hidroxi). En algunos ejemplos, el saliente de no nucleótidos 3' es C3Pi-C30H. En ejemplos preferidos, el saliente 3' de la hebra antisentido es CH3Pi-CH3Pi.

45 En diversos ejemplos, la unidad estructural alquilo comprende un derivado de alquilo que incluye una unidad estructural alquilo C3, alquilo C4, alquilo C5 o alquilo C6 que comprende un grupo hidroxilo terminal, amino terminal o fosfato terminal. En algunos ejemplos, la unidad estructural alquilo es una unidad estructural alquilo C3 o derivado de alquilo C3. En algunos ejemplos, la unidad estructural alquilo C3 comprende propanol, propilfosfato, propilfosforotioato o una combinación de los mismos. La unidad estructural alquilo C3 está unida covalentemente al terminal 3' de (N)y y/o al terminal 3' de (N)x mediante un enlace fosfodiéster. En algunos ejemplos, la unidad estructural alquilo comprende propanol, fosfato de propilo o fosforotioato de propilo. En algunos ejemplos, cada uno de Z y Z' se selecciona independientemente de propanol, propilfosfato propilfosforotioato, combinaciones de los mismos o múltiples de los mismos, en particular 2 o 3 propanol, propilfosfato, propilfosforotioato unidos covalentemente o combinaciones de los mismos. En algunos ejemplos, cada uno de Z y Z' se selecciona independientemente entre propilfosfato, propilfosforotioato, propilfosfopropanol; fosforotioato de propil fosfo-propilo; fosfato de propilfosfo-propilo; (propil fosfato)3,

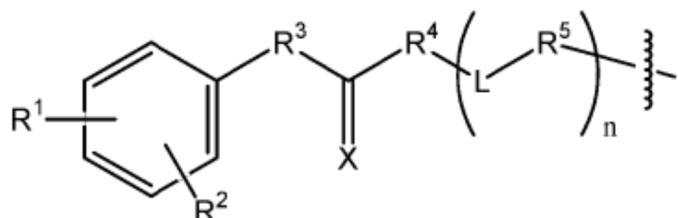
(propil fosfato)2-propanol, (propil fosfato)2-propil fosforotioato. Cualquier unidad estructural conjugada de propano o propanol se puede incluir en Z o Z'.



5 Las estructuras de unidades estructurales no nucleótidos terminales 3' de ejemplo son las siguientes:

Conjugado de hidrocarbilo fenilo

En algunos ejemplos, se proporcionan moléculas de ARNbc que se dirigen al DDIT4 unido covalentemente, directamente o mediante un enlazante, a al menos una unidad estructural fenil hidrocarbilo de fórmula general I:



10 en la que

R¹ y R² se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, grupo hidrocarbilo C₁-C₁₀, OR⁶, OCOR⁶, COOR⁶, CH₂OR⁶, CHO, COR⁶, NR⁶R⁷ y SR⁶; o R¹ y R² junto con los carbonos a los que están unidos forman un anillo hidrocarbilo C₁-C₈ cíclico saturado o insaturado opcionalmente interrumpido por hasta 2 heteroátomos seleccionados entre oxígeno, nitrógeno o azufre y el anillo opcionalmente sustituido por hasta 3 grupos seleccionados independientemente del grupo que consiste en halógeno, grupo hidrocarbilo C₁-C₃, OR⁶, OCOR⁶, COOR⁶, CH²OR⁶, CHO, COR⁶, NR⁶R⁷, SR⁶, =O, =S y =NH;

R³ es un grupo hidrocarbilo C₁-C₈ opcionalmente interrumpido por hasta 2 heteroátomos seleccionados entre oxígeno, nitrógeno o azufre;

R⁴ es NH, O, S o CR⁶R⁷;

R⁶ y R⁷ cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H y un grupo hidrocarbilo C₁-C₄;

X es O S;

5 n es un número entero de 0 a 10; cada L en n dichos grupos (L-R⁵) se selecciona independientemente del grupo que consiste en R⁸O-, una cadena peptídico de hasta 12 residuos de aminoácidos, -[CH₂-CH₂-O]_m- y un grupo hidrocarbilo C₁-C₁₂ opcionalmente interrumpido por hasta 2 heteroátomos seleccionados entre O, N o S; R⁸ es un grupo hidrocarbilo C₁-C₁₂ opcionalmente interrumpido por hasta 2 heteroátomos seleccionados entre O, N o S;

m es un número entero de 1 a 10;

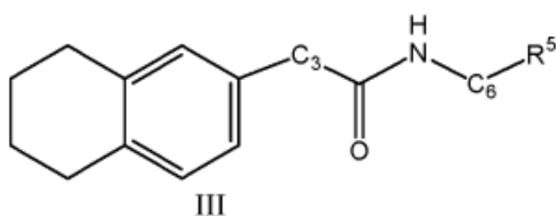
10 cada R⁵ en n dichos grupos (L-R⁵) se selecciona independientemente del grupo que consiste en -P(O)(R⁹)-O-, -C(O)NH-, -O-; -NH-, -S-, -C(O)-; -C(O)O-; -NHCS-; -NHCO- y un enlace sencillo;

R⁹ se selecciona del grupo que consiste en O-, S-, BH₃ -, NR⁶R⁷ y CH₃;

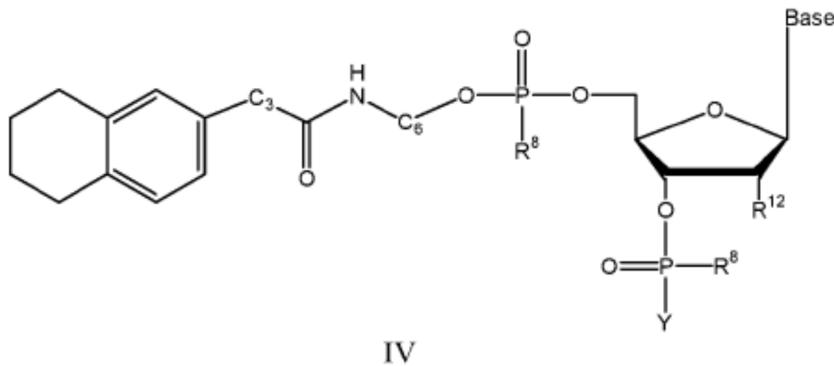
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

en la que la hebra sentido tiene identidad de secuencia con un segmento consecutivo de un ARNm correspondiente a un gen diana.

15 En un ejemplo, el ARNbc se une covalentemente a un compuesto de fórmula I en la que X es O, R⁴ es NH, R¹ y R² forman un anillo C₄ cíclico condensado con el anillo fenilo de fórmula I o II, R³ es alquilo C₃, L es un alquilo C₆ y se proporciona en este documento un derivado de amida 4-fenilbutírico 6[(5,6,7,8-tetrahidronaftalen) butírico amida] (THNB) de fórmula general III:



20 En algunos ejemplos, la 6[(5,6,7,8-tetrahidronaftalen) butírico amida] (THNB) está unida al terminal 5' de un oligonucleótido, por ejemplo, el terminal 5' de una hebra sentido de un ARNbc y tiene la fórmula general IV:



en la que Y es un oligonucleótido de aproximadamente 16 a 39 nucleótidos de longitud, unido al 5'O del nucleótido adyacente;

25 en la que la base es adenina, guanina, citosina, uracilo, timidina o un análogo de los mismos; y en la que R¹² es H, OH, OR⁶, NR⁶R⁷, OR⁶OR⁷.

Indicaciones

Las moléculas de ácido nucleico bicatenario para DDIT4 descritas en este documento son útiles en la terapia en general y en particular en la prevención o el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos en los que la etiología o progresión de la enfermedad o trastorno está relacionada con la expresión de DDIT4. A continuación se muestran ejemplos no limitantes de tales enfermedades y trastornos.

Neuroprotección

En diversos aspectos, se proporciona en este documento un método para proporcionar neuroprotección, efectuar el crecimiento axonal y/o la estimulación de células progenitoras neurales a un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una dosis eficaz terapéuticamente de un ARNbc descrito en este documento que regula negativamente la expresión de DDIT4 proporcionando así neuroprotección, efectuando el crecimiento axonal y/o la estimulación de las células progenitoras neurales. En algunos ejemplos, los métodos de ARNbc descritos en este documento promueven el crecimiento de axones (por ejemplo, postraumatismo en los ojos o cualquier órgano con disfunción neurológica) y/o para promover la mielinización (por ejemplo, trastornos postraumáticos o desmielinizantes).

5 En algunos aspectos, los métodos descritos en este documento comprenden proporcionar neuroprotección a una célula ganglionar. En algunos aspectos, la célula ganglionar es una célula ganglionar de la retina. En diversos aspectos, los métodos comprenden promover el crecimiento axonal de una célula neuroprogenitora. En algunos aspectos, la célula neuroprogenitora es una célula neuroprogenitora de la retina. En algunos aspectos, los métodos comprenden proporcionar neuroprotección a una célula ganglionar de la retina y/o promover el crecimiento axonal de una célula neuroprogenitora de la retina.

10 15 Atrofia: en algunos aspectos, las moléculas de ARNbc descritas en este documento son útiles para atenuar la atrofia muscular, por ejemplo, la atrofia muscular resultante de una fractura ósea o inmovilización a largo plazo del músculo.

En otros aspectos, las moléculas de ARNbc descritas en este documento son útiles para atenuar la atrofia de la piel, por ejemplo, la atrofia de la piel asociada con el estrés oxidativo resultante del tratamiento con esteroides, la exposición a los rayos UV o el envejecimiento.

20 25 30 35 Enfermedades oculares: en algunos aspectos, se proporciona en este documento un método de tratamiento de una enfermedad, trastorno o lesión que comprende administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de un ARNbc descrito en este documento que regula negativamente la expresión de DDIT4, tratando así la enfermedad, trastorno o la lesión se selecciona del grupo que consiste en glaucoma, que incluye glaucoma de ángulo abierto (OAG), retinopatía diabética (DR), edema macular diabético (DME), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), degeneración macular relacionada con la edad húmeda (AMD húmeda), neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), atrofia óptica de Leber, neuritis óptica, oclusión de la arteria retiniana, oclusión de la vena central de la retina, oclusión de la vena retiniana en rama, neuropatía óptica isquémica, lesión del nervio óptico, retinopatía del prematuro (ROP) o retinitis pigmentosa (RP), degeneración del ganglio retiniano, degeneración macular, neuropatía óptica hereditaria, neuropatía óptica metabólica, neuropatía óptica debida a un agente tóxico o neuropatía causada por reacciones adversas a fármacos o deficiencia de vitaminas, inflamación, isquemia, infección o compresión de tumores o aneurismas. En algunos aspectos, la enfermedad, trastorno o lesión es el resultado de una presión intraocular elevada (IOP). En algunos aspectos, la enfermedad, trastorno o lesión está asociada con la diabetes. En aspectos preferidos, la enfermedad, trastorno o lesión ocular es glaucoma, DME, neuritis óptica y neuropatía óptica. En algunos aspectos, la neuropatía óptica se selecciona de neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica (NAION), neuritis óptica, neuromielitis óptica, atrofia óptica dominante, neuropatía óptica hereditaria de Leber. En algunos aspectos preferidos, la enfermedad es el glaucoma. En algunos aspectos preferidos, la enfermedad ocular es DME

Trastornos microvasculares: los trastornos microvasculares incluyen un amplio grupo de afecciones que afectan principalmente a los capilares microscópicos y linfáticos y, por lo tanto, están fuera del alcance de la intervención quirúrgica directa. La enfermedad microvascular se puede agrupar ampliamente en vasoespástica, vasculitis y oclusiva linfática. 40 Además, muchas de las afecciones vasculares conocidas tienen un elemento microvascular. Los trastornos categorizados como "trastornos microvasculares" también se pueden clasificar como, por ejemplo, enfermedades o trastornos renales, oftálmicos o inflamatorios.

45 Patologías microvasculares asociadas con la diabetes: la diabetes es la causa principal de ceguera, la causa número uno de amputaciones e impotencia, y una de las enfermedades infantiles crónicas que ocurren con mayor frecuencia. La diabetes también es la principal causa de enfermedad renal en etapa terminal en los Estados Unidos, con una tasa de prevalencia del 31 % en comparación con otras enfermedades renales. La diabetes también es la indicación más frecuente de trasplante de riñón, representando el 22 % de todos los trasplantes.

50 En general, las complicaciones diabéticas se pueden clasificar ampliamente como enfermedad microvascular o macrovascular. Las complicaciones microvasculares incluyen neuropatía (daño a los nervios), nefropatía (enfermedad renal) y trastornos de la visión (por ejemplo, retinopatía, glaucoma, cataratas y enfermedad de la córnea). En la retina, el glomérulo y los vasos nerviosos, características fisiopatológicas similares caracterizan la enfermedad microvascular específica de la diabetes (para obtener más información, véase Larsen: Williams Textbook of Endocrinology, 10^a ed., 2003 Elsevier).

55 Neuropatía: la neuropatía afecta a todos los nervios periféricos: fibras del dolor, neuronas motoras, nervios autónomos y, por lo tanto, necesariamente puede afectar a todos los órganos y sistemas. Hay varios síndromes distintos en base a los sistemas de órganos y miembros afectados, pero estos de ninguna manera son exclusivos. Un paciente puede tener neuropatía sensoriomotora y autonómica o cualquier otra combinación. A pesar de los avances en la comprensión de las causas metabólicas de la neuropatía, los tratamientos destinados a interrumpir estos procedimientos patológicos se han

5 visto limitados por los efectos secundarios y la falta de eficacia. De este modo, los tratamientos son sintomáticos y no abordan los problemas subyacentes. Los agentes para el dolor causado por la neuropatía sensoriomotora incluyen los antidepresivos tricíclicos (TCA), los inhibidores de la recaptación de serotonina (SSRI) y los fármacos antiepilepticos (AED). Ninguno de estos agentes revierte los procedimientos patológicos que conducen a la neuropatía diabética y ninguno altera el curso implacable de la enfermedad. Las moléculas descritas en este documento son útiles para tratar sujetos afectados por neuropatía.

10 Neuropatía diabética: las neuropatías diabéticas son trastornos neuropáticos (daño del nervio periférico) que están asociados con la diabetes mellitus. Estas afecciones generalmente son el resultado de una lesión microvascular diabética que implica pequeños vasos sanguíneos que irrigan los nervios (vasa nervorum). Las afecciones relativamente comunes que pueden estar asociadas con la neuropatía diabética incluyen parálisis del tercer nervio; mononeuropatía; mononeuropatía múltiple; amiotrofia diabética; una polineuropatía dolorosa; neuropatía autonómica; y neuropatía toracoabdominal y la forma más común, neuropatía periférica, que afecta principalmente a pies y piernas. Hay cuatro factores implicados en el desarrollo de la neuropatía diabética: enfermedad microvascular, productos finales glicados avanzados, proteína quinasa C y la vía de los poliol.

15 15 Isquemia diabética de las extremidades y úlceras del pie diabético: la diabetes y la presión pueden alterar la circulación microvascular y provocar cambios en la piel de las extremidades inferiores, que a su vez pueden conducir a la formación de úlceras y la posterior infección. Los cambios microvasculares conducen a una microangiopatía de los músculos de las extremidades, así como a una predisposición a desarrollar isquemia periférica y una respuesta compensadora de angiogénesis reducida a los eventos isquémicos. La patología microvascular agrava la enfermedad vascular periférica (PVD) (o enfermedad arterial periférica (PAD) o enfermedad arterial de las extremidades inferiores (LEAD) - una complicación MACROvascular - estrechamiento de las arterias en las piernas debido a la aterosclerosis. La PVD ocurre antes en los diabéticos, es más grave y generalizada, y a menudo implica problemas microcirculatorios intercurrentes que afectan las piernas, los ojos y los riñones.

20 25 Las úlceras del pie y la gangrena son afecciones comórbidas frecuentes de PAD. La neuropatía periférica concurrente con alteración de la sensibilidad hace que el pie sea susceptible a traumatismos, ulceraciones e infecciones. La progresión de la PAD en la diabetes se ve agravada por una comorbilidad como la neuropatía periférica y la insensibilidad de los pies y las extremidades inferiores al dolor y al traumatismo.

30 30 Disfunción microvascular coronaria en diabetes: La correlación entre histopatología y disfunción microcirculatoria en diabetes es bien conocida a partir de estudios experimentales antiguos y de autopsias, donde se encuentran con frecuencia engrosamiento de la membrana basal, fibrosis perivascular, enrarecimiento vascular y hemorragia capilar. Las moléculas descritas en este documento son útiles en el tratamiento de sujetos que padecen neuropatía y disfunción microvascular coronaria en la enfermedad arterial coronaria no obstructiva (CAD).

35 40 Nefropatía diabética (disfunción renal en pacientes con diabetes): la nefropatía diabética abarca microalbuminuria (un efecto de enfermedad microvascular), proteinuria y enfermedad renal en etapa terminal (ESRD). La diabetes es la causa más común de insuficiencia renal, representando más del 40 por ciento de los casos nuevos. Incluso cuando los fármacos y la dieta pueden controlar la diabetes, la enfermedad puede provocar nefropatía e insuficiencia renal. La mayoría de las personas con diabetes no desarrollan una nefropatía que sea lo suficientemente grave como para causar insuficiencia renal. Aproximadamente 16 millones de personas en los Estados Unidos tienen diabetes y aproximadamente 100,000 personas tienen insuficiencia renal como resultado de la diabetes. Las moléculas descritas en este documento son útiles en el tratamiento de sujetos afectados por nefropatía diabética.

45 Retinopatía diabética: según la Organización Mundial de la Salud, la retinopatía diabética es la principal causa de ceguera en adultos en edad de trabajar y una de las principales causas de pérdida de visión en diabéticos. La asociación estadounidense de diabetes informa que hay aproximadamente 18 millones de diabéticos en los Estados Unidos y aproximadamente 1.3 millones de casos de diabetes recién diagnosticados en los Estados Unidos cada año.

50 55 45 La retinopatía diabética se define como la disfunción progresiva de la vasculatura retiniana causada por hiperglucemia crónica. Las características clave de la retinopatía diabética incluyen microaneurismas, hemorragias retinianas, exudados de lípidos retinianos, manchas en copo de algodón, falta de perfusión capilar, edema macular y neovascularización. Las características asociadas incluyen hemorragia vítreo, desprendimiento de retina, glaucoma neovascular, catarata prematura y parálisis de pares craneales.

50 Específicamente, la apoptosis se ha localizado en células gliales tales como células de Mueller y astrocitos y se ha demostrado que ocurre dentro de 1 mes de diabetes en el modelo de rata diabética inducida por STZ. La causa de estos eventos es multifactorial, incluida la activación de la vía diacilglicerol/PKC, el estrés oxidativo y la glicosilación no enzimática. La combinación de estos eventos hace que la retina sea hipoxica y finalmente conduzca al desarrollo de retinopatía diabética. Una posible conexión entre la isquemia retiniana y los primeros cambios en la retina diabética es la producción inducida por hipoxia de factores de crecimiento tales como el VEGF. El regulador maestro de la respuesta hipoxica se ha identificado como el factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1), que controla los genes que regulan la proliferación celular y la angiogénesis. El DDIT4 responde al factor de transcripción que responde a la hipoxia, el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) y por lo general se regula positivamente durante la hipoxia tanto *in vitro* como *in vivo* en un modelo animal de accidente cerebrovascular isquémico.

5 Edema macular diabético (DME): Prevent Blindness America and the National Eye Institute estiman que en los Estados Unidos hay más de 5.3 millones de personas de 18 años o más con retinopatía diabética, incluyendo aproximadamente 500,000 con DME. El CDC estima que hay aproximadamente 75,000 nuevos casos de DME en los Estados Unidos cada año. El DME es una complicación de la retinopatía diabética, una enfermedad que afecta los vasos sanguíneos de la retina. La retinopatía diabética da como resultado múltiples anomalías en la retina, que incluyen engrosamiento y edema de la retina, hemorragias, flujo sanguíneo impedito, pérdida excesiva de líquido de los vasos sanguíneos y, en las etapas finales, crecimiento anormal de los vasos sanguíneos. Este crecimiento de los vasos sanguíneos puede provocar grandes hemorragias y daño retiniano severo. Cuando la fuga de los vasos sanguíneos de la retinopatía diabética causa hinchazón en la mácula, se denomina DME. El síntoma principal del DME es la pérdida de la visión central. Los factores de riesgo asociados con el DME incluyen niveles de glucosa en sangre mal controlados, presión arterial alta, función renal anormal que causa retención de líquidos, niveles altos de colesterol y otros factores sistémicos generales. Una molécula de ARN bicatenarios que regula negativamente el DDIT4, conocida como REDD14 o PF-655, es un candidato clínico para el tratamiento del DME. Las moléculas de ARNbc descritas en este documento son útiles para tratar sujetos afectados por DME.

10 15 Enfermedades microvasculares del riñón: el riñón está implicado en una serie de afecciones clínico-patológicas discretas que afectan a la microvasculatura sistémica y renal. Algunas de estas afecciones se caracterizan por una lesión primaria de las células endoteliales, tales como el síndrome urémico hemolítico (HUS) y la púrpura trombocitopénica trombótica (TTP). El HUS y la TTP son enfermedades estrechamente relacionadas caracterizadas por anemia hemolítica microangiopática y deterioro orgánico variable. Tradicionalmente, el diagnóstico de HUS se realiza cuando la insuficiencia renal es una característica predominante del síndrome, como es común en los niños. En los adultos, con frecuencia predomina el deterioro neurológico y el síndrome se denomina TTP. La microangiopatía trombótica es la lesión patológica subyacente en ambos síndromes, y los hallazgos clínicos y de laboratorio en pacientes con ya sea HUS o TTP se superponen en gran medida. Esto ha llevado a varios investigadores a considerar los dos síndromes como un continuo de una sola entidad patológica.

20 25 30 Patogenia: los datos experimentales sugieren fuertemente que la lesión de las células endoteliales es el evento principal en la patogénesis de HUS/TTP. El daño endotelial desencadena una cascada de eventos que incluyen coagulación intravascular local, depósito de fibrina y activación y agregación plaquetaria. El resultado final es el hallazgo histopatológico de microangiopatía trombótica común a las diferentes formas del síndrome HUS/TTP. Si el HUS/TTP no se trata, la tasa de mortalidad se acerca al 90 %. La terapia de apoyo, incluida la diálisis, los medicamentos antihipertensivos, las transfusiones de sangre y el tratamiento de las complicaciones neurológicas, contribuye a mejorar la supervivencia de los pacientes con HUS/TTP. El equilibrio del fluido adecuado y el reposo intestinal son importantes en el tratamiento del HUS típico asociado con la diarrea.

Nefritis por radiación: las consecuencias a largo plazo de una irradiación renal superior a 2500 rad se pueden dividir en cinco síndromes clínicos:

35 40 45 (i) La nefritis aguda por radiación ocurre en aproximadamente el 40 % de los pacientes después de un período de latencia de 6 a 13 meses. Se caracteriza clínicamente por la aparición repentina de hipertensión, proteinuria, edema e insuficiencia renal progresiva en la mayoría de los casos que conduce a riñones en etapa terminal.

(ii) La nefritis crónica por radiación, por el contrario, tiene un período de latencia que varía entre 18 meses y 14 años después de la agresión inicial. Tiene un inicio insidioso y se caracteriza por hipertensión, proteinuria y pérdida gradual de la función renal.

(iii) El tercer síndrome se manifiesta de 5 a 19 años después de la exposición a la radiación como proteinuria benigna con función renal normal.

(iv) Un cuarto grupo de pacientes presenta solo hipertensión benigna de 2 a 5 años después y puede tener proteinuria variable. La hipertensión maligna tardía surge de 18 meses a 11 años después de la irradiación en pacientes con nefritis crónica por radiación o hipertensión benigna. La extirpación del riñón afectado revirtió la hipertensión. Se ha informado de daño inducido por radiación en las arterias renales con posterior hipertensión vascular de Reno.

(v) Se ha observado un síndrome de insuficiencia renal análogo a la nefritis aguda por radiación en pacientes con trasplante de médula ósea (BMT) que fueron tratados con irradiación corporal total (TBI).

50 55 Microvasculopatía retiniana (retinopatía del SIDA): las moléculas de ARNbc descritas en este documento son útiles para tratar sujetos afectados por retinopatías con diferentes etiologías. La microvasculopatía retiniana se observa en el 100 % de los pacientes con SIDA y se caracteriza por hemorragias intrarretinianas, microaneurismas, manchas de Roth, manchas en copo de algodón (microinfartos de la capa de fibras nerviosas) y vaina perivasculares.

Retinopatía por trasplante de médula ósea (BMT): La retinopatía por trasplante de médula ósea se informó por primera vez en 1983. Por lo general ocurre dentro de los seis meses, pero puede ocurrir hasta 62 meses después del BMT. Los factores de riesgo tales como la diabetes y la hipertensión pueden facilitar el desarrollo de retinopatía del BMT al intensificar la microvasculopatía isquémica. No se conoce predilección por edad, sexo o raza para el desarrollo de retinopatía del BMT. Los pacientes se presentan con disminución de la agudeza visual y/o déficit del campo visual. Los

hallazgos del segmento posterior son por lo general bilaterales y simétricos. Las manifestaciones clínicas incluyen múltiples manchas en copo de algodón, telangiectasias, microaneurismas, edema macular, exudados duros y hemorragias retinianas. La angiografía con fluoresceína demuestra ausencia de perfusión capilar y abandono, anomalías microvasculares intrarretinianas, microaneurismas y edema macular. Aunque no se ha dilucidado la etiología precisa de la retinopatía del BMT, parece estar afectada por varios factores: toxicidad por ciclosporina, irradiación corporal total (TBI) y agentes quimioterapéuticos. La ciclosporina es un poderoso agente inmunomodulador que suprime la respuesta inmunitaria injerto contra huésped. Puede provocar lesiones en las células endoteliales y efectos secundarios neurológicos y, como resultado, se ha sugerido que es la causa de la retinopatía del BMT. Sin embargo, la retinopatía del BMT se puede desarrollar en ausencia del uso de ciclosporina, y no se ha demostrado que la ciclosporina cause retinopatía del BMT en receptores de médula ósea autólogos o singénicos. Por lo tanto, la ciclosporina no parece ser la única causa de retinopatía del BMT. La irradiación corporal total (TBI) también se ha implicado como la causa de la retinopatía del BMT. La radiación daña la microvasculatura retiniana y conduce a una vasculopatía isquémica.

Glaucoma: el glaucoma es una de las principales causas de ceguera en el mundo. Afecta a aproximadamente 66.8 millones de personas en todo el mundo. Al menos 12,000 estadounidenses quedan cegados por esta enfermedad cada año (Kahn and Milton, Am J Epidemiol. 1980, 111(6):769-76). El glaucoma se caracteriza por la degeneración de los axones en la cabeza del nervio óptico, principalmente debido a la presión intraocular (IOP) elevada. Una de las formas más comunes de glaucoma, conocida como glaucoma primario de ángulo abierto (POAG), resulta de la mayor resistencia del flujo de salida del humor acuoso en la red trabecular (TM), lo que causa elevación de la IOP y eventual daño del nervio óptico. Otros tipos principales de glaucoma son el glaucoma de ángulo cerrado, el glaucoma de tensión normal y el glaucoma pediátrico. Estos también se caracterizan por un aumento de la presión intraocular (IOP) o presión dentro del ojo. El daño del nervio óptico con una IOP normal se conoce como glaucoma de tensión normal. El glaucoma secundario se refiere a cualquier caso en la que otra enfermedad causa o contribuye a un aumento de la presión ocular, lo que resulta en daño del nervio óptico y pérdida de la visión. Mucke (IDrugs 2007, 10 (1): 37-41) revisa las terapias actuales, incluido el ARNip para diversos objetivos para el tratamiento de enfermedades oculares, por ejemplo, la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y el glaucoma.

Degeneración macular: la causa más común de disminución de la visión mejor corregida en individuos mayores de 65 años en los Estados Unidos es el trastorno de la retina conocido como degeneración macular relacionada con la edad (AMD). A medida que la AMD progresiva, la enfermedad se caracteriza por la pérdida de la visión central aguda. El área del ojo afectada por AMD es la mácula, una pequeña área en el centro de la retina, compuesta principalmente por células fotorreceptoras. La denominada AMD "seca", que representa alrededor del 85 % al 90 % de los pacientes con AMD, implica alteraciones en la distribución del pigmento ocular, pérdida de fotorreceptores y función retiniana disminuida debido a la atrofia general de las células. La denominada AMD "húmeda" implica la proliferación de vasos coroideos anormales que conducen a coágulos o cicatrices en el espacio subretiniano. De este modo, la aparición de AMD húmeda se produce debido a la formación de una red neovascular coroidea anormal (neovascularización coroidea, CNV) debajo de la retina neural. Los vasos sanguíneos recién formados tienen fugas excesivas. Esto conduce a la acumulación de sangre y líquido subretiniano que conduce a la pérdida de agudeza visual. Con el tiempo, se produce una pérdida total de la retina funcional en la región afectada, a medida que se forma una gran cicatriz disciforme que afecta a la coroides y la retina. Si bien los pacientes con AMD seca pueden conservar una visión de menor calidad, la AMD húmeda a menudo produce ceguera. (Hamdi & Kenney, Frontiers in Bioscience, e305-314, May 2003). La CNV se presenta no solo en la AMD húmeda sino también en otras patologías oculares tales como el síndrome de histoplasmosis ocular, estrías angiomatoides, roturas de la membrana de Bruch, degeneración miópica, tumores oculares y algunas enfermedades degenerativas retinianas.

Síndrome isquémico ocular: los pacientes que padecen síndrome isquémico ocular (OIS) son generalmente ancianos, con edades comprendidas entre los 50 y los 80 años. Los machos se ven afectados dos veces más que las hembras. Rara vez el paciente está asintomático. La disminución de la visión ocurre en el momento de la presentación en el 90 por ciento de los casos y el 40 por ciento de los pacientes tienen dolor ocular asociado. También puede haber antecedentes concomitantes o antecedentes de ataques isquémicos transitorios o amaurosis fugaz. Los pacientes también tienen una enfermedad sistémica significativa conocida o desconocida en el momento de la presentación. Las enfermedades sistémicas que se encuentran con más frecuencia son hipertensión, diabetes, cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular y enfermedad vascular periférica. En menor medida, los pacientes manifiestan OIS como resultado de arteritis de células gigantes (GCA).

Los hallazgos unilaterales están presentes en el 80 por ciento de los casos. Los hallazgos comunes pueden incluir catarata unilateral avanzada, inflamación del segmento anterior, reacción asintomática de la cámara anterior, edema macular, venas retinianas dilatadas pero no tortuosas, hemorragias en puntos y manchas periféricas medias, manchas en copo de algodón, exudados y neovascularización del disco y la retina. También puede haber pulsación arterial espontánea, presión intraocular elevada y neovascularización del iris y el ángulo con glaucoma neovascular (NVG). Si bien el paciente puede presentar neovascularización del segmento anterior, puede ocurrir hipotonía ocular debido a la baja perfusión arterial del cuerpo ciliar. Ocasionalmente, hay émbolos retinianos visibles (placas de Hollenhorst).

Síndrome del ojo seco: el síndrome del ojo seco es un problema común que generalmente resulta de una disminución en la producción de película lagrimal que lubrica los ojos. La mayoría de los pacientes con ojo seco experimentan molestias

y no pierden la visión; aunque en casos graves, la córnea puede dañarse o infectarse. Se pueden usar gotas humectantes (lágrimas artificiales) para el tratamiento, mientras que los ungüentos lubricantes pueden ayudar en casos más graves.

5 Trastornos oculares adicionales: las moléculas y composiciones descritas en este documento son útiles en el tratamiento de la neovascularización coroidea (CNV), que se produce no solo en la AMD húmeda sino también en otras patologías oculares tales como el síndrome de histoplasmosis ocular, estrías angioideas, rupturas en la membrana de Bruch, degeneración miope, tumores oculares y algunas enfermedades degenerativas de la retina.

10 Pérdida de la audición: en diversos aspectos, las moléculas de ácido nucleico bicatenario descritas en este documento se aplican a diversas afecciones de la pérdida de audición. Sin estar limitado por la teoría, la pérdida de audición puede deberse a daño o pérdida apoptótica de las células ciliadas del oído interno (Zhang et al., *Neuroscience* 2003. 120:191-205; Wang et al., *J. Neuroscience* 23((24):8596-8607), en la que el daño o la pérdida es causado por infección, lesión mecánica, sonido fuerte (ruido), envejecimiento (presbiacusia) u ototoxicidad inducida por sustancias químicas.

15 Por "ototoxina", como se usa en este documento, se entiende una sustancia que, a través de su acción química, daña, deteriora o inhibe la actividad del componente de receptores de sonido del sistema nervioso relacionado con la audición, que a su vez afecta la audición (y/o el equilibrio). La ototoxicidad incluye un efecto deletéreo sobre las células ciliadas del oído interno. Las ototoxinas incluyen fármacos terapéuticos que incluyen agentes antineoplásicos, salicilatos, diuréticos de asa, quininas y antibióticos aminoglucósidos, contaminantes en alimentos o medicinas y contaminantes ambientales o industriales. Por lo general, el tratamiento se realiza para prevenir o reducir la ototoxicidad, especialmente como resultado o esperado de la administración de fármacos terapéuticos. Preferiblemente, una composición terapéuticamente eficaz que comprende las moléculas de ácido nucleico bicatenario descritas en este documento se administra inmediatamente 20 después de la exposición para prevenir o reducir el efecto ototóxico. Más preferiblemente, el tratamiento se proporciona de forma profiláctica, ya sea mediante la administración de la composición farmacéutica antes o concomitantemente con el fármaco ototóxico o la exposición a la ototoxina. Se hace referencia a los capítulos 196, 197, 198 y 199 de *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, 14th Edition, (1982), Merck Sharp & Dome Research Laboratories, N.J. y los capítulos correspondientes en la 16a edición más reciente, incluidos los capítulos 207 y 210) relacionados con la descripción y el 25 diagnóstico de las deficiencias auditivas y del equilibrio.

30 La ototoxicidad es un efecto secundario limitante de la dosis de la administración de antibióticos. Del 4 al 15 % de los pacientes que reciben 1 gramo al día durante más de 1 semana desarrollan una pérdida auditiva mensurable, que empeora lentamente y puede conducir a una sordera permanente completa si continúa el tratamiento. Los antibióticos aminoglucósidos ototóxicos incluyen, pero no se limitan a, neomicina, paromomicina, ribostamicina, lividomicina, kanamicina, amikacina, tobramicina, viomicina, gentamicina, sisomicina, netilmicina, estreptomicina, dibecacina, fortimicina y dihidroestreptomicina, o combinaciones de los mismos. Los antibióticos particulares incluyen neomicina B, kanamicina A, kanamicina B, gentamicina C1, gentamicina C1a y gentamicina C2, y similares que se sabe que tienen una toxicidad grave, particularmente ototoxicidad y nefrotoxicidad, que reducen la utilidad de tales agentes antimicrobianos (véase Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 6th ed., A. Goodman Gilman et al., eds; 35 Macmillan Publishing Co., Inc., New York, pp. 1169-71 (1980)).

La ototoxicidad también es un efecto secundario limitante de dosis grave para los agentes anticancerígenos. Los agentes neoplásicos ototóxicos incluyen, pero no se limitan a, vincristina, vinblastina, cisplatino y compuestos de tipo cisplatino y taxol y compuestos de tipo taxol. Los compuestos similares al cisplatino incluyen carboplatino (Paraplatin®), tetraplatino, oxaliplatino, aroplatino y transplatino, entre otros, y son químioterapéuticos en base a platino.

40 Los diuréticos con efectos secundarios ototóxicos conocidos, particularmente los diuréticos de "asa" incluyen, sin limitarse a ellos, furosemida, ácido etacrilico y mercuriales. Las quininas ototóxicas incluyen, pero no se limitan a, sustitutos sintéticos de la quinina que se usan por lo general en el tratamiento de la malaria. Los salicilatos, tales como la aspirina, son los fármacos terapéuticos más usados por sus efectos antiinflamatorios, analgésicos, antipiréticos y antitrombóticos. Desafortunadamente, también tienen efectos secundarios ototóxicos. A menudo provocan tinnitus ("zumbidos en los 45 oídos") y pérdida temporal de la audición. Además, si el fármaco se usa en dosis altas durante un tiempo prolongado, la discapacidad auditiva se puede volver persistente e irreversible.

50 En algunos aspectos, una molécula descrita en este documento se coadministra con una ototoxina. Por ejemplo, se proporciona un método mejorado para el tratamiento de la infección de un mamífero mediante la administración de un antibiótico aminoglucósido, comprendiendo la mejora la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas químicamente modificadas descritas en este documento que regulan negativamente la expresión de DDT4 al sujeto en necesidad de dicho tratamiento para reducir o prevenir la discapacidad auditiva inducida por ototoxinas asociada con el antibiótico. Las moléculas de ARN bicatenario descritas en este documento se administran preferiblemente localmente dentro del oído interno.

55 Los métodos, moléculas químicamente modificadas y composiciones farmacéuticas de la presente invención también son efectivos en el tratamiento de trauma acústico o trauma mecánico, preferiblemente trauma acústico o mecánico que conduce a la pérdida de células ciliadas del oído interno. Con una exposición más severa, la lesión puede proceder de la pérdida de células de soporte adyacentes a la rotura completa del órgano de Corti. La muerte de la célula sensorial puede provocar una degeneración walleriana progresiva y la pérdida de fibras nerviosas auditivas primarias. Las moléculas descritas en este documento son útiles para tratar el trauma acústico causado por una sola exposición a un sonido

extremadamente fuerte, o después de una exposición prolongada a sonidos fuertes cotidianos por encima de 85 decibelios. Las moléculas descritas en este documento son útiles para tratar traumatismos mecánicos del oído interno, por ejemplo, resultantes de la inserción de un dispositivo electrónico en el oído interno. Las moléculas descritas en este documento previenen o minimizan el daño a las células ciliadas del oído interno asociado con la operación.

5 Otro tipo de pérdida auditiva es la presbiacusia, que es la pérdida auditiva que se produce gradualmente en la mayoría de las personas a medida que envejecen. Aproximadamente el 30-35 por ciento de los adultos entre las edades de 65 y 75 años y el 40-50 por ciento de las personas de 75 años o más experimentan pérdida auditiva. Las moléculas descritas en este documento previenen, reducen o tratan la incidencia y/o la gravedad de los trastornos del oído interno y las deficiencias auditivas asociadas con la presbiacusia.

10 Lesión pulmonar y trastornos respiratorios: en diversos aspectos, las moléculas de ARNbc descritas en este documento son útiles para tratar o prevenir la incidencia o gravedad de la lesión pulmonar aguda, en particular afecciones que resultan de una lesión isquémica/por reperfusión o estrés oxidativo y para tratar enfermedad pulmonar obstructiva (COPD). Los ejemplos no limitantes de lesiones pulmonares agudas incluyen el síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) debido a la infección por coronavirus o endotoxinas, el síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y la lesión por reperfusión por isquemia asociada con el trasplante de pulmón.

15 La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), afecta a más de 16 millones de estadounidenses y es la cuarta causa más alta de muerte en los Estados Unidos. El tabaquismo causa la mayoría de los casos de la enfermedad debilitante, pero no se pueden excluir otros factores ambientales (Petty TL. 2003. Clin. Cornerstone, 5-10).

20 El enfisema pulmonar es una manifestación principal de la COPD. La destrucción permanente de los espacios aéreos periféricos, distales a los bronquiolos terminales, es el sello distintivo del enfisema (Tuder, et al. Am J Respir Cell Mol Biol, 29:88-97; 2003). El enfisema también se caracteriza por la acumulación de células inflamatorias tales como macrófagos y neutrófilos en bronquiolos y estructuras alveolares (Petty, 2003).

25 La patogenia del enfisema es compleja y multifactorial. En humanos, se ha demostrado que una deficiencia de inhibidores de proteasas producidas por células inflamatorias, tales como la alfa 1-antitripsina, contribuye al desequilibrio proteasa/antiproteasa, favoreciendo así la destrucción de la matriz extracelular alveolar en el enfisema inducido por humo de cigarrillo (CS) (Eriksson, S. 1964. Acta Med Scand 175:197-205. Joos, L., Pare, P.D., and Sandford, A.J. 2002. Swiss Med Wkly 132:27-37).

30 Un factor patogénico adicional con respecto a la patogénesis de la COPD es la expresión disminuida observada de VEGF y VEGFRII en los pulmones de pacientes enfisematosos (Yasunori Kasahara, et al. Am J Respir Crit Care Med. Vol 163. pp 737-744, 2001). Además, la inhibición de la señalización de VEGF usando un inhibidor químico de VEGFR conduce a la apoptosis del endotelio septal alveolar y luego a la apoptosis de las células epiteliales, probablemente debido a la interrupción de la conexión estructural/funcional íntima de ambos tipos de células dentro de los alvéolos (Yasunori Kasahara et al. J. Clin. Invest. 106:1311-1319 (2000); Voelkel NF, Cool CD, Eur Respir J Suppl. 2003. 46:28s-32s).

35 En diversos aspectos, la composición farmacéutica para el tratamiento de trastornos respiratorios puede estar compuesta por las siguientes combinaciones de compuestos: moléculas de ARNbc de DDIT4 químicamente modificadas descritas en este documento combinadas con un compuesto de ARNip que se dirige a uno o más de los siguientes genes: elastinas, metaloproteasas de matriz, fosfolipasas, caspasas, esfingomielinasa y ceramida sintasa.

40 El síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), también conocido como síndrome de dificultad respiratoria (RDS) o síndrome de dificultad respiratoria del adulto (en contraste con el síndrome de dificultad respiratoria infantil, IRDS) es una reacción grave a diversas formas de lesiones pulmonares. Este es el trastorno más importante que resulta en un aumento del edema pulmonar de permeabilidad.

45 El ARDS es una enfermedad pulmonar grave causada por una variedad de agresiones directas e indirectas. Se caracteriza por la inflamación del parénquima pulmonar que conduce a una alteración del intercambio de gases con la liberación sistémica concomitante de mediadores inflamatorios que provocan inflamación, hipoxemia y, con frecuencia, dan como resultado el fallo de múltiples órganos. Esta condición es potencialmente mortal y, a menudo, letal, por lo general requiere ventilación mecánica e ingreso en una unidad de cuidados intensivos. Una forma menos grave se llama lesión pulmonar aguda (ALI).

50 Enfermedades y trastornos renales: Las moléculas de ARNbc descritas en este documento son útiles para tratar o prevenir diversas enfermedades y trastornos que afectan al riñón como se describe a continuación en este documento. Insuficiencia renal aguda (ARF)

En diversos aspectos, las moléculas de ARNbc descritas en este documento se usan para tratar trastornos renales, en particular insuficiencia renal aguda (ARF) debida a isquemia en pacientes posquirúrgicos, en pacientes con trasplante de riñón e insuficiencia renal aguda debida a un tratamiento de quimioterapia tal como administración de cisplatino o insuficiencia renal aguda asociada a sepsis.

55 La ARF puede estar causada por una enfermedad microvascular o macrovascular (oclusión importante de la arteria renal o enfermedad aórtica abdominal grave). Las enfermedades microvasculares clásicas a menudo se presentan con

hemólisis microangiopática e insuficiencia renal aguda debido a trombosis u oclusión de los capilares glomerulares, a menudo con trombocitopenia acompañante. Los ejemplos típicos de estas enfermedades incluyen:

a) Púrpura trombocitopénica trombótica: la pentada clásica en la púrpura trombocitopénica trombótica incluye fiebre, cambios neurológicos, insuficiencia renal, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia.

5 b) Síndrome urémico hemolítico: el síndrome urémico hemolítico es similar a la púrpura trombocitopénica trombótica, pero no se presenta con cambios neurológicos.

c) Síndrome de HELLP (hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y plaquetas bajas). El síndrome HELLP es un tipo de síndrome urémico hemolítico que se presenta en mujeres embarazadas con la adición de elevaciones de transaminasas.

10 La insuficiencia renal aguda se puede presentar en todos los entornos médicos, pero se adquiere predominantemente en hospitales. La afección se desarrolla en el 5 por ciento de los pacientes hospitalizados y aproximadamente el 0.5 por ciento de los pacientes hospitalizados requieren diálisis. Durante los últimos 40 años, la tasa de supervivencia de la insuficiencia renal aguda no ha mejorado, principalmente porque los pacientes afectados ahora son mayores y tienen más enfermedades concomitantes. La infección representa el 75 por ciento de las muertes en pacientes con insuficiencia renal aguda y las complicaciones cardiorrespiratorias son la segunda causa más común de muerte. Dependiendo de la 15 gravedad de la insuficiencia renal, la tasa de mortalidad puede oscilar entre el 7 por ciento y el 80 por ciento. La insuficiencia renal aguda se puede dividir en tres categorías: ARF prerrenal, intrínseca y postrenal. La ARF intrínseca se subdivide en cuatro categorías: enfermedad tubular, enfermedad glomerular, enfermedad vascular (incluye microvascular) y enfermedad intersticial.

20 Un uso preferido de las moléculas de ácido nucleico bicatenario descrito en este documento es para la prevención de insuficiencia renal aguda en pacientes de alto riesgo sometidos a cirugía cardíaca mayor o cirugía vascular. Los pacientes con alto riesgo de desarrollar insuficiencia renal aguda se pueden identificar usando diversos métodos de puntuación, tales como el algoritmo de la Clínica Cleveland o el desarrollado por US Academic Hospitals (QMMI) y la Veterans' Administration (CICSS).

Composiciones farmacéuticas

25 Se proporcionan composiciones y métodos para la regulación a la baja de la expresión de DDIT4 mediante el uso de pequeñas moléculas de ácido nucleico, tales como ácido nucleico de interferencia corto (ANip), ARN de interferencia (ARNi), ARN de interferencia corto (ARNip), ARN bicatenarios (ARNbc), microARN (miARN) y moléculas de ARN corto de la horquilla (ARNhp) capaces de mediar la regulación a la baja de la expresión del gen DDIT4 o que median la interferencia del ARN contra la expresión del gen DDIT4.

30 Aunque puede ser posible que las moléculas descritas en este documento se administren como producto químico en bruto, es preferible presentarlas como una composición farmacéutica. De acuerdo con lo anterior, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una o más de las moléculas de ARNbc descritas en este documento; y un portador farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede comprender una mezcla de dos o más compuestos de ácido nucleico diferentes.

35 Las composiciones, métodos y kits proporcionados en este documento pueden incluir una o más moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ARNbc) y métodos que, de forma independiente o en combinación, modulan (por ejemplo, regulan negativamente) la expresión de la proteína DDIT4 y/o genes que codifican la proteína DDIT4., proteínas y/o genes asociados con el mantenimiento y/o desarrollo de enfermedades, afecciones o trastornos asociados con la expresión de DDIT4.

40 La descripción de los diversos aspectos se proporciona con referencia a DDIT4. Sin embargo, los diversos aspectos también están dirigidos a otras variantes de transcripción de DDIT4 relacionadas y polimorfismos (por ejemplo, polimorfismo de un solo nucleótido, (SNP)) asociados con los genes DDIT4.

45 Sustancialmente complementario se refiere a una complementariedad de más de aproximadamente 84 % con otra secuencia. Por ejemplo, en una región dúplex que consiste en 19 pares de bases, un desapareamiento da como resultado una complementariedad del 94.7 %, dos desapareamientos da como resultado aproximadamente un 89.5 % de complementariedad y 3 desapareamientos dan como resultado aproximadamente un 84.2 % de complementariedad, lo que hace que la región dúplex sustancialmente complementaria. De acuerdo con lo anterior, sustancialmente idéntico se refiere a una identidad de más de aproximadamente 84 % con otra secuencia.

50 Además, se proporciona un método de inhibición de la expresión de DDIT4 en al menos un 20 %, en al menos un 30 % en al menos un 40 %, preferiblemente en un 50 %, 60 % o 70 %, más preferiblemente en un 75 %, 80 % o 90 % en comparación con un control que comprende poner en contacto una transcripción de ARNm (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) con una o más de las moléculas de ARNbc descritas en este documento.

En un aspecto, las moléculas, composiciones y métodos descritos en este documento inhiben/regulan negativamente el gen DDIT4, por lo que la inhibición/regulación a la baja se selecciona del grupo que comprende inhibición/regulación a la

baja de la función génica, inhibición/regulación a la baja del polipéptido e inhibición/regulación a la baja de la expresión de ARNm.

En un aspecto, los compuestos de ácido nucleico, las composiciones y los métodos proporcionados en este documento inhiben la expresión del polipéptido DDIT4, por lo que la inhibición se selecciona del grupo que comprende la inhibición de la función (que puede examinarse mediante un ensayo enzimático o un ensayo de unión con un interaccionador conocido del gen/polipéptido nativo, entre otros), regulación a la baja de la proteína o inhibición de la proteína (que se puede examinar mediante transferencia Western, ELISA o inmunoprecipitación, entre otros) e inhibición de la expresión del ARNm (que se puede examinar mediante transferencia Northern, RT-PCR cuantitativa, hibridación in situ o hibridación de micromatrices, entre otros).

5 En un aspecto, las composiciones y métodos proporcionados en este documento incluyen una molécula de ácido nucleico que tiene actividad de ARNi contra el ARNm de DDIT4, donde la molécula de ácido nucleico incluye una secuencia complementaria a un ARN que tiene una secuencia que codifica DDIT4, tal como la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico puede tener actividad de ARNi contra el ARN de DDIT4, donde la molécula de ácido nucleico incluye una secuencia complementaria a un ARN que tiene una secuencia codificante de DDIT4 variante, por ejemplo, un gen de DDIT4 mutante que no se muestra en la SEQ ID NO: 1 pero conocido en la técnica por estar asociado con el inicio y/o mantenimiento y/o desarrollo de neurodegeneración y/u otras enfermedades y trastornos, por ejemplo, un SNP.

10 En un aspecto, las composiciones y métodos proporcionados en este documento incluyen una molécula de ácido nucleico que tiene actividad de ARNi contra el ARNm de DDIT4, donde la molécula de ácido nucleico incluye una secuencia complementaria a un ARN que tiene una secuencia que codifica DDIT4, tal como la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico puede tener actividad de ARNi contra el ARN de DDIT4, donde la molécula de ácido nucleico incluye una secuencia complementaria a un ARN que tiene una secuencia codificante de DDIT4 variante, por ejemplo, un gen de DDIT4 mutante que no se muestra en la SEQ ID NO: 1 pero conocido en la técnica por estar asociado con el inicio y/o mantenimiento y/o desarrollo de neurodegeneración y/u otras enfermedades y trastornos, por ejemplo, un SNP.

15 En un aspecto, las composiciones y métodos proporcionados en este documento incluyen una molécula de ácido nucleico que tiene actividad de ARNi contra el ARNm de DDIT4, donde la molécula de ácido nucleico incluye una secuencia complementaria a un ARN que tiene una secuencia que codifica DDIT4, tal como la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, una molécula de ácido nucleico puede tener actividad de ARNi contra el ARN de DDIT4, donde la molécula de ácido nucleico incluye una secuencia complementaria a un ARN que tiene una secuencia codificante de DDIT4 variante, por ejemplo, un gen de DDIT4 mutante que no se muestra en la SEQ ID NO: 1 pero conocido en la técnica por estar asociado con el inicio y/o mantenimiento y/o desarrollo de neurodegeneración y/u otras enfermedades y trastornos, por ejemplo, un SNP.

Administración y formulaciones

20 Las moléculas de ARNbc de DDIT4 descritas en este documento se pueden administrar al oído mediante la aplicación directa de una composición farmacéutica al oído externo; por inyección transtimpánica o por gotas para los oídos. En algunos aspectos, la composición farmacéutica se aplica al canal auditivo. La administración al oído también puede denominarse administración por vía ótica u ótica que comprende ARNip; un potenciador de la penetración y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 Las moléculas de ácido nucleico se pueden administrar al tejido diana mediante la aplicación directa de las moléculas desnudas preparadas con un portador o un diluyente.

Los términos "ácido nucleico desnudo" o "ARNbc desnudo" o "ARNip desnudo" se refieren a moléculas de ácido nucleico que están libres de cualquier vehículo de administración que actúe para ayudar, promover o facilitar la entrada en la célula, incluidas las secuencias virales, partículas virales, formulaciones de liposomas, lipofectina o agentes precipitantes y similares. Por ejemplo, ARNbc en PBS es "ARNbc desnudo".

30 Las moléculas de ácido nucleico descritas en este documento se pueden suministrar o administrar directamente con un portador o diluyente que actúa para ayudar, promover o facilitar la entrada a la célula, incluidos vectores virales, partículas virales, formulaciones de liposomas, lipofectina o agentes precipitantes y similares.

35 Una molécula de ácido nucleico puede incluir un vehículo de administración, incluidos liposomas, para la administración a un sujeto, portadores y diluyentes y sus sales, y/o puede estar presente en formulaciones farmacéuticamente aceptables. En algunos aspectos, las moléculas de ARNbc descritas en este documento se administran en formulaciones de liposomas y formulaciones de lipofectina y similares y se pueden preparar mediante métodos bien conocidos para los expertos en la técnica. Tales métodos se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,593,972, 5,589,466, y 5,580,859.

40 Se han desarrollado sistemas de administración dirigidos específicamente a la administración potenciada y mejorada de ARNip en células de mamíferos (véase, por ejemplo, Shen et al., FEBS Let. 2003, 539:111-114; Xia et al., Nat. Biotech. 2002, 20:1006-1010; Reich et al., Mol. Vision 2003, 9: 210-216; Sorensen et al., J. Mol. Biol. 2003. 327: 761-766; Lewis et al., Nat. Gen. 2002, 32: 107-108 y Simeoni et al., NAR 2003, 31,11: 2717-2724). El ARNip se ha usado recientemente con éxito para la inhibición de la expresión génica en primates (véase, por ejemplo, Tolentino et al., Retina 24(4):660).

45 El suministro de moléculas de ARN desnudas o formuladas al oído, opcionalmente al oído interno, se logra, entre otras cosas, mediante inyección transtimpánica o mediante la administración del compuesto deseado formulado como una gota para los oídos. Las composiciones óticas que comprenden ARNbc se describen en la Publicación de los Estados Unidos No. 20110142917, al cesionario de la presente solicitud.

50 Los polipéptidos que facilitan la introducción de ácido nucleico en un sujeto deseado son conocidos en la técnica, por ejemplo como los descritos en la Solicitud de la Publicación de los Estados Unidos No. 20070155658 (por ejemplo, un derivado de melamina tal como 2,4,6-TriguanidinoTraizina y 2,4,6-Tramidosarcocil Melamina, un polipéptido de poliarginina y un polipéptido que incluye residuos alternos de glutamina y asparagina).

55 Los portadores, disolventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables, así como los portadores de implantes, generalmente se refieren a cargas, diluyentes o material encapsulante sólido o líquido inertes, no tóxicos que no reaccionan con los ingredientes activos descritos en este documento e incluyen liposomas y microesferas. Ejemplos de sistemas de administración útiles para administrar las moléculas de ARNbc de DDIT4 descritas en este documento incluyen las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,225,182; 5,169,383; 5,167,616; 4,959,217;

4,925,678; 4,487,603; 4,486,194; 4,447,233; 4,447,224; 4,439,196; y 4,475,196. Muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos de este tipo son bien conocidos para los expertos en la técnica.

En un aspecto particular, la administración comprende la administración transtimpánica. En otro aspecto, la administración comprende la administración tópica o local. Los compuestos se administran como gotas para los oídos, crema para los oídos, ungüento para los oídos, espuma, espuma o cualquiera de los anteriores en combinación con un dispositivo de administración. También son útiles los implantes de los compuestos. Las formas líquidas se preparan como gotas. Las composiciones líquidas incluyen soluciones acuosas, con y sin codisolventes orgánicos, suspensiones acuosas o aceitosas, emulsiones con aceites comestibles, así como vehículos farmacéuticos similares. Estas composiciones también se pueden inyectar transtimpánicamente. Las gotas para los oídos también pueden denominarse gotas óticas o gotas por vía ótica. En un aspecto preferido, las gotas para los oídos permanecen en el canal auditivo durante aproximadamente 30 minutos con el fin de evitar la fuga de las gotas fuera del canal. De este modo, es preferible que el sujeto que recibe las gotas mantenga la cabeza de costado con la oreja tratada mirando hacia arriba para evitar la fuga de la gota fuera del canal.

Los métodos para el suministro de moléculas de ácido nucleico se describen en Akhtar et al., *Trends Cell Bio.*, 2: 139 (1992); *Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics*, ed. Akhtar, (1995), Maurer et al., *Mol. Membr. Biol.*, 16: 129-140 (1999); Hofland and Huang, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 137: 165-192 (1999); y Lee et al., *ACS Symp. Ser.*, 752: 184-192 (2000); las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,395,713; 6,235,310; 5,225,182; 5,169,383; 5,167,616; 4,959217; 4,925,678; 4,487,603; y 4,486,194 y Sullivan et al., PCT WO 94/02595; PCT WO 00/03683 y PCT WO 02/08754; y la Publicación de la Patente de los Estados Unidos No. 2003077829. Estos protocolos se pueden usar

para el suministro de prácticamente cualquier molécula de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico se pueden administrar a las células mediante una variedad de métodos conocidos para los expertos en la técnica, que incluyen, entre otros, la encapsulación en liposomas, por ionoforesis o por incorporación en otros vehículos, tales como polímeros biodegradables, hidrogeles, ciclodextrinas (véase, por ejemplo, Gonzalez et al., *Bioconjugate Chem.*, 10: 1068-1074 (1999); Wang et al., Publicación Internacional PCT Nos. WO 03/47518 y WO 03/46185), ácido poli (láctico-coglicólico) (PLGA) y microesferas PLCA (véanse, por ejemplo la Patente de los Estados Unidos No. 6,447,796 y la Publicación de la Solicitud de los Estados Unidos No. 2002130430), nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas, o por vectores proteicos (O'Hare and Normand, Publicación Internacional PCT No. WO 00/53722). Alternativamente, la combinación de ácido nucleico/vehículo se administra localmente mediante inyección directa o mediante el uso de una bomba de infusión. La inyección directa de las moléculas de ácido nucleico descritas en este documento, ya sea

intravítreo, subcutánea, transtimpánica, intramuscular o intradérmica, puede tener lugar usando metodologías estándar de aguja y jeringa, o mediante tecnologías sin aguja tales como las descritas en Conry et al., *Clin. Cancer Res.*, 5: 2330-2337 (1999) y Barry et al., Publicación Internacional PCT No. WO 99/31262. Las moléculas de ARNbc de DDIT4 descritas en este documento se pueden usar como agentes farmacéuticos. Los agentes farmacéuticos previenen, modulan la aparición o tratan o alivian un síntoma hasta cierto punto (preferiblemente todos los síntomas) de un estado de enfermedad en un sujeto. En un aspecto específico, se pueden seleccionar formulaciones tópicas y transdérmicas.

Las moléculas de ARNbc o las composiciones farmacéuticas descritas en este documento se administran y dosifican de acuerdo con las buenas prácticas médicas, teniendo en cuenta el estado clínico del sujeto individual, la enfermedad que se va a tratar, el sitio y método de administración, la programación de la administración, edad del paciente, sexo, peso corporal y otros factores conocidos por los médicos.

En otro aspecto, la administración comprende la administración tópica o local tal como mediante gotas para los ojos, gotas para los oídos o ungüento.

Las moléculas de ácido nucleico pueden complejarse con lípidos catiónicos, empaquetarse dentro de liposomas o administrarse de otro modo a células o tejidos diana. El ácido nucleico o los complejos de ácido nucleico se pueden administrar localmente a tejidos relevantes ex vivo o in vivo mediante aplicación dérmica directa, aplicación transdérmica o inyección, con o sin su incorporación en biopolímeros.

Los sistemas de administración pueden incluir liposomas de superficie modificada que contienen lípidos de poli (etilenglicol) (liposomas modificados con PEG o de larga circulación o liposomas furtivos). Estas formulaciones ofrecen un método para aumentar la acumulación de fármacos en los tejidos diana. Esta clase de portadores de fármacos resiste la opsonización y eliminación por parte del sistema fagocítico mononuclear (MPS o RES), lo que permite tiempos de circulación sanguínea más prolongados y una mayor exposición del tejido para el fármaco encapsulado (Lasic et al. *Chem. Rev.* 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata et al., *Chem. Pharm. Bull.* 1995, 43, 1005-1011).

Las moléculas de ácido nucleico se pueden formular o complejar con polietilenimina (por ejemplo, PEI lineal o ramificada) y/o derivados de polietilenimina, incluyendo por ejemplo polietilenimina-polietilenglicol-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-GAL) o derivados de polietilenimina-polietilenglicol-tri-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-triGAL), PEI injertados tales como

galactosa PEI, colesterol PEI, PEI derivatizado con anticuerpos y derivados de polietilenglicol PEI (PEG-PEI) de los mismos (véase, por ejemplo, Ogris et al., 2001, *AAPA PharmSci*, 3, 1-11; Furgeson et al., 2003, *Bioconjugate Chem.*, 14, 840-847; Kunath et al., 2002, *Pharmaceutical Research*, 19, 810-817; Choi et al., 2001, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 22, 46-52; Bettinger et al., 1999, *Bioconjugate Chem.*, 10, 558-561; Peterson et al., 2002, *Bioconjugate Chem.*, 13, 845-854; Erbacher et al., 1999, *Journal of Gene Medicine Preprint*, 1, 1-18; Godbey et al., 1999., *PNAS USA*, 96, 5177-5181; Godbey et al., 1999, *Journal of Controlled Release*, 60, 149-160; Diebold et al., 1999, *Journal of Biological Chemistry*, 274,

19087-19094; Thomas and Klibanov, 2002, PNAS USA, 99, 14640-14645; Sagara, la Patente de los Estados Unidos No. 6,586,524 y la Publicación de la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos No. 20030077829).

Las moléculas de ácido nucleico pueden formar complejos con agentes disruptores de la membrana tales como los descritos en la Publicación de la Patente de los Estados Unidos Nos. No. 20010007666. El agente o agentes disruptores de la membrana y la molécula de ácido nucleico también se pueden formar complejos con un lípido catiónico o una molécula de lípido auxiliar, tales como los lípidos descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 6,235,310.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en este documento se pueden administrar al sistema nervioso central (CNS) o al sistema nervioso periférico (PNS). Los experimentos han demostrado la captación eficaz *in vivo* de ácidos nucleicos por las neuronas. Véase, por ejemplo, Sommer et al., 1998, Antisentido Nuc. Acid Drug Dev., 8, 75; Epa et al., 2000, Antisentido Nuc. Acid Drug Dev., 10, 469; Broaddus et al., 1998, J. Neurosurg., 88(4), 734; Karle et al., 1997, Eur. J. Pharmacol., 340(2/3), 153; Bannai et al., 1998, Brain Research, 784(1,2), 304; Rajakumar et al., 1997, Synapse, 26(3), 199; Wu-pong et al., 1999, BioPharm, 12(1), 32; Bannai et al., 1998, Brain Res. Protoc., 3(1), 83; y Simantov et al., 1996, Neuroscience, 74(1), 39. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico son susceptibles de ser suministradas y captadas por células en el CNS y/o SNP, por ejemplo, neuronas, macrófagos, axones de materia blanca y células endoteliales.

Los sistemas de administración pueden incluir, por ejemplo, geles acuosos y no acuosos, cremas, emulsiones múltiples, microemulsiones, liposomas, ungüentos, soluciones acuosas y no acuosas, lociones, aerosoles, bases y polvos de hidrocarburos, y pueden contener excipientes tales como solubilizantes, potenciadores de la permeación (por ejemplo, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos y aminoácidos) y polímeros hidrofílicos (por ejemplo, policarbofilo y polivinilpirrolidona). En un aspecto, el portador farmacéuticamente aceptable es un liposoma o un potenciador transdérmico. Los ejemplos no limitantes de liposomas que se pueden usar con las moléculas DDIT4 incluyen los siguientes: (1) CellFectin, formulación de liposomas 1:1.5 (M/M) del lípido catiónico N,N,N,N-tetrametil-N,N,N,N-tetrapalmito-spermina y dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE) (GIBCO BRL); (2) Citolectina GSV, formulación de liposomas 2: 1 (M/M) de un lípido catiónico y DOPE (Glen Research); (3) DOTAP (N-[1-(2,3-dioleoloxi)-N,N,N-tri-metil-amoniometilsulfato) (Boehringer Manheim); y (4) Lipofectamina, formulación de liposomas 3: 1 (M/M) del lípido policationíco DOSPA, el lípido neutro DOPE (GIBCO BRL) y el aminoácido Di-alquilado (DiLA2).

Los sistemas de administración pueden incluir parches, comprimidos, supositorios, pesarios, geles, soluciones acuosas y no acuosas, lociones y cremas, y pueden contener excipientes tales como solubilizantes y potenciadores (por ejemplo, propilenenglicol, sales biliares y aminoácidos), y otros vehículos (por ejemplo, polietilenenglicol, glicerol, ésteres de ácidos grasos y derivados, y polímeros hidrofílicos tales como hidroxipropilmetilcelulosa y ácido hialurónico).

Las moléculas de ácido nucleico pueden incluir un bioconjuguado, por ejemplo, un conjugado de ácido nucleico como se describe en Vargeese et al., U.S. Ser. No. 10/427,160; la Patente de los Estados Unidos No. 6,528,631; la Patente de los Estados Unidos No. 6,335,434; la Patente de los Estados Unidos No. 6,235,886; la Patente de los Estados Unidos No. 6,153,737; la Patente de los Estados Unidos No. 5,214,136; la Patente de los Estados Unidos No. 5,138,045.

Las composiciones, métodos y kits descritos en este documento pueden incluir un vector de expresión que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una molécula de ácido nucleico descrita en este documento de una manera que permite la expresión de la molécula de ácido nucleico. Los métodos para introducir moléculas de ácido nucleico o uno o más vectores capaces de expresar las hebras de ARNbc en el entorno de la célula dependerán del tipo de célula y de la composición de su entorno. La molécula de ácido nucleico o la construcción de vector se puede introducir directamente en la célula (esto es, intracelularmente); o introducido extracelularmente en una cavidad, espacio intersticial, en la circulación de un organismo, introducido oralmente, o se puede introducir bañando un organismo o una célula en una solución que contiene ARNbc. La célula es preferiblemente una célula de mamífero; más preferiblemente una célula humana. La molécula de ácido nucleico del vector de expresión puede incluir una región sentido y una región antisentido. La región antisentido puede incluir una secuencia complementaria a una secuencia de ARN o ADN que codifica DDIT4, y la región sentido puede incluir una secuencia complementaria a la región antisentido. La molécula de ácido nucleico puede incluir dos hebras distintas que tienen regiones complementarias sentido y antisentido. La molécula de ácido nucleico puede incluir una sola hebra que tiene regiones complementarias sentido y antisentido.

Las moléculas de ácido nucleico que interactúan con moléculas de ARN diana y regulan negativamente el gen que codifica moléculas de ARN diana (por ejemplo, ARNm de DDIT4, SEQ ID NO: 1) se pueden expresarse a partir de unidades de transcripción insertadas en vectores de ADN o ARN. Los vectores recombinantes pueden ser plásmidos de ADN o vectores virales. La molécula de ácido nucleico que expresa vectores virales se puede construir en base a, pero sin limitarse a, virus adenoasociados, retrovirus, adenovirus o alfavírus. Los vectores recombinantes capaces de expresar las moléculas de ácido nucleico se pueden administrar como se describe en este documento y persisten en las células diana. Alternativamente, se pueden usar vectores virales que proporcionen la expresión transitoria de moléculas de ácido nucleico. Tales vectores se pueden administrar repetidamente según sea necesario. Una vez expresadas, las moléculas de ácido nucleico se unen y regulan negativamente la función o expresión génica, por ejemplo, a través de la interferencia de ARN (ARNi). La administración de vectores que expresan moléculas de ácido nucleico puede ser sistémica, tal como por administración intravenosa o intramuscular, por administración local, por administración a células diana explantadas de un sujeto seguido de reintroducción en el sujeto, o por cualquier otro medio que permita introducción en la célula diana deseada.

5 Los vectores de expresión pueden incluir una secuencia de ácido nucleico que codifique al menos una molécula de ácido nucleico descrita en este documento, de una manera que permita la expresión de la molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, el vector puede contener secuencia (s) que codifica (n) ambas hebras de una molécula de ácido nucleico que incluyen un dúplex. El vector también puede contener secuencia (s) que codifica (n) una única molécula de ácido nucleico que es autocomplementaria y, de este modo, forma una molécula de ácido nucleico. Se describen ejemplos no limitantes de tales vectores de expresión en Paul et al., 2002, *Nature Biotechnology*, 19, 505; Miyagishi y Taira, 2002, *Nature Biotechnology*, 19, 497; Lee et al., 2002, *Nature Biotechnology*, 19, 500. Los vectores de expresión también se pueden incluir en una célula de mamífero (por ejemplo, humana).

10 10 Un vector de expresión puede codificar una o ambas hebras de un dúplex de ácido nucleico, o una única hebra autocomplementaria que se autohibrida en un dúplex de ácido nucleico. Las secuencias de ácido nucleico que codifican moléculas de ácido nucleico se pueden unir operativamente de una manera que permita la expresión de la molécula de ácido nucleico (véase, por ejemplo, Paul et al., 2002, *Nature Biotechnology*, 19, 505; Miyagishi and Taira, 2002, *Nature Biotechnology*, 19, 497; Lee et al., 2002, *Nature Biotechnology*, 19, 500).

15 15 Un vector de expresión puede incluir uno o más de los siguientes: a) una región de iniciación de la transcripción (por ejemplo, región de iniciación eucariótica pol I, II o III); b) una región de terminación de la transcripción (por ejemplo, región de terminación eucariota pol I, II o III); c) un intrón y d) una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una de las moléculas de ácido nucleico, en la que dicha secuencia está unida operativamente a la región de inicio y a la región de terminación de una manera que permite la expresión y/o suministro de la molécula de ácido nucleico. El vector puede incluir opcionalmente un marco de lectura abierto (ORF) para una proteína unida operativamente en el lado 5' o en el lado 20 20 3' de la secuencia que codifica la molécula de ácido nucleico; y/o un intrón (secuencias intermedias).

Una construcción viral empaquetada en una partícula viral lograría tanto la introducción eficiente de una construcción de expresión en la célula como la transcripción de la construcción de ARNbc codificada por la construcción de expresión.

25 25 Los métodos para la introducción oral incluyen la mezcla directa de un ARNbc con el alimento del organismo, así como enfoques de ingeniería en los que una especie que se usa como alimento se modifica para expresar un ARN y luego se alimenta al organismo que se va a afectar. Se pueden emplear métodos físicos para introducir una solución de molécula de ácido nucleico en la célula. Los métodos físicos para introducir ácidos nucleicos incluyen la inyección de una solución que contiene la molécula de ácido nucleico, el bombardeo por partículas cubiertas por la molécula de ácido nucleico, remojar la célula u organismo en una solución del ARNbc, o la electroporación de las membranas celulares en presencia de la molécula de ácido nucleico. En un aspecto, se proporciona en este documento una célula que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en este documento.

30 30 Se pueden usar otros métodos conocidos en la técnica para introducir ácidos nucleicos en las células, tales como transporte mediado químico, tal como fosfato cálcico, y similares. De este modo, las moléculas de ácido nucleico se pueden introducir junto con componentes que realizan una o más de las siguientes actividades: potenciar la captación de ARN por la célula, promover la hibridación de las hebras dúplex, estabilizar las hebras hibridadas o, de otro modo, aumentar la inhibición/regulación a la baja de DDT4.

35 35 Las nanocápsulas o microcápsulas poliméricas facilitan el transporte y la liberación del ARNbc encapsulado o unido a la célula. Incluyen materiales poliméricos y monoméricos, especialmente polibutilcianoacrilato. Se ha publicado un resumen de materiales y métodos de fabricación (véase Kreuter, 1991). Los materiales poliméricos que se forman a partir de precursores monoméricos y/u oligoméricos en la etapa de polimerización/generación de nanopartículas se conocen por 40 40 40 se del estado de la técnica, al igual que los pesos moleculares y la distribución del peso molecular del material polimérico que un experto en la materia de fabricación de nanopartículas se puede seleccionar adecuadamente de acuerdo con la habilidad habitual.

45 45 Las moléculas de ácido nucleico se pueden formular como una microemulsión. Una microemulsión es un sistema de agua, aceite y anfífilo que es una única solución líquida ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable. Por lo general, las microemulsiones se preparan dispersando primero un aceite en una solución acuosa de surfactante y luego agregando una cantidad suficiente de un cuarto componente, generalmente un alcohol de longitud de cadena intermedia para formar un sistema transparente.

50 50 50 Los surfactantes que se pueden usar en la preparación de microemulsiones incluyen, pero no se limitan a, surfactantes iónicos, surfactantes no iónicos, Brij 96, éteres de polioxietilen oleilo, ésteres de ácidos grasos de poliglicerol, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (MO310), monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (MO750), sequioleato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol (DA0750), solo o en combinación con cosurfactantes. El cosurfactante, generalmente un alcohol de cadena corta tal como etanol, 1-propanol y 1-butanol, sirve para aumentar la fluidez interfacial al penetrar en la película de surfactante y, en consecuencia, crear una película desordenada debido al espacio vacío generado entre las moléculas de surfactante.

55 55 55 Las formulaciones de administración pueden incluir polímeros reticulados degradables solubles en agua que incluyen una o más unidades estructurales lipídicos reticulantes degradables, una o más unidades estructurales PEI y/o uno o más mPEG (derivado de éter metílico de PEG (metoxipoli (etilenglicol).

Dosificaciones

La dosificación útil que se va a administrar y el modo particular de administración variarán dependiendo de factores tales como el tipo de célula, o para uso *in vivo*, la edad, el peso y el animal particular y la región del mismo que se va a tratar, el ácido nucleico particular y método de administración usados, el uso terapéutico o diagnóstico contemplado, y la forma 5 de la formulación, por ejemplo, suspensión, emulsión, micela o liposoma, como será fácilmente evidente para los expertos en la técnica. Por lo general, la dosificación se administra a niveles más bajos y se aumenta hasta que se logra el efecto deseado.

La "dosis terapéuticamente eficaz" para los fines en este documento se determina de este modo mediante consideraciones 10 conocidas en la técnica. La dosis debe ser eficaz para lograr una mejora, que incluy, pero no se limita a, una mejor tasa de supervivencia o una recuperación más rápida, o una mejora o eliminación de los síntomas y otros indicadores que se seleccionen como medidas apropiadas para los expertos en la técnica.

Se pueden introducir cantidades apropiadas de moléculas de ácido nucleico y estas cantidades se pueden determinar empíricamente usando métodos estándar. Las concentraciones efectivas de especies de moléculas de ácido nucleico individuales en el entorno de una célula pueden ser de aproximadamente 1 femtomolar, aproximadamente 50 femtomolar, 15 100 femtomolar, 1 picomolar, 1.5 picomolar, 2.5 picomolar, 5 picomolar, 10 picomolar, 25 picomolar, 50 picomolar, 100 picomolar, 500 picomolar, 1 nanomolar, 2.5 nanomolar, 5 nanomolar, 10 nanomolar, 25 nanomolar, 50 nanomolar, 100 nanomolar, 500 nanomolar, 1 micromolar, 2.5 micromolar, 5 micromolar, 10 micromolar, 100 micromolar o más.

En general, la dosis activa de compuesto de ácido nucleico para humanos está en el intervalo de 1 ng/kg a 20 aproximadamente 20-100 miligramos por kilogramo (mg/kg) de peso corporal del receptor por día, preferiblemente aproximadamente 0.01 mg hasta aproximadamente 2-10 mg/kg de peso corporal del receptor por día, en un régimen de una sola dosis, una dosis por día o dos o tres o más veces por día durante un período de 1-4 semanas o más. Una unidad 25 de dosificación apropiada de moléculas de ácido nucleico puede estar en el intervalo de 0.001 a 0.25 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor por día, o en el intervalo de 0.01 a 20 microgramos por kilogramo de peso corporal por día, o en el intervalo de 0.01 a 10 microgramos por kilogramo de peso corporal por día, o en el intervalo de 0.10 a 5 microgramos por kilogramo de peso corporal por día, o en el intervalo de 0.1 a 2.5 microgramos por kilogramo de peso corporal por día. La dosificación puede ser desde 0.01 ug a 1 g por kg de peso corporal (por ejemplo, 0.1 ug, 0.25 ug, 0.5 ug, 0.75 ug, 1 ug, 2.5 ug, 5 ug, 10 ug, 25 ug, 50 ug, 100 ug, 250 ug, 500 ug, 1 mg, 2.5 mg, 5 mg, 10 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg, 250 mg, o 500 mg por kg de peso corporal).

Los niveles de dosificación del orden desde aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 140 mg por kilogramo de peso 30 corporal por día son útiles en el tratamiento de las afecciones indicadas anteriormente (aproximadamente 0.5 mg a aproximadamente 7 g por sujeto al día). La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los materiales portadores para producir una única forma de dosificación varía según el huésped tratado y el modo particular de administración. Las formas unitarias de dosificación contienen generalmente entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 500 mg de un ingrediente activo.

35 Se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto en particular depende de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el momento de administración, la vía de administración, y la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que se somete a terapia.

40 Las composiciones farmacéuticas que incluyen la molécula de ácido nucleico descrita en este documento se pueden administrar una vez al día (QD), dos veces al día (bid), tres veces al día (tid), cuatro veces al día (qid) o en cualquier intervalo y por cualquier duración que sea médicaamente apropiada. Sin embargo, el agente terapéutico también puede dosificarse en unidades de dosificación que contengan dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas a 45 intervalos apropiados a lo largo del día. En ese caso, las moléculas de ácido nucleico contenidas en cada subdosis pueden ser correspondientemente más pequeñas para alcanzar la unidad de dosificación diaria total. La unidad de dosificación también se puede combinar para una sola dosis durante varios días, por ejemplo, usando una formulación de liberación sostenida convencional que proporciona una liberación sostenida y consistente del ARNbc durante un período de varios días. Las formulaciones de liberación sostenida son bien conocidas en la técnica. La unidad de dosificación puede contener un múltiplo correspondiente de la dosis diaria. La composición se puede combinar de tal manera que la suma de las múltiples unidades de un ácido nucleico contenga una dosis suficiente.

50 Composiciones, kits y envases farmacéuticos

También se proporcionan composiciones, kits, envases y formulaciones que incluyen una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARNbc) como se proporciona en este documento para regular negativamente la expresión de DDIT4 para administrar o distribuir la molécula de ácido nucleico a un paciente. Un kit puede incluir al menos un envase y al menos una etiqueta. Los envases apropiados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los envases se pueden formar a partir de una variedad de materiales tales como vidrio, metal o plástico. El envase puede incluir secuencia (s) de ácido nucleico y cualquier otro componente necesario para fines relevantes de laboratorio, pronóstico, diagnóstico, profilácticos y terapéuticos. Se pueden incluir indicaciones y/o instrucciones para tales usos en o con dicho envase, al igual que los reactivos y otras composiciones o herramientas usadas para estos fines.

El envase puede contener alternativamente una composición que sea eficaz para el tratamiento, diagnóstico, pronóstico o profilaxis de una afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición comprende preferiblemente una molécula de ácido nucleico capaz de unirse específicamente al ARNm de DDIT4 y/o regular negativamente la función DDIT4.

Un kit puede incluir además un segundo envase que incluye una solución reguladora farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina regulada con fosfato, solución de Ringer y/o solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluidas otras soluciones reguladoras, diluyentes, filtros, agitadores, agujas, jeringas y/o prospectos con indicaciones y/o instrucciones de uso.

10 La ley federal requiere que el uso de composiciones farmacéuticas en la terapia de seres humanos sea aprobado por una agencia del gobierno federal. En los Estados Unidos, la aplicación es responsabilidad de the Food and Drug Administration, que emite las regulaciones apropiadas para asegurar dicha aprobación, que se detallan en 21 U.S.C. § 301-392. La regulación para el material biológico, incluidos los productos elaborados a partir de tejidos de animales, se proporciona en 42 U.S.C. § 262. La mayoría de los países extranjeros requieren una aprobación similar. Las regulaciones varían de un país a otro, pero los procedimientos individuales son bien conocidos para los expertos en la técnica y las composiciones y métodos proporcionados en este documento cumplen preferiblemente de acuerdo con lo anterior.

20 Como tales, las composiciones, kits y métodos descritos en este documento pueden incluir empaquetar una molécula de ácido nucleico descrita en este documento que incluye una etiqueta o prospecto. La etiqueta puede incluir indicaciones para su uso de las moléculas de ácido nucleico, tales como el uso para el tratamiento o la prevención de enfermedades, trastornos, lesiones y afecciones descritas en este documento. La etiqueta puede incluir indicaciones para su uso de las moléculas de ácido nucleico, como el uso para el tratamiento o la prevención de la atenuación de la degeneración neuronal. La degeneración neuronal incluye, por ejemplo, la degeneración del nervio óptico, nervio auditivo (también conocido como nervio vestibulococlear o nervio acústico); las células ciliadas del oído interno que transmiten información al cerebro a través del nervio auditivo, que consiste en el nervio coclear y el nervio vestibular, y emergen del bulbo raquídeo y entran al cráneo interno a través del meato acústico interno (o meato auditivo interno) en el hueso temporal, junto con el nervio facial. La etiqueta puede incluir indicaciones para su uso de las moléculas de ácido nucleico, tal como el uso para el tratamiento o la prevención de cualquier otra enfermedad o afección que esté relacionada con o responderá a los niveles de DDIT4 en una célula o tejido, solo o en combinación con otras terapias. Una etiqueta puede incluir una indicación para su uso en la reducción y/o regular negativamente la expresión de DDIT4. Un "prospecto" se usa para referirse a las instrucciones que habitualmente se incluyen en los paquetes comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones, otros productos terapéuticos que se combinarán con el producto envasado y/o advertencias sobre el uso de tales productos terapéuticos, etc.

30 Los expertos en la técnica reconocerán que otros tratamientos, fármacos y terapias conocidos en la técnica se pueden combinar fácilmente con las moléculas de ácido nucleico en este documento (por ejemplo, moléculas de dsNA) y, por consiguiente, se contemplan en este documento.

Métodos de tratamiento

40 En otro aspecto, en este documento se proporcionan métodos para el tratamiento de un sujeto que necesita tratamiento para una enfermedad o trastorno asociado con la expresión anormal o aberrante de DDIT4, que comprenden administrar al sujeto una cantidad de una molécula descrita en este documento, que reduce, regula a la baja o inhibe la expresión de DDIT4.

45 En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico se pueden usar para regular negativamente o inhibir la expresión de proteínas DDIT4 y/o DDIT4 que surgen de DDIT4 y/o polimorfismos de haplotipo que están asociados con una enfermedad o afección (por ejemplo, neurodegeneración). El análisis de los genes DDIT4 y/o DDIT4 y/o los niveles de proteína o ARN se pueden usar para identificar sujetos con tales polimorfismos o aquellos sujetos que están en riesgo de desarrollar rasgos, afecciones o enfermedades descritas en este documento. Estos sujetos son susceptibles de tratamiento, por ejemplo, tratamiento con moléculas de ácido nucleico descritas en este documento y cualquier otra composición útil en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la expresión del gen DDIT4 y/o DDIT4. Como tal, el análisis de DDIT4 y/o niveles de proteína o ARN se puede usar para determinar el tipo de tratamiento y el curso de la terapia en el tratamiento de un sujeto. El control de los niveles de proteína o ARN se pueden usar para predecir el resultado del tratamiento y para determinar la eficacia de compuestos y composiciones que modulan el nivel y/o la actividad de ciertos genes y/o proteínas asociados con un rasgo, afección o enfermedad.

50 Se proporciona en este documento un método de inhibición de la expresión de DDIT4 en al menos un 40 %, preferiblemente en un 50 %, 60 % o 70 %, más preferiblemente en un 75 %, 80 % o 90 % en comparación con un control que comprende poner en contacto una transcripción de ARNm de DDIT4 con una o más de las moléculas descritas en este documento.

55 En un aspecto, el compuesto inhibe el polipéptido DDIT4, por lo que la inhibición se selecciona del grupo que comprende la inhibición de la función (que se examina mediante, por ejemplo, un ensayo enzimático o un ensayo de unión con un

interactor conocido del gen nativo/polipéptido, entre otros), inhibición de proteínas (que se examina, por ejemplo, mediante transferencia Western, ELISA o inmunoprecipitación, entre otros) e inhibición de la expresión de ARNm (que se examina, por ejemplo, mediante transferencia Northern, RT-PCR cuantitativa, hibridación in situ o hibridación de micromatrizes, entre otros).

5 En aspectos adicionales, se proporciona un método de tratamiento de a un paciente que padece una enfermedad acompañada por un nivel elevado de un gen DDIT4 de mamífero, comprendiendo el método administrar al paciente una molécula de ARNbc de DDIT4 descrita en este documento en una dosis terapéuticamente eficaz tratando de este modo el paciente.

10 Los métodos, moléculas y composiciones que inhiben un gen o polipéptido de mamífero se analizan en este documento en profundidad, y cualquiera de dichas moléculas y/o composiciones se emplean de manera beneficiosa en el tratamiento de un paciente que padece cualquiera de dichas afecciones. Se debe entender explícitamente que se excluyen los compuestos conocidos. Los nuevos métodos de tratamiento que usan compuestos y composiciones conocidos caen dentro del alcance de la divulgación.

Se proporciona además un procedimiento de preparación de una composición farmacéutica, que comprende:

15 proporcionar una o más moléculas bicatenarias descritas en este documento; y
mezclar dicha molécula con un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto preferido, la molécula usada en la preparación de una composición farmacéutica se mezcla con un portador en una dosis farmacéuticamente eficaz. En un aspecto particular, las moléculas descritas en este documento se pueden conjugar con un esteroide, vitamina o un lípido o con otra molécula adecuada, por ejemplo al colesterol.

20 20 Se proporcionan composiciones y métodos para la inhibición de la expresión de DDIT4 mediante el uso de pequeñas moléculas de ácido nucleico como se proporciona en este documento, tal como ácido nucleico de interferencia corto (ANip), ARN de interferencia (ARNi), ARN de interferencia corto (ARNip), ARN bicatenario (ARNbc), micro-ARN (miARN), ARNmc (ARNi monocatenario) y moléculas de ARN corto de la horquilla (ARNhp) capaces de regular negativamente la expresión del gen DDIT4 o de mediar la interferencia del ARN contra la expresión del gen DDIT4.

25 25 En algunos aspectos, el ARNbc específico para DDIT4 se puede usar junto con otros agentes terapéuticos y/o ARNbc específico para otras dianas moleculares, tales como, sin estar limitado a diversos genes proapoptóticos.

En aspectos preferidos, el sujeto que se está tratando es un animal de sangre caliente y, en particular, mamíferos, incluido el ser humano.

30 30 "Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en la que el objeto es prevenir un trastorno o reducir los síntomas de un trastorno, por ejemplo, una enfermedad o trastorno ocular, un trastorno o deterioro de la audición (o equilibrio deterioro), o para prevenir o reducir la muerte celular o la degeneración neuronal asociada con la expresión de DDIT4. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya experimentan la enfermedad o afección, aquellos propensos a tener la enfermedad o afección y aquellos en los que la enfermedad o afección se debe prevenir. Las moléculas de ARNbc de DDIT4 descritas en este documento se administran antes, durante o después del inicio de la enfermedad o afección.

35 Sin estar ligado a ninguna teoría, la enfermedad o trastorno puede deberse a daño o pérdida de células apoptóticas.

40 40 En algunos aspectos, se prefiere la terapia de combinación. La terapia de combinación se logra mediante la administración de dos o más agentes (esto es, dos o más ARNbc o al menos un ARNbc y al menos otro agente terapéutico) cada uno de los cuales se formula y administra por separado, o mediante la administración de dos o más agentes en una única formulación. Otras combinaciones también están incluidas en la terapia de combinación. Por ejemplo, se pueden formular dos agentes juntos y administrar junto con una formulación separada que contenga un tercer agente. Si bien los dos o más agentes en la terapia de combinación se pueden administrar simultáneamente, no es necesario. Por ejemplo, la administración de un primer agente (o combinación de agentes) puede preceder a la administración de un segundo agente (o combinación de agentes) en minutos, horas, días o semanas. De este modo, los dos o más agentes se pueden administrar con unos minutos de diferencia entre sí o con una o varias horas de diferencia entre sí o con uno o varios días de diferencia entre sí o con varias semanas de diferencia entre sí. En algunos casos, son posibles intervalos incluso más largos. Los dos o más agentes usados en la terapia de combinación pueden estar presentes o no en el cuerpo del paciente al mismo tiempo. La terapia de combinación incluye dos o más administraciones de uno o más de los agentes usados en la combinación. Por ejemplo, si ARNbc1 y ARNbc2 (esto es, en la que ARNbc1 se dirige al gen 1 y ARNbc2 se dirige al gen 2) se usan en una combinación, uno podría administrarlos secuencialmente en cualquier combinación una o más veces, por ejemplo, en el orden ARNbc1-ARNbc2, ARNbc2-ARNbc1, ARNbc1-ARNbc2-ARNbc1, ARNbc2-ARNbc1-ARNbc2, ARNbc1-ARNbc1-ARNbc2, ARNbc1-ARNbc2-ARNbc2 etc.

45 50 Los detalles de ciertas indicaciones en las que los compuestos descritos en este documento son útiles como agentes terapéuticos se describen en este documento.

La invención se ha descrito de manera ilustrativa, y debe entenderse que la terminología usada está destinada a ser de naturaleza descriptiva más que de limitación.

A lo largo de esta solicitud, se hace referencia a diversas publicaciones, incluidas las patentes de los Estados Unidos, por autor y año y las patentes por número.

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

La citación de cualquier documento en este documento no pretende ser una admisión de que tal documento es técnica anterior pertinente, o se considera material para la patentabilidad de cualquier reivindicación de la presente invención. Cualquier declaración sobre el contenido o la fecha de cualquier documento se basa en la información disponible para el solicitante en el momento de la presentación y no constituye una admisión en cuanto a la exactitud de dicha declaración.

10 Ejemplos

Sin elaboración adicional, se cree que un experto en la técnica puede, usando la descripción anterior, usar la presente invención en su máxima extensión. Las siguientes realizaciones y ejemplos específicos preferidos, por lo tanto, se deben interpretar como meramente ilustrativos y no limitativos de la invención reivindicada de ninguna manera.

15 15 Los protocolos estándar de biología molecular conocidos en la técnica que no se describen específicamente en este documento se siguen en general esencialmente como en Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New-York (1989, 1992), y en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1988), y como en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989) y como en Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley & Sons, New York (1988), y como en Watson et al., Recombinant DNA, Scientific American Books, New York y en Birren et al (eds) 20 Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, Vols. 1-4 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998) y la metodología como se expone en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 y 5,272,057. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo como en los protocolos de PCR estándar: A Guide To Methods And Applications, Academic Press, San Diego, CA (1990). La PCR in situ en combinación con la 25 citometría de flujo (FACS) se puede usar para la detección de células que contienen secuencias específicas de ADN y ARNm (Testoni et al., Blood 1996, 87:3822). Los métodos para realizar RT-PCR son bien conocidos en la técnica.

Ejemplo 1: Identificación de hebras sentido y hebras antisentido de DDIT4

Las tablas 1 y 2 a continuación muestran las hebras sentido preferidas y las hebras antisentido correspondientes útiles para generar moléculas de ARNb.

30

Tabla 1

Nombre ARNb	SEQ ID NO	Hebra sentido (5'>3')	SEQ ID NO	Hebra antisentido (5'>3')	longitud
DDIT4_41	3	CCCUCAGUACUGUAGCAU	12	AUGCUACAGUACUGAGGG	18
DDIT4_43	4	GGCAGCUAUUUACAGAC	13	GUCUGUAAGAUAGCUGCC	18
DDIT4_46	5	AGAGCUCGGACUGCGAGU	14	ACUCGCAGUCCGAGCUCU	18
DDIT4_55	6	GGGUCUCCAUCUAGAAC	15	GUUCUAGAUGGAAGACCC	18
DDIT4_59	7	GGUGGAGACUAGAGGCAG	16	CUGCCUCUAGUCUCCACC	18
DDIT4_60	8	CCUCCAAGACAGAGACGA	17	UCGUCUCUGUCUUGGAGG	18
DDIT4_61	9	GGAAGCUAUUGAGUUGU	18	ACAACUCAAUGAGCUUCC	18
DDIT4_62	10	GCAGCUGCGUUUAAGCCU	19	AGGCUUAAACGCAGCUGC	18
DDIT4_63	11	CAGUACUGUAGCAUGAAA	20	UUUCAUGCUACAGUACUG	18

Tabla 2

Nombre ARNbc	SEQ ID NO	Hebra sentido (5'>3')	SEQ ID NO	Hebra antisentido (5'>3')	longitud
DDIT4_41a	21	CCUCAGUACUGUAGCAUA	30	UAUGCUACAGUACUGAGGG	18+1
DDIT4_43a	22	GGCAGCUAUCUUACAGACA	31	UGUCUGUAAGAUAGCUGCC	18+1
DDIT4_46a	23	AGAGCUCGGACUGCGAGUA	32	UACUCGCAGUCCGAGCUCU	18+1
DDIT4_55a	24	GGGUCUUCCAUCUAGAACAA	33	UGUUCUAGAUGGAAGACCC	18+1
DDIT4_59a	25	GGUGGAGACUAGAGGCCAGA	34	UCUGCCUCUAGUCUCCACC	18+1
DDIT4_60a	26	CCUCCAAGACAGAGACGAA	35	UUCGUCUCUGUCUUGGAGG	18+1
DDIT4_61a	27	GGAAGCUCAUUGAGUUGUA	36	UACAACUCAAUGAGCUUCC	18+1
DDIT4_62a	28	GCAGCUGCGUUUAAGCCUA	37	UAGGCUUAAACGCAGCUGC	18+1
DDIT4_63u	29	CAGUACUGUAGCAUGAAAU	38	AUUUCAUGCUACAGUACUG	18+1

En SEQ ID NO: 30, 31, 34, 36 la "U" en la posición 1 del AS se empareja erróneamente con "G" en el ARNm diana. En SEQ ID NO:32, 35 "U" en la posición 1 del AS se empareja erróneamente con "C" en el ARNm diana. En SEQ ID NO: 33 y 37 la "U" en la posición 1 del AS se empareja erróneamente con "U" en el ARNm diana. En SEQ ID NO:38 "A" en la posición 1 del AS se empareja erróneamente con "C" en el ARNm diana.

5

La tabla 3 proporciona moléculas de DDIT4 descritas en este documento.

Tabla 3

Nombre ARNbc	SEQ ID NO	Hebra sentido (5'>3')	SEQ ID NO	Hebra antisentido (5'>3')	longitud
DDIT4_32	39	CCUCAGUACUGUAGCAUGA.	42	UCAUGCUACAGUACUGAGG	19
DDIT4_34	40	CUCAGUACUGUAGCAUGAA	43	UUCAUGCUACAGUACUGAG	19
DDIT4_2	41	UACUGUAGCAUGAAACAAA	44	UUUGUUUCAUGCUACAGUA	19
DDIT4_1	45	GUGCCAACCUGAUGCAGCU	46	AGCUGCAUCAGGUUGGCAC	

ES 2 872 349 T3

La tabla 4 proporciona compuestos DDIT4 que usan las secuencias de oligonucleótidos y las modificaciones químicas descritas en este documento.

Nombre	Senido 5->3	AntiSenido 5->3
DDIT4_41_S2012	rC; rC; C; rU; mC; rA; G; mU; rA; rC; mU; rG; mU; rA; rG; mC; rA; mU; rA; zC3p	mU; rA; mU; rG; rC; rU2p; rA; mC; rA; rG; mU; r A; rC; U; mG; rA; rG; rG; zC3p; zC3p\$
DDIT4_41_S2013	rC; rC; rC; rU; rC; rA; rG; rU; rA; rC; rU; rG; rU; r A; rG; mC; rA; mU; rA; zC3p	mU; rA; mU; rG; rC; rU2p; rA; mC; rA; rG; mU; r A; rC; U; mG; rA; rG; rG; zC3p; zC3p\$
DDIT4_41_S2071 (cap desoxiabásica invertida)	zidB; rC; rC; C; rU; rC; rA; rG; rU; rA; rC; rU; r G; rU; rA; rG; mC; rA; mU; rA; zC3p	mU; rA; mU; rG; rC; rU2p; rA; mC; rA; rG; mU; r A; rC; U; mG; rA; rG; rG; zC3p; zC3p\$
DDIT4_41_S2072 (cap amino C6)	zG6Np; rC; rC; rC; rC; rA; rG; rU; rA; rC; rU ; rG; rU; rA; rG; mC; rA; mU; rA; zC3p	mU; rA; mU; rG; rC; rU2p; rA; mC; rA; rG; mU; r A; rC; U; mG; rA; rG; rG; zC3p; zC3p\$
DDIT4_41_S2073 (cap THNB)	zTHNB6p; rC; rC; rC; rC; rA; rG; rU; rA; r C; rU; rG; rU; rA; rG; rU; rA; mU; rA; zC3p	mU; rA; mU; rG; rC; rU2p; rA; mC; rA; rG; mU; r A; rC; rU; mG; rA; rG; rG; zC3p; zC3p\$
DDIT4_41_S2014	rC; rC; rC; rU; rC; rA; rG; rU; rA; rC; rU; rG; rU; r A; rG2p; rC2p; rA2p; rU2p; rA2p; zC3p	mU; rA; mU; rG; rC; rU2p; rA; mC; rA; rG; mU; r A; rC; U; mG; rA; rG; rG; rG; zC3p; zC3p\$
DDIT4_41_S2015	rC; rC; rC; rU; mC; rA; rG; mU; rA; rC; mU; rG; mU; rA; rG; mC; rA; mU; rA; zC3p	mU; rA; mU; rG; rC; rU2p; rA; mC; rA; rG; rU; rA; rC; mU; rG; rG; rG; rG; zC3p; zC3p\$
DDIT4_41_S2016	rC; rC; rC; rU; rC; rA; rG; rU; rA; rC; rU; rG; rU; r A; rG; mC; rA; rA; mU; rA; zC3p	mU; rA; mU; rG; rC; rU2p; rA; mC; rA; rG; rU; rA; rC; mU; rG; rG; rG; rG; zC3p; zC3p\$
DDIT4_41_S2017	rC; rC; rC; rU; rC; rA; rG; rU; rA; rC; rU; rG; rU; r A; rG2p; rC2p; rA2p; rU2p; rA2p; zC3p	mU; rU; mU; rG; mU; rU; rJ2p; mC; rA; mU; rG; r C; mU; rG; rA; rG; rG; zC3p; zC3p\$
DDIT4_2_S500	rU; mA; rC; mU; rG; mU; rA; rG; mC; rA; mG; rA; mA; rA; mA; mC; rA; mA; rA	mU; rU; mU; rG; mU; rU; rJ2p; mC; rA; mU; rG; r C; mU; rA; rG; mU; rA; rG; rG; zC3p; zC3p\$
DDIT4_2_S2031 (cap desoxiabásica invertida)	zidB; mU; rA; rC; mU; rG; mU; rA; rG; mC; rA; mU; rG; rA; rA; mA; rA; mA; rA; zC3p	mU; rU; mU; rG; mU; rU; rJ2p; mC; rA; rU; rG; r C; mU; rA; rG; mU; rA; rG; rU; zC3p; zC3p\$
DDIT4_2_S2032	mU; rG; rA; rA; mA; rA; rA; zC3p	mU; rU; mU; rG; mU; rA; rG; mU; rA; rG; r C; mU; rA; rG; mU; rA; rG; rU; zC3p; zC3p\$

(continuación)

Nombre	Sentido 5->3	AntiSentido 5->3
DDIT4_2_S2033	zidB; mU; rA; rC; mU; rG; mU; A; rG; mC; rA; mU; rG; rA; rA; rA; mC; rA; rA; rA; zc3p	mU; rU; mU; rG; rU; rU2p; rU; mC; rA; rU; rG; rC; mU; rA; mC; rA; rG; mU; rA; zc3p; zc3p\$
DDIT4_2_S2034	zidB; mU; rA; rC; mU; rG; mU; rA; rG; rC; mA; rU; mG; rA; rA; rA; mC; rA; rA; rA; zc3p	mU; rU; mU; rG; mU; rU; rU2p; mC; rA; mU; rG; rC; mU; rA; mC; rA; rG; mU; rA; zc3p; zc3p\$
DDIT4_2_S2035	zidB; mU; rA; rC; mU; rG; mU; rA; rG; rC; mA; rU; mG; rA; rA; rA; mC; rA; rA; rA; zc3p	mU; rU; mU; rG; mU; rU; rU2p; rU; mC; rA; rU; rG; rC; mU; rA; mC; rA; rG; mU; rA; zc3p; zc3p\$
DDIT4_2_S2036	zidB; mU; rA; rC; mU; rG; mU; rA; rG; rC; mA; rU; mG; rA; rA; rA; mC; rA; rA; rA; zc3p	mU; rU; mU; rG; rU; rU2p; rU; mC; rA; rU; rG; rC; mU; rA; mC; rA; rG; mU; rA; zc3p; zc3p\$
DDIT4_63_S2008	mC; rA; rG; mU; rA; rC; mU; rG; mU; rA; rG; m C; rA; mU; rG; rA; rA; rU; zc3p	rA; rU; mU; rU; mC; rA; rU2p; rG; rC; mU; rA; m C; rA; rG; mU; rA; rC; mU; rG; zc3p; zc3p\$
DDIT4_63_S2009	mC; rA; rG; mU; rA; rC; mU; rG; mU; rA; rG; m C; rA; mU; rG; rA; rA; rU; zc3p	rA; rU; mU; rU; mC; rA; rU2p; rG; rC; rU; mA; rC; mA; rG; mU; rA; rC; mU; rG; zc3p; zc3p\$
DDIT4_63_S2010	mC; rA; rG; rU; rA; rC; rU; rG; rU; rA; rG; rC; rA ; rU; rG2p; rA2p; rA2p; rA2p; rU2p; rU2p; zc3p	rA; rU; mU; rU; mC; rA; rU2p; rG; rC; rU; mA; rC; mA; rG; mU; rA; rC; mU; rG; zc3p; zc3p\$
DDIT4_63_S2011	mC; rA; rG; rU; rA; rC; rU; rG; rU; rA; rG; rC; rA ; rU; rG2p; rA2p; rA2p; rA2p; rU2p; rU2p; zc3p	rA; rU; mU; rU; mG; rC; mA; rU; mC; rA; mG; r G; mU; rU; mG; rG; mC; rA; mC\$
DDIT4_1_S73	rG; mU; rG; mC; rC; mA; mA; rA; mA; rC; mU; rG; mA; rU; mG; rC; mA; rA; mA; rC; mU; rG;	mA; rG; mC; rU; mG; rC; mA; rU; mA; rC; mA; rG; r G; mU; rU; mG; rG; mC; rA; mC\$
DDIT4_1_S500	rG; mU; rG; mC; rC; mA; mA; rA; mA; rG; mC; rU mA; rU; mG; rC; mA; rA; mA; rG; mC; rU	mA; rG; mC; rU; mG; rC; mA; rU; mA; rC; mA; rG; r G; mU; rU; mG; rG; mC; rA; mA;

La tabla 5 proporciona la clave de las modificaciones químicas que se muestran en la tabla 4.

Tabla 5:

	Descripción de la modificación
\$	Sin 3' Fosfato
3mN2p	3'-O-metil ribo-nucleótido-2'-fosfato (3'OMe en 2'5' ribonuc enlazado)
5med	5'-O-metil desoxi-nucleótido 3'-fosfato
d	desoxiribosa-5'-fosfato
d	desoxiUridina
dB	desoxiribosa-3'-fosfato abásica (Tetrahidrofurano)
dC(C6N)	Amino-Modificador-C6-dC (dC-derivado; Glen Research)
dC(N4al)	enlazante desoxi citidina N4 Amino (ChemGene)
dNpac	desoxiribonucleótido-3' fosfonoacetato (PACE)
dT(C2N)	Amino-Modificador-C2-dT (dU-derivado; Glen Research)
ena	Nucleósidos 2'-N,4'-C-etileno-en puente
FITC	Isotiocianato de fluoresceína FITC (tinte fluorescente)
idB	desoxiribosa-5'-fosfato abásica invertida interna
Ld	Desoxi-nucleótido espejo (imagen especular de ADN)
Ina	Ácido desoxi nucleico bloqueado (desoxi)
Lr	imagen especular de ARN
m	2'-O-metil ribo-nucleótido-3'-fosfato (mA, mC, mG, mU)
m5r	5-Metil-ribonucleótido (citidina/uridina)
mNpeth	2'-O-metilnucleótido-3'-etoxifosfato
mNps	Base 2'-O-metilo fosforotioado
NPr	Ribonucleótido-N3'-P5'
P	5'-Fosfato
psiU	Pseudouridina
ptd	Pirazolo-triazina desoxiadenosina, C-C nucleósido
rN2p	ribo-nucleótido-2'-fosfato (2'5' enlazado)
rNps	Base de ARN fosforotioado
s	5' fosforotioato = no-escindible Pi
tna	ácido nucleico de treosa
X	blanco

y8Oxo-dG	reemplazar con 8-Oxo-dG (Glen Research: 10-1028-xx)
yc3p	reemplazar con 3-Hidroxipropano-1-fosfato
ydA	reemplazar con desoxiriboAdenosina-3'-fosfato;
ydT	reemplazar con desoxiriboTimidina-3'-fosfato;
ydU	reemplazar con desoxiUridina
yLdA	reemplazar con L-desoxiriboAdenosina-3'-fosfato
yLdC	reemplazar con L-desoxiriboCtidina-3'-fosfato
yLdG	reemplazar con L-desoxiriboGuanosina-3'-fosfato
ymA	reemplazar con 2'-O-metilAdenosina-3'-fosfato;
ymC	reemplazar con 2'-O-metilCtidina-3'-fosfato;
ymU	reemplazar con 2'-O-metilUridina-3'-fosfato;
yrA	reemplazar con riboAdenosina-3'-fosfato;
yrC	reemplazar con riboCtidina-3'-fosfato;
yrG	reemplazar con riboGuanosina-3'-fosfato;
yrU	reemplazar con riboUridina-3'-fosfato;
yrU2p	reemplazar con riboUridina-2'-fosfato
ytnaA	reemplazar con tnaA
ytnaC	reemplazar con tnaC
z(c12Np)2	Duplicador (C12-Amino-Pi)2-Simétricos
z(c12p)2	Duplicador (C12-Pi)2-Simétricos
z(c6Np)2	Duplicador (C6-Amino-Pi)2-Simétrico
zc12Np	Amino-C 12-Fosfato
zc3p	(CH2)3-Pi= 3-Hidroxipropano-1-fosfato
zc3p;zc3p	(CH2)3-Pi x2; =3-Hidroxipropano-1-fosfato;
zc3p;zc3p;zc3p	(CH2)3-Pi x3; =3-Hidroxipropano-1-fosfato;
zc3p;zc3p;zc3p	(CH2)3-Pi; (CH2)3-Pi; Tinte de cianina
zc3p;zc3ps	(CH2)3-Pi; (CH2)-3'phosphorotioate
zc3p;zc3p	(CH2)3-Pi (=3-Hidroxipropano-1-fosfato); Tinte de cianina
zc3p;zrB	(CH2)3-Pi ; ribo-Abasic-3'-Pi
zc3p;zrG	(CH2)3-Pi _rG

zc5Np	Amino-C5-Fosfato
zc6Np	Amino-C6-Fosfato
zc6Np;z(CH2CH2O)3p	NH2-C6-pi_(CH2CH2O)3-pi
zc6Np;z(CH2CH2O)6p	NH2-C6-pi_(CH2CH2O)6-pi
zc6Np;zc12p	NH2-C6-pi_(CH2)12-pi
zc6Np;zc6p	NH2-C6-pi_(CH2)6-pi
zc6Np;zrC;zrA	Amino-C6-Fosfato_rCrA
zcy3	Fluoruro de cianina (unido covalentemente)
zcy3;zdT	Cy3_desoxi-Timidina-3'-Pi unido covalentemente en el terminal 3'
zcy5	Tinte de cianina (Excitación violeta)
zdB;zdB	desoxiribosa-3'-fosfato x2 abásica
zdC(C6N)	Amino-Modificador-C6-dC (derivado dC; Glen Research)
zdC(C6N);zdC(C6N)	Amino-Modificador-C6-dC x2 (derivado dC; Glen Research)
zdC(N4al)	desoxi Citidina N4 Amino enlazante (ChemGenes)
zdT	desoxi-Timidina-3'-Fosfato (dT)
zdT;zdT	dTdT saliente unido covalentemente en 3'
zdU	cap desoxiUridina
zidB	desoxiribosa-5'-fosfato abásica invertida; At 5'=5'-5' idAb; At 3'= 3'-3' idAb
zidT	Desoxi-Timidina-5'-Fosfato Invertida-
ziLd	Invertida L-ADN unido covalentemente en el extremo
zirB	ribosa-5'-fosfato abásica invertida
zirB;zirB	abásica invertida ribosa-5'-fosfato x2
zirB;zrC;zrA	abásica invertida ribosa-3'-fosfato_rCrA
zLdA	L-desoxiriboAdenosina-3'-fosfato
zLdC	L-desoxiriboCitidina-3'-fosfato
zLdG	L-desoxiriboGuanosina-3'-fosfato
zLdT	L-desoxiriboTimidina-3'-fosfato
zmC	2'-O-metilcitidina-3'-fosfato
zmU	2'-O-metiluridina-3'-etoxifosfato
zmU;zmU	mUmU

zRA;zc12Np	Ácido retinoico_C12-Amino-Pi
zrA;zrG	rArG unido en el extremo
zRAp	Ácido retinoico
zRAp;z(CH2CH2O)3p	Ácido retinoico-pi_(CH2CH2O)3-pi
zRAp;z(CH2CH2O)6p	Ácido retinoico-pi_(CH2CH2O)6-pi
zRAp;zc12p	Ácido retinoico-pi_(CH2)12-Pi
zRAp;zc6p	Ácido retinoico-pi_(CH2)6-pi
zrB;zrB	ribosa-3'-fosfato x2 abásica
zrC;zrA	rC;rA
zrU;zrG	rUrG
zrU;zrU	rUrU
zVEp	Vitamina E-pi
zVEp;z(CH2CH2O)3p	Vitamina E-pi_(CH2CH2O)3-pi
zVEp;zc12p	Vitamina E-pi_(CH2)12-pi
zVEp;zc6p	Vitamina E-pi_(CH2)6-pi
z	Unidad estructural (nucleótido o no-nucleótido) unida covalentemente al extremo

Pruebas *in vitro* de moléculas de ARNbc

Aproximadamente 1.5-2x105 células ensayadas (células HeLa y/o células 293T y/o células Be2C para moléculas de ARNbc y células NRK52 (células del túbulo proximal de riñón de rata normal) y/o células NMuMG (línea de células epiteliales mamarias de ratón) para direccionamiento de ARNip el gen de rata/ratón) se sembraron por pocillo en una placa de 6 pocillos (70-80 % de confluencia).

5

24 horas después, las células se transfecaron con moléculas de ARNbc usando el reactivo Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) a concentraciones finales de 5 nM o 20 nM. Las células se incubaron a 37 °C en una incubadora de CO2 durante 72 h.

10

Como control positivo para la transfección, se usaron moléculas de ARNbc marcadas con PTEN-Cy3. Se usaron moléculas de ARNbc de GFP como control negativo de la actividad de ARNip.

A las 72 h después de la transfección, se recolectaron las células y se extrajo el ARN de las células. La eficacia de la transfección se probó mediante microscopía fluorescente.

15

El porcentaje de inhibición de la expresión génica usando moléculas específicas preferidas se determinó usando análisis de qPCR de un gen diana en células que expresan el gen endógeno. Las figuras 1A-1F muestran la actividad de eliminación de las moléculas descritas en este documento. Los resultados son % de actividad residual (por ejemplo, un valor más bajo se refiere a una eliminación más alta).

Ensayo de estabilidad celular/de fluidos corporales

20

Los compuestos modificados descritos en este documento se prueban para determinar la estabilidad dúplex en plasma humano, de rata o ratón o suero humano, de rata o ratón (para probar en el sistema modelo), o CSF (líquido cefalorraquídeo; humano, ratón o rata), fluido vítreo de conejo o rata o extracto de células humanas, según se indica:

Por ejemplo: las moléculas de ARNbc a una concentración final de 7 uM se incuban a 37 °C en suero humano al 100 % (Sigma Cat # H4522). (solución madre de ARNip 100 uM diluido en suero humano 1:14.29 o extracto de tejido humano

de varios tipos de tejido). Se agregan cinco ul (5 ul) a 15 ul de solución reguladora de carga 1.5xTBE en diferentes puntos de tiempo (por ejemplo, 0, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 8 h, 10 h, 16 y 24 h). Las muestras se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantienen a -20 °C.

5 Cada muestra se carga en un gel de acrilamida al 20 % no desnaturalizante, preparado según métodos conocidos en la técnica. Los oligos se visualizan con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta.

La figura 2 muestra la estabilidad de las moléculas descritas en este documento.

Ensayo de estabilidad de exonucleasas

10 Para estudiar el efecto de estabilización de las unidades estructurales no nucleótidos 3' en una molécula de ácido nucleico, se incuban la hebra sentido, la hebra antisentido y el dúplex de ARNbc hibridado en extractos citosólicos preparados a partir de diferentes tipos de células.

Extracto: extracto citosólico de HCT116 (12 mg/ml).

Solución reguladora de extracto: se agregó Hepes 25 mM pH -7.3 a 37 °C; MgCl 8 mM; NaCl 150 mM con DTT 1 mM fresco inmediatamente antes de su uso.

15 Método: se mezclaron 3.5 ml de ARNbc de prueba (100 mM) con 46.5 ml que contenían 120 mg de extracto citosólico de HCT116. Los 46.5 ml constan de 12 ml de extracto de HCT116 y 34.5 ml de la solución reguladora de extracto suplementado con DTT y cóctel de inhibidores de proteasa/100 (Calbiochem, setIII-539134). La concentración final del ARNip en el tubo de incubación es 7 mM. La muestra se incuba a 37 °C y, en el momento indicado, se trasladan 5 ml a un tubo nuevo, se mezclan con 15 ml de solución reguladora de carga de glicerol al 50 % 1XTBE y se congelan instantáneamente en N2 líquido. La concentración final del ARNip en la solución reguladora de carga es 1.75 mM (21 ng ARNip/ml). Para los análisis mediante tinción con PAGE nativa y EtBr, se cargan 50 ng por carril. Para los análisis 20 Northern, se carga 1 ng de ARNip probado por carril.

Respuesta inmune innata a moléculas de ARNbc:

25 Se mezcla sangre humana fresca (a TA) en una proporción 1:1 con NaCl al 0.9 % estéril a TA y se carga suavemente (proporción 1:2) en Ficoll (Lymphoprep, Axis-Shield cat # 1114547). Las muestras se centrifugan a TA (22 °C, 800 g) en una centrífuga oscilante, durante 30 minutos, se lavan con medio RPMI1640 y se centrifugan (TA, 250 g) durante 10 minutos. Las células se cuentan y se siembran a una concentración final de 1.5 x 106 células/ml en medio de crecimiento (RPMI1640+FBS al 10 %+L-glutamina 2 mM+Pen-Strep al 1 %) y se incuban durante 1 hora a 37 °C antes del tratamiento con ARNbc. Las células se exponen a los ARNbc de prueba a diferentes concentraciones usando el reactiva 30 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante y se incuban a 37 °C en una incubadora de CO2 al 5 %, durante 24 horas.

35 Como control positivo para la respuesta de IFN, las células se tratan con ya sea poli (I:C), un análogo sintético de ARN bicatenario (ARNbc) que es un ligando TLR3 (InvivoGen Cat # trl-pic) a concentraciones finales de 0.25-5.0 µg/ml o tiazolaquinolona (CLO75), un ligando TLR 7/8 (InvivoGen Cat # trl-c75) a concentraciones finales de 0.075-2 µg/ml. Las células tratadas con el reactiva Lipofectamine™ 2000 se usan como control negativo (de referencia) para la respuesta al IFN.

40 Aproximadamente 24 horas después de la incubación, las células se recogen y el sobrenadante se transfiere a nuevos tubos. Las muestras se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido y la secreción de citocinas IL-6 y TNF-α se probó usando IL-6, kit de ELISA DuoSet (R&D System DY2060) y TNF-α, kit de ELISA DuoSet (R&D System DY210), según las instrucciones del fabricante. El ARN se extrae de las pellas celulares y los niveles de ARNm de los genes humanos IFIT1 (proteína inducida por interferón con repeticiones 1 de tetratricopéptido) y MX1 (resistencia 1 al mixovirus (virus de la influenza), proteína p78 inducible por interferón) se midieron mediante qPCR. Las cantidades de ARNm medidas se normalizan a la cantidad de ARNm del gen de referencia peptidilprolil isomerasa A (ciclofilina A; CycloA). La inducción de la señalización de IFN se evalúa comparando la cantidad de ARNm de los genes IFIT1 y MX1 de las células tratadas, en relación con sus cantidades de células no tratadas. Los resultados de qPCR son los que pasaron los estándares de CC, esto es, el valor de la pendiente de la curva estándar estaba en el intervalo [-4, -3], R2> 0.99, sin dímeros de cebador. Los resultados que no superen los requisitos de CC se descalifican del análisis.

45 En general, los ARNbc que tienen secuencias específicas que se seleccionaron para el ensayo *in vitro* eran específicos para humanos y una segunda especie, tal como genes de rata o conejo. Ciertos dúplex modificados químicamente preferidos se exponen a continuación en este documento y en la tabla 4 anterior.

Nombre dúplex	Hebra sentido/hebra antisentido (5'>3')
DDIT4_41a_S2012	

	rC;rC;rC;rU;mC;rA;rG;mU;rA;rC;mU;rG;mU;rA;rG;mC;rA;mU; rA;zc3p
	mU;rA;mU;rG;rC;rU2p;rA;mC;rA;rG;mU;rA;rC;rU;mG;rA;rG;rG; rG;zc3p;zc3p\$
DDIT4_41a_S2013	rC;rC;rC;rU;rC;rA;rG;rU;rA;rC;rU;rG;rU;rA;rG;mC;rA;mU;rA; zc3p
	mU;rA;mU;rG;rC;rU2p;rA;mC;rA;rG;mU;rA;rC;rU;mG;rA;rG;rG; rG;zc3p;zc3p\$

Nombre dúplex	Hebra sentido/hebra antisentido (5'>3')
DDIT4_41a_S2071 (SEQ ID NOS:21 y 30) desoxiabásica invertida en hebra sentido 5'	zidB;rC;rC;rC;rU;rC;rA;rG;rU;rA;rC;rU;rG;rU;rA;rG;mC;rA;mU; rA;zc3p
	mU;rA;mU;rG;rC;rU2p;rA;mC;rA;rG;mU;rA;rC;rU;mG;rA;rG;rG; rG;zc3p;zc3p\$
DDIT4_41a_S2072 SEQ ID NOS:21 y 30) c6 amino en hebra sentido 5'	zc6Np;rC;rC;rC;rU;rC;rA;rG;rU;rA;rC;rU;rG;rU;rA;rG;mC;rA;mU; rA;zc3p
	mU;rA;mU;rG;rC;rU2p;rA;mC;rA;rG;mU;rA;rC;rU;mG;rA;rG;rG; zc3p;zc3p\$
DDIT4_41a_S2073 SEQ ID NOS:21 y 30) THNB en hebra sentido 5'	zTHNBc6p;rC;rC;rC;rU;rC;rA;rG;rU;rA;rC;rU;rG;rU;rA;rG;mC;rA; mU;rA;zc3p
	mU;rA;mU;rG;rC;rU2p;rA;mC;rA;rG;mU;rA;rC;rU;mG;rA;rG;rG; zc3p;zc3p\$

RACE: rápida amplificación de extremos de ADNc

El procedimiento RACE de ARNm escindido con ARNbc se realiza según métodos estándar conocidos en la técnica. La escisión mediada por ARNi del ARNm de DDIT4 en el ojo de rata después de la administración IVT de la molécula DDIT4_41a_2071 se confirmó mediante Amplificación Rápida de Extremos de ADNc (RACE). La escisión mediada por ARNi de un ARNm diana ocurre entre nucleótidos complementarios a las bases 10-11 de la hebra guía de ARNip para producir dos fragmentos de ARNm: un fragmento 5' que representa la región aguas arriba del sitio de escisión y el fragmento 3' que representa la región aguas abajo al sitio de escisión. La presencia del fragmento aguas abajo se puede detectar usando el método RACE, que se basa en la ligación de un adaptador oligonucleotídico en el terminal 5' de este fragmento, seguido de amplificación por PCR usando cebadores directos específicos del adaptador y cebadores inversos específicos del gen. Se extrajo ARN de toda la retina de ojos de rata 24 horas después de la inyección intravítreo (IVT) de 20 µg de ARNip y se sometió a análisis RACE. El producto de amplificación se separó mediante electroforesis en gel

de agarosa y se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Los productos separados se analizaron mediante hibridación por transferencia Southern usando una sonda específica para la unión de escisión RACE predicha. Los resultados de la hibridación indican la generación específica del producto adecuado predicho para la escisión mediada por ARNi del ARNm de DDIT4. Las figuras 5A-5C muestran los resultados de RACE usando la molécula DDIT4_41a_S071 descrita en este documento.

5 Ejemplo 2: Generación de secuencias para moléculas de ARNbc activas para DDIT4 y producción de ARNip.

Usando algoritmos patentados y la secuencia conocida del ARNm de los genes diana descritos en este documento, se generaron las secuencias de muchos ARNbc potenciales, esto es, ARNip. A continuación se expone una clave para la lista de secuencias: SEQ ID NOS: 3-11 y 12-20 establecen secuencias de oligonucleótidos sentido y antisentido, respectivamente, para generar ARNbc útil para regular negativamente la expresión de DDIT4. Cada secuencia de oligonucleótidos sentido y antisentido se presenta en orientación 5' a 3'.

10 Específicamente, las SEQ ID NOS: 21-29 y 30-48 proporcionan oligonucleótidos humanos de 19 mer útiles para generar moléculas de ARNbc para regular negativamente la expresión de DDIT4. Las hebras de oligonucleótidos se sintetizan preferiblemente usando nucleótidos modificados químicamente y unidades estructurales no convencionales que incluyen 15 ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar, ribo- o desoxirribo nucleótidos unidos a 2'5', TNA, análogos de nucleótidos de pirazolotriazina, nucleótidos espejo y similares. Las moléculas se pueden unir además covalentemente a unidades estructurales conjugadas que incluyen péptidos, lípidos, vitaminas, anticuerpos, sacáridos, etc. mediante acoplamiento posterior a la síntesis o incorporando un agente fosforaqlmidita en la hebra de oligonucleótidos durante la síntesis.

20 Las secuencias de oligonucleótidos se priorizaron en base a su puntuación en el algoritmo patentado como las secuencias mejor predichas para dirigirse a la expresión génica humana.

"18+1" se refiere a una molécula que tiene 19 nucleótidos de longitud e incluye un desapareamiento con el ARNm diana en la posición 1 de la hebra antisentido, según la estructura (A2). En los ejemplos preferidos descritos en este documento, la hebra sentido es completamente complementaria a la hebra antisentido. En algunos ejemplos descritos en este documento, la hebra sentido se empareja erróneamente con la hebra antisentido en 1, 2 o 3 posiciones.

25 Ejemplo 3: Pruebas dentro y fuera de la diana de moléculas de ARN bicatenario:

El sistema psiCHECK™ permite la evaluación de la hebra guía (GS) (antisentido) y la hebra pasajera (PS) (hebra sentido) para provocar efectos dirigidos (en el objetivo) y fuera de la diana, mediante el control de los cambios en los niveles de expresión de sus secuencias diana. Se prepararon cuatro construcciones basadas en psiCHECK™-2 (Promega) para la evaluación de la actividad diana y la actividad potencial fuera de la diana de cada hebra GS y PS de molécula de prueba.

30 En cada una de las construcciones, se clonó una copia o tres copias de la diana completa o de la secuencia semilla-diana, de la molécula de prueba PS o GS, en el sitio de clonación múltiple ubicado aguas abajo del codón de terminación de la traducción de la luciferasa de Renilla en la región 3'- UTR. Los vectores resultantes se denominaron:

Vector GS-CM (hebra guía, emparejamiento completo) que contiene una copia de la secuencia diana completa (secuencia de nucleótidos completamente complementaria a la secuencia completa de 19 bases de la GS de la molécula de prueba);

35 Vector PS-CM (hebra pasajera, emparejamiento completo) que contiene una copia de la secuencia diana completa (secuencia de nucleótidos completamente complementaria a la secuencia completa de 19 bases de la PS de la molécula de prueba);

Vector GS-SM (hebra guía, emparejamiento de semillas) que contiene una copia o tres copias de la secuencia diana de la región de semillas (secuencia complementaria a los nucleótidos 1-8 de la GS de la molécula de prueba);

40 Vector PS-SM (hebra pasajera, emparejamiento de semillas) que contiene una copia de la secuencia diana de la región de semillas (secuencia complementaria a los nucleótidos 1-8 de la PS de la molécula de prueba).

Nomenclatura:

Hebra guía: hebra de ARNip que ingresa al complejo RISC y guía la escisión/silenciamiento de la secuencia de ARN complementaria

45 Secuencia de semillas: nucleótidos 2-8 del terminal 5' de la hebra guía.

cm (emparejamiento completo): fragmento de ADN completamente complementario a la hebra guía de ARNip. Este fragmento de ADN se clona en 3'UTR de un gen indicador y sirve como diana para el silenciamiento directo del ARN.

50 Suma (emparejamiento de semillas): fragmento de ADN de 19 mer con nucleótidos ns 12-18 completamente complementario a los ns 2-8 de la hebra guía de ARNip. Este fragmento de ADN se clona en 3'UTR de un gen indicador y sirve como diana para el silenciamiento "fuera de la diana".

X1: Una sola copia de cm o suma clonada en 3'UTR de un gen indicador.

X3 Tres copias de cm o suma clonadas en 3'UTR de un gen indicador, separadas con 4 nucleótidos entre sí.

Ejemplo 4: Prueba dentro y fuera de la diana de conjugados DDIT4

Se usó el sistema psiCHECK™ para estudiar la actividad de eliminación dentro y fuera de la diana, como se describió anteriormente para el ejemplo 3.

5 Se prepararon las hebras antisentido de DDIT4_41_S2071, DDIT4_41_S2072 y DDIT4_41_S2073 como se detalla en el ejemplo 8, así como de DDIT4_41_S2012 y DDIT4_41_S2013 como se describe a continuación. Se probaron DDIT4_41_S2071, DDIT4_41_S2072, y DDIT4_41_S2073 a concentraciones de 0.005 nM, 0.015 nM, 0.045 nM, 0.137 nM, 0.41 nM, 1.23 nM, 3.7 nM, 11.1 nM, 33.3 nM, y 100 nM. Se probaron DDIT4_41_S2012 y DDIT4_41_S2013 a concentraciones de 5 nM. Los resultados de la eliminación en el objetivo se presentan en la tabla 6 a continuación, expresados como % de ARNm residual.

10

DDIT4_41_S2012	Sentido: rC;rC;rC;rU;mC;rA;rG;mU;rA;rC;mU;rG;mU;rA;rG;mC;rA;mU;rA;zc 3p
	Antisentido: mU;rA;mU;rG;rC;rU2p;rA;mC;rA;rG;mU;rA;rC;rU;mG;rA;rG;rG; zc3p;zc3p\$
DDIT4_41_S2013	Sentido: rC;rC;rC;rU;rC;rA;rG;rU;rA;rC;rU;rG;rU;rA;rG;mC;rA;mU;rA;zc3p
	Antisentido: mU;rA;mU;rG;rC;rU2p;rA;mC;rA;rG;mU;rA;rC;rU;mG;rA;rG;rG; zc3p;zc3p\$

Tabla 6

NOMBRE DÚPLEX	CONCENTRACIÓN (nM)	% ARNm RESIDUAL
DDIT4_41_S2071	0.005	43
	0.015	32
	0.045	24
	0.137	14
	0.41	8
	1.23	6
	3.7	4
	11.1	4
	33.3	3
	100	3
DDIT4_41_S2072	0.005	56

	0.015	37
	0.045	32
	0.137	18
	0.41	14
	1.23	9
	3.7	7
	11.1	6
	33.3	6
	100	4
DDIT4_41_S2073	0.005	66
	0.015	53
	0.045	42
	0.137	30
	0.41	19
	1.23	15
	3.7	7
	11.1	6
	33.3	7
	100	6
DDIT4_41_S2012	5	11
DDIT4_41_S2013	5	9

Actividad de eliminación fuera de la diana para las hebras sentido de DDIT4_41_S2071 con tapa abásica desoxi invertida (idAB); DDIT4_41_S2072 con tapa de amino-C6 (Am-C6); y DDIT4_41_S2073 conjugado con THNB se ensayó a concentraciones de 0.005 nM, 0.015 nM, 0.045 nM, 0.137 nM, 0.41 nM, 1.23 nM, 3.7 nM, 11.1 nM, 33.3 nM, y 100 nM. 5 DDIT4_41_S2012 y DDIT4_41_S2013 se probaron a concentraciones de 5 nM. Los resultados se presentan en la tabla 7 a continuación, expresados como % de ARNm residual. Como se muestra en la tabla, se observó una actividad de eliminación significativamente menor con la hebra sentido en comparación con la hebra antisentido.

Tabla 7

NOMBRE DÚPLEX	CONCENTRACIÓN (nM)	% ARNm RESIDUAL
DDIT4_41_S2071	0.005	59
	0.015	73
	0.045	68

	0.137	61
	0.41	57
	1.23	41
	3.7	46
	11.1	41
	33.3	42
	100	33
DDIT4_41_S2072	0.005	65
	0.015	73
	0.045	74
	0.137	69
	0.41	75
	1.23	73
	3.7	71
	11.1	67
	33.3	73
	100	65
DDIT4_41_S2073	0.005	78
	0.015	74
	0.045	75
	0.137	75
	0.41	66
	1.23	76
	3.7	72
	11.1	71
	33.3	73
	100	75
DDIT4_41_S2012	5	42
DDIT4_41_S2013	5	32

Las figuras 4A y 4B muestran los datos en forma gráfica.

Ejemplo 4: El efecto del tratamiento con ARNbc del gen diana sobre la muerte de las células ciliadas inducida por carboplatino en la cóclea de la chinchilla

Se pretratan ocho chinchillas mediante la administración directa de moléculas de DDIT4 bicanalares en solución salina en la oreja izquierda de cada animal. Se administra solución salina en la oreja derecha de cada animal como placebo.

5 Dos días después de la administración de las moléculas DDIT4 bicanalares, los animales se tratan con carboplatino (75 mg/kg iP). Después del sacrificio de las chinchillas (dos semanas después del tratamiento con carboplatino), se calcula el % de células muertas de las células ciliadas internas (IRC) y las células ciliadas externas (ONC) en el oído izquierdo (tratado con ARNip) y en el oído derecho (tratado con solución salina). Dado que el efecto del ARNip es similar en todas las dosis, los datos se agrupan de las 3 dosis. Como se mostró anteriormente, el carboplatino daña preferentemente las células ciliadas internas de la chinchilla a la dosis de 75 mg/kg, mientras que las células ciliadas externas permanecen intactas. Los compuestos de ARNbc proporcionados en este documento reducen la pérdida de células ciliadas internas inducida por ototoxina (por ejemplo, inducida por carboplatino) en la cóclea. También son posibles otros modelos animales.

10 Ejemplo 5: El efecto del tratamiento con ARNbc sobre la muerte de las células ciliadas inducida acústicamente en la cóclea de la chinchilla

15 La actividad de las moléculas de ARNbc de DDIT4 descritas en este documento en un modelo de trauma acústico se estudia en chinchilla. Un grupo de 7 animales sufren un trauma acústico al exponerlos a una banda de ruido de una octava centrada en 4 kHz durante 2.5 h a 105 dB. La oreja izquierda de las chinchillas expuestas al ruido se trata previamente (48 h antes del trauma acústico) con aproximadamente 30 µg de moléculas DDIT4 bicanalares en ~ 10 µL de solución

20 salina; el oído derecho se trata previamente con vehículo (solución salina). El potencial de acción del compuesto (CAP) es un método electrofisiológico conveniente y confiable para medir la actividad neural transmitida desde la cóclea. El CAP se registra colocando un electrodo cerca de la base de la cóclea para detectar el potencial de campo local que se genera cuando un estímulo sonoro, tal como un clic o una explosión de tono, se enciende abruptamente. El estado funcional de cada oído se evalúa aproximadamente 2.5 semanas después del trauma acústico. Específicamente, el umbral medio del potencial de acción del compuesto registrado a partir de la ventana redonda se determina 2.5 semanas después del trauma acústico para determinar si los umbrales en el oído tratado con ARNbc eran más bajos (mejores) que en el oído no tratado (solución salina). Además, la cantidad de pérdida de células ciliadas internas y externas se determina en el oído tratado con ARNip y en el oído de control. Los resultados indican que los ARNbc proporcionados en este documento son capaces de reducir la pérdida de ONC inducida por trauma acústico en la cóclea.

25 Ejemplo 6: El efecto del tratamiento con ARNbc sobre la muerte de las células ciliadas inducida por cisplatino en la cóclea de ratas

30 Se analizan ratas Wistar macho para determinar los umbrales de respuesta auditiva basal del tronco encefálico (ABR) para señales de clics, 8, 16 y 32 kHz antes del tratamiento con cisplatino. Después de la prueba de respuesta auditiva basal del tronco encefálico, el cisplatino se administra como una infusión intraperitoneal de 12 mg/kg durante 30 minutos.

35 Ejemplo 7: Sistemas modelo de insuficiencia renal aguda (ARF)

35 Las orejas tratadas reciben ya sea lug/4 microlitros de ARNbc descrito en este documento en PBS (aplicado directamente a la membrana de la ventana redonda). Las orejas de control se tratan ya sea con ARNbc de GFP no relacionado o con PBS. Las moléculas de ARNbc se administran entre 3-5 días antes de la administración de cisplatino para permitir un efecto protector sobre la cóclea.

40 La prueba de respuesta auditiva del tronco encefálico (ABR) se repite 3 días después de la administración de cisplatino.

40 Los umbrales de respuesta auditiva del tronco encefálico se comparan entre el pretratamiento y el tratamiento posterior y se mide el cambio en los umbrales. Un mayor cambio en los umbrales después del tratamiento con cisplatino es indicativo de una pérdida más grave de células ciliadas en la cóclea. Después de repetir la prueba de respuesta auditiva del tronco encefálico, los animales se sacrifican y las cócleas se extraen y procesan para microscopía electrónica de barrido (SEM) para cuantificar la pérdida de células ciliadas externas (ONC) en la región del gancho (región de alta frecuencia). El % de pérdida de células ciliadas externas se calcula dividiendo el número de células faltantes o gravemente dañadas por el número total de células ciliadas externas en el campo de la fotografía. Los resultados indican que las moléculas de ARNbc descritas en este documento proporcionan un efecto protector a la cóclea cuando se administran antes de la administración de ototoxina (por ejemplo, cisplatino).

45 Ejemplo 7: Sistemas modelo de insuficiencia renal aguda (ARF)

50 La ARF es un síndrome clínico caracterizado por un rápido deterioro de la función renal que se produce en unos días. Sin estar ligado a la teoría, la lesión renal aguda puede ser el resultado de una lesión por isquemia-reperfusión renal, tal como una lesión por isquemia-reperfusión renal, en pacientes que se someten a una cirugía mayor tal como una cirugía cardíaca mayor. La característica principal de la ARF es una disminución abrupta de la tasa de filtración glomerular (GFR), lo que resulta en la retención de desechos nitrogenados (urea, creatinina). Estudios recientes apoyan que la apoptosis en los tejidos renales es prominente en la mayoría de los casos humanos de ARF. El sitio principal de muerte celular apoptótica es la nefrona distal. Durante la fase inicial de la lesión isquémica, la pérdida de la integridad del citoesqueleto de actina conduce al aplastamiento del epitelio, con pérdida del borde en cepillo, pérdida de los contactos celulares focales y posterior desprendimiento de la célula del sustrato subyacente.

El ensayo de moléculas de ARNbc activas se realiza usando un modelo animal para ARF inducida por isquemia-reperfusión

Protección contra ARF inducida por isquemia-reperfusión

La lesión por isquemia-reperfusión se induce en ratas después de una pinza arterial renal bilateral de 45 minutos y la posterior liberación de la pinza para permitir 24 horas de reperfusión. Se inyectan 12 mg/kg de moléculas en la vena yugular 30 minutos antes y 4 horas después de la pinza. La progresión de la ARF se controla mediante la medición de los niveles de creatinina sérica antes (de referencia) y 24 horas después de la cirugía. Al final del experimento, las ratas se perfunden a través de una línea femoral permanente con PBS caliente seguido de paraformaldehído al 4 %. Los riñones izquierdos se extirpan quirúrgicamente y se almacenan en paraformaldehído al 4 % para su posterior análisis histológico.

La insuficiencia renal aguda se define con frecuencia como un aumento agudo del nivel de creatinina sérica desde la referencia. Un aumento de al menos 0.5 mg por dL o 44.2 μ mol por L de creatinina sérica se considera una indicación de insuficiencia renal aguda. La creatinina sérica se mide en el tiempo cero antes de la cirugía y 24 horas después de la cirugía de ARF.

Las moléculas descritas en este documento se prueban en el sistema modelo anterior y se encuentra que protegen contra la reperfusión por isquemia.

Además, la prueba de moléculas activas para el tratamiento de la ARF también se puede realizar usando la ARF inducida por sepsis.

Miyaji et al., 2003 describen dos modelos animales predictivos de ARF inducida por sepsis, el piruvato de etilo reduce la insuficiencia renal aguda inducida por sepsis y el daño de múltiples órganos en ratones envejecidos, *Kidney Int.* Nov;64(5): 1620-31. Estos dos modelos son la administración de lipopolisacáridos y la punción de ligadura cecal en ratones, preferiblemente en ratones de edad avanzada.

Ejemplo 8: aplastamiento del nervio óptico (ONC)

Se lleva a cabo un experimento de modelo de aplastamiento del nervio óptico de rata (ONC) explorando los efectos de las moléculas descritas en este documento 30 días después de la supervivencia de las células ganglionares de la retina (RGC) de la ONC y la regeneración de los axones RGC. Se tratan grupos de 4 ratas con ONC bilateral y cada par de ojos recibe el mismo tratamiento (n total=8 por grupo de tratamiento) con ya sea PBS (vehículo) o ARNip dirigido a EGFP (control negativo), o las moléculas como se describe en este documento. siEGFP en monoterapia se inyectó a los animales 40 ug/ovo. Todos los ARNip se inyectan a 20 ug/ovo. En todos los casos, el volumen de inyección final fue de 10 ul. El estudio finaliza el día 24, los ojos con nervios ópticos se enuclean y se someten a evaluación histológica de supervivencia de RGC y excrecencia del axón del nervio óptico.

Diseño del estudio *in vivo*: los grupos se someterán a ONC bilateral. Cada par de ojos recibirá el mismo tratamiento. La administración de ARNip para todos los grupos será mediante inyección intravítreal bilateral (IVT) cada 10 días. La terminación para grupos es 24 o 40 días después del ONC.

Evaluación de la supervivencia de RGC a los 24 días posteriores al aplastamiento del nervio óptico

Para los recuentos de RGC, secciones de espesor del ojo de 20 x 15 μ m, con el nervio óptico claramente visible, se toman y se selecciona y tiñe cada 4a sección para la tubulina β -III y DAPI para revelar la RGC (un total de 50-60 secciones por grupo fueron evaluados). Se usa una región lineal de 250 μ m de la retina ya sea a cada lado del nervio óptico para contar números de β III+RGC/250 μ m de retina.

Ejemplo 9: sistemas modelo relacionados con la degeneración macular

Las moléculas descritas en este documento se prueban en el siguiente modelo animal de neovascularización coroidea (CNV). Esta característica de la AMD húmeda se induce en animales modelo mediante tratamiento con láser.

A) Modelo de ratón

Inducción de neovascularización coroidea (CNV): la neovascularización coroidea (CNV), un sello distintivo de la AMD húmeda, se desencadena por fotocoagulación con láser (532 nm, 200 mW, 100 ms, 75 μ m) (OcuLight GL, Iridex, Mountain View, CA), realizado en ambos ojos de cada ratón el día 0 por un solo individuo enmascarado a la asignación del grupo de fármacos. Los puntos de láser se aplican de manera estandarizada alrededor del nervio óptico, usando un sistema de suministro de lámpara de hendidura y un cubreobjetos como lente de contacto.

Evaluación: para la evaluación, los ojos se enuclean y se fijan con paraformaldehído al 4 % durante 30 min a 4 °C. La retina neurosensorial se desprende y se separa del nervio óptico. El resto del complejo RPE-coroides-esclerótica se monta en plano en Immu-Mount (medio de montaje Vectashield, Vector) y se cubre con un cubreobjetos. Los montajes planos se examinan con un microscopio confocal láser de barrido (TCS SP, Leica, Alemania). Los vasos se visualizan excitando con láser de argón azul. El área de fluorescencia relacionada con la CNV se mide mediante análisis de imágenes

computarizado usando el software Leica TCS SP. La suma de toda el área fluorescente en cada sección horizontal se usa como índice para el volumen de CNV.

B) Modelo de primates no humanos

5 Inducción de CNV: la neovascularización coroidea (CNV) se induce en monos *Cynomolgus* machos mediante tratamiento con láser perimacular de ambos ojos antes de la administración de la dosis. Los parámetros aproximados del láser fueron los siguientes: tamaño del punto: 50-100 μm de diámetro; potencia del láser: 300-700 milivatios; tiempo de exposición: 0.1 segundos.

10 Tratamiento: Inmediatamente después del tratamiento con láser, ambos ojos de todos los animales se someten a una única inyección intravítreo. El ojo izquierdo recibe una dosis de ARNip estabilizado sintético contra RTP801, mientras que el ojo contralateral recibe PBS (vehículo).

Las moléculas descritas en este documento se prueban en los modelos animales anteriores de degeneración macular, en los que se muestra que las moléculas de ARNip de RTP801 son eficaces en el tratamiento de la degeneración macular.

Ejemplo 10: sistemas modelo relacionados con trastornos microvasculares

15 Las moléculas descritas en este documento se prueban en modelos animales de una variedad de trastornos microvasculares como se describe a continuación.

1. Retinopatía diabética

20 El DDIT4 (RTP801) promueve la apoptosis de células neuronales y la generación de especies reactivas de oxígeno in vitro. El cesionario de la solicitud actual también encontró que en ratones con deficiencia genética (KO) RTP801 sometidos al modelo de retinopatía del prematuro (ROP), la neovascularización patológica NV se redujo en condiciones hipóxicas, a pesar de las elevaciones en VEGF, mientras que la falta de este gen no influyó en la NV retiniana neonatal fisiológica. Además, en este modelo, la falta de RTP801 también protegió contra la apoptosis neuronal hipóxica y la vaso-obliteración hiperóxica.

25 Experimento 1: Se induce diabetes en ratones compañeros de camada RTP801 KO y C57/129sv de tipo salvaje (WT) mediante inyección intraperitoneal de STZ. Después de 4 semanas, se obtiene ERG (destello blanco único, 1.4×10^4 ftc, 5 ms) del ojo izquierdo después de 1 hora de adaptación a la oscuridad. La RVP se evalúa en ambos ojos usando la técnica de permeación de albúmina azul de Evans.

30 Experimento 2: Se induce diabetes en ratones con deficiencia genética para RTP801 y en ratones de control de tipo salvaje con antecedentes genéticos coincidentes. Para la inducción de la diabetes, los ratones se inyectan con estreptozotocina (STZ 90 mg/kg/d durante 2 días después del ayuno nocturno). La fisiología animal se controla durante todo el estudio para detectar cambios en la glucosa en sangre, el peso corporal y el hematocrito. Los ratones inyectados con vehículo sirven como controles. Los animales apropiados se tratan mediante inyecciones intravítreas de ARNip anti-RTP801 o ARNip de control anti-GFP.

35 La fuga vascular retiniana se mide usando la técnica del colorante azul de Evans (EB) en los animales. A los ratones se les implanta un catéter en la vena yugular derecha antes de las mediciones de azul de Evans (EB). Las mediciones de la permeabilidad retiniana en ambos ojos de cada animal siguen un protocolo estándar de azul de Evans.

Retinopatía del prematuro

40 La retinopatía del prematuro se induce exponiendo a los animales de prueba a condiciones hipóxicas e hiperóxicas y, posteriormente, probando los efectos sobre la retina. Los resultados muestran que los ratones RTP801 (DDIT4) KO están protegidos de la retinopatía del prematuro, validando así el efecto protector de la inhibición de DDIT4.

45 Condiciones isquémicas microvasculares

Los modelos animales útiles para evaluar las condiciones isquémicas incluyen:

1. Lesión cerrada en la cabeza (CHI) - La TBI experimental produce una serie de eventos que contribuyen a las cascadas neurológicas y neurometabólicas, las cuales están relacionadas con el grado y extensión de los déficits conductuales. La CHI se induce bajo anestesia, mientras se deja que un peso caiga libremente desde una altura prefijada (Chen et al., J. Neurotrauma 13, 557, 1996) sobre el cráneo expuesto que cubre el hemisferio izquierdo en el plano coronal medio.

50 2. Oclusión transitoria de la arteria cerebral media (MCAO): se realiza una isquemia focal transitoria de 90 a 120 minutos en ratas Sprague Dawley macho adultas, 300-370 gr. El método empleado es la sutura intraluminal MCAO (Longa et al., Stroke, 30, 84, 1989, y Dogan et al., J. Neurochem. 72, 765, 1999). En resumen, bajo anestesia con halotano, se inserta un material de sutura de nailon 3-0 recubierto con Poli-L-Lisina en la arteria carótida interna derecha (ICA) a través de un orificio en la arteria carótida externa. El hilo de nailon se introduce en la ICA hasta el origen de MCA derecha (20-23 mm). 90-120 minutos después, se quita el hilo, se cierra el animal y se deja que se recupere.

3. Oclusión permanente de la arteria cerebral media (MCAO): la oclusión es permanente, inducida unilateralmente por la electrocoagulación de la MCA. Ambos métodos conducen a una isquemia cerebral focal del lado ipsolateral de la corteza cerebral dejando intacto el lado contralateral (control). La MCA izquierda se expone a través de una craneotomía temporal, como se describe para ratas por Tamura A. et al., *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981; 1:53-60. La MCA y su rama lenticulostriatal se ocluyen proximalmente al borde medial del tracto olfatorio con coagulación microbipolar. La herida se sutura y los animales se devuelven a su jaula de origen en una habitación calentada entre 26 °C y 28 °C. La temperatura de los animales se mantiene todo el tiempo con un termostato automático.

5 Las moléculas descritas en este documento se prueban en los modelos animales anteriores de afecciones microvasculares, en los que se muestra que el ARNbc para DDIT4 mejora los síntomas de las afecciones microvasculares.

10 Ejemplo 11: Sistemas modelo para enfermedades y trastornos neurodegenerativos

I. Evaluación de la eficacia de la administración intranasal de moléculas descritas en este documento en el modelo de ratón transgénico APP de la enfermedad de Alzheimer.

15 Animales y tratamiento. El estudio incluye veinticuatro (24) ratones transgénicos APP [V717I] (hembras), un modelo para la enfermedad de Alzheimer (Moechars D. et al., *EMBO J.* 15(6):1265-74, 1996; Moechars D. et al., *Neuroscience.* 91(3):819-30), de 11 meses que se dividen aleatoriamente en dos grupos iguales (Grupo I y Grupo II).

Los animales se tratan con ARNip de administración intranasal (200 - 400 ug/ratón, Grupo I) y vehículo (Grupo II), 2-3 veces a la semana, durante 3 meses.

20 Administración de ARNip. La vía de administración del ARNip es la instilación intranasal, con administración dos veces por semana, a partir de los 30 días de edad.

25 Análisis de la progresión de la enfermedad. Se realiza un análisis conductual y electromiográfico (EMG) en ratones tratados y no tratados para controlar el inicio y la progresión de la enfermedad. Los ratones se prueban previamente antes de comenzar el tratamiento con ARNip, seguido de evaluaciones semanales. Todos los resultados se comparan estadísticamente. Se realizan las siguientes pruebas:

1. Prueba de tanque de natación: esta prueba es particularmente sensible para detectar cambios en la función motora de las extremidades traseras (Raoul et al., 2005. *Nat Med.* 11, 423-428; Towne et al, 2008. *Mol Ther.* 16:1018-1025).

2. Electromiografía: las evaluaciones EMG se realizan en el músculo gastrocnemio de las extremidades traseras, donde se registra el potencial de acción muscular compuesto (CMAP) (Raoul et al., 2005. *supra*).

30 Histopatología post mortem. En el punto final de la enfermedad, los ratones se anestesian de forma terminal y se recogen tejido muscular de la médula espinal y de las extremidades traseras para análisis histológico y bioquímico.

35 Examinar la supervivencia de las neuronas motoras. Se cortan secciones transversales de la médula espinal lumbar usando un criostato y se tiñen con galocianina, una tinción de Nissl. A partir de estas secciones, se cuenta el número de neuronas motoras en la médula espinal lumbar (Kieran et al., 2007. *supra*), para determinar si el tratamiento con ARNip previene la degeneración de las neuronas motoras en ratones SOD1^{G93A}.

Examen de la histopatología de la médula espinal. La degeneración de la neurona motora en ratones SOD1^{G93A} da como resultado astrogliosis y activación de células microgliales. Aquí, usando secciones transversales de la médula espinal lumbar, se examina la activación de astrocitos y células microgliales usando inmunocitoquímica para determinar si el tratamiento de ARNip redujo o previno su activación.

40 Examen de la histología muscular. A continuación, los músculos se procesan histológicamente para examinar la denervación de la placa motora terminal y la atrofia muscular (Kieran et al., 2005. *J Cell Biol.* 169, 561-567).

Lista de secuencias

<110> Quark Pharmaceuticals, Inc.

FEINSTEIN, Elena

AVKIN-NACHUM, Sharon

KALINSKI, Hagar

45 METT, Igor

<120> MOLÉCULAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS BICATENARIOS PARA DDIT4 Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS

<130> 232/PCT1

<150> 61/699,884

<151> 2012-09-12
<160> 44
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
5 <211> 1752
<212> ARN
<213> HomoSapiens
<400> 1

agggcgccagc	aggccaaggg	ggagggugcga	gcguggaccu	gggacggguc	ugggcggcuc	60
ucggugguug	gcacggguuc	gcacacccau	ucaagcggca	ggacgcacuu	gucuuagcag	120
uucucgcuga	ccgcgcuagc	ugcggcuuuc	acgcuccggc	acucugaguu	caucagcaaa	180
cgcgcugggc	ucuguccuca	ccaugccuag	ccuuugggac	cgcuucucgu	cgcgguccac	240
cuccucuuug	ccucucguccu	ugccccgaac	ucccacccca	gaucggccgc	cgcgcucagc	300
cuggggguug	gogacccggg	aggagggguu	ugaccgcucc	acgagccugg	agagcucgg	360
cugcgagucc	cuggacagca	gcaacagugg	cuucggcccg	gaggaagaca	cggcuuaccu	420
ggauggggug	ucguugcccg	acuucgagcu	gcucagugac	ccugaggaug	aacacuugug	480
ugccaaccug	augcagcugc	ugcaggagag	ccuggccag	gcgccggcugg	gcucucgacg	540
ccugcgcgc	cugcugaugc	cuagccaguu	gguaaagccag	gugggcaaag	aacuacugcg	600
ccuggccuac	agcgagccgu	gcggccugcg	ggggccgcug	cuggacgucu	gcguggagca	660
ggcaagagc	ugccacagcg	ugggcccagc	ggcacucgac	cccagccugg	ugcccaccuu	720
ccagcugacc	cucgugcugc	gccuggacuc	acgacucugg	cccaagaucc	aggggcuguu	780
uagcuccgccc	aacucuccu	uccucccugg	cuucagccag	ucccugacgc	ugagcacugg	840
cuuccgaguc	aucaagaaga	agcuguacag	cucggaacag	cugcucauug	aggaguguug	900
aacuucaacc	ugagggggcc	gacagugccc	uccaagacag	agacgacuga	acuuuugggg	960
uggagacuag	aggcaggagc	ugagggacug	auuccugugg	uuggaaaacu	gaggcagcca	1020
ccuaaggugg	agguggggga	auaguguuuc	ccaggaagcu	cauugaguug	ugugccggug	1080
gcugugcauu	ggggacacau	accccucagu	acuguagcau	gaaacaaagg	cuuaggggcc	1140
aacaaggcuu	ccagcuggau	guguguguag	cauguaccuu	auuuuuuuug	uuacugacag	1200
uuaacagugg	ugugacaucc	agagagcagc	ugggcugcuc	ccgccccagc	ccggcccagg	1260
gugaaggaag	aggcacgugc	uccucagagc	agccggaggg	aggggggagg	ucggaggucg	1320
uggaggguggu	uuguguaucu	uacuggucug	aagggaccaa	guguguuugu	uguuuguuuu	1380
guauuuuuuu	uuucugaucg	gagcaucacu	acugaccugu	uguaggcagc	uaucuuacag	1440
acgcaugaaau	guaagaguag	gaaggggugg	gugucaggga	ucacuuggga	ucuuugacac	1500
uugaaaaauu	acaccuggca	gcugcguuua	agccuucccc	caucguguac	ugcagaguug	1560
agcuggcagg	ggagggcug	agaggguggg	ggcuggaacc	ccuccccggg	aggagugcca	1620
ucuggggucuu	ccaucuagaa	cuguuuacau	gaagauaaga	uacucacugu	ucaugaaauac	1680
acuugauguu	caaguuuuaa	gaccuaugca	auauuuuuua	cuuuucuaau	aaacauguuu	1740
guuaaaaacag	uu					1752

<210> 2
<211> 232
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5 <400> 2

Met	Pro	Ser	Leu	Trp	Asp	Arg	Phe	Ser							
1															15
Pro	Ser	Ser	Leu	Pro	Arg	Thr	Pro	Thr	Pro	Asp	Arg	Pro	Pro	Arg	Ser
															30
Ala	Trp	Gly	Ser	Ala	Thr	Arg	Glu	Glu	Gly	Phe	Asp	Arg	Ser	Thr	Ser
															45
Leu	Glu	Ser	Ser	Asp	Cys	Glu	Ser	Leu	Asp	Ser	Ser	Asn	Ser	Gly	Phe
															60
Gly	Pro	Glu	Glu	Asp	Thr	Ala	Tyr	Leu	Asp	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Asp
															80
Phe	Glu	Leu	Leu	Ser	Asp	Pro	Glu	Asp	Glu	His	Leu	Cys	Ala	Asn	Leu
															95
Met	Gln	Leu	Leu	Gln	Glu	Ser	Leu	Ala	Gln	Ala	Arg	Leu	Gly	Ser	Arg
															110
Arg	Pro	Ala	Arg	Leu	Leu	Met	Pro	Ser	Gln	Leu	Val	Ser	Gln	Val	Gly
															125

ES 2 872 349 T3

Lys Glu Leu Leu Arg Leu Ala Tyr Ser Glu Pro Cys Gly Leu Arg Gly
130 135 140

Ala Leu Leu Asp Val Cys Val Glu Gln Gly Lys Ser Cys His Ser Val
145 150 155 160

Gly Gln Leu Ala Leu Asp Pro Ser Leu Val Pro Thr Phe Gln Leu Thr
165 170 175

Leu Val Leu Arg Leu Asp Ser Arg Leu Trp Pro Lys Ile Gln Gly Leu
180 185 190

Phe Ser Ser Ala Asn Ser Pro Phe Leu Pro Gly Phe Ser Gln Ser Leu
195 200 205

Thr Leu Ser Thr Gly Phe Arg Val Ile Lys Lys Lys Leu Tyr Ser Ser
210 215 220

Glu Gln Leu Leu Ile Glu Glu Cys
225 230

<210> 3
<211> 18
5 <212> ARN
<213> artificial
<220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 3
10 cccucaguac uguagcau 18
<210> 4
<211> 18
<212> ARN
<213> artificial
15 <220>
<223> Sintetizado químicamente
<400> 4
ggcagcuauc uuacagac 18
<210> 5
20 <211> 18
<212> ARN

<213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 5
 5 agagcucgga cugcgagu 18
 <210> 6
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 6
 gggucuuucca ucuagaac 18
 <210> 7
 15 <211> 18
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 20 <400> 7
 gguggagacu agaggcag 18
 <210> 8
 <211> 18
 <212> ARN
 25 <213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 8
 ccuccaagac agagacga 18
 30 <210> 9
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 35 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 9

	ggaagcuau ugaguugu	18
	<210> 10	
	<211> 18	
	<212> ARN	
5	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Sintetizado químicamente	
	<400> 10	
	gcagcugcgu uuaagccu	18
10	<210> 11	
	<211> 18	
	<212> ARN	
	<213> artificial	
	<220>	
15	<223> Sintetizado químicamente	
	<400> 11	
	caguacugua gcaugaaa	18
	<210> 12	
	<211> 18	
20	<212> ARN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Sintetizado químicamente	
	<400> 12	
25	augcuacagu acugaggg	18
	<210> 13	
	<211> 18	
	<212> ARN	
	<213> artificial	
30	<220>	
	<223> Sintetizado químicamente	
	<400> 13	
	gucuguaaga uagcugcc	18
	<210> 14	
35	<211> 18	
	<212> ARN	

<213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 14

5 acucgcaguc cgagcucu 18
 <210> 15
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 15
 guucuagaug gaagaccc 18
 <210> 16

15 <211> 18
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

20 <400> 16
 cugccucuag ucuccacc 18
 <210> 17
 <211> 18
 <212> ARN

25 <213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 17
 ucgucucugu cuuggagg 18

30 <210> 18
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>

35 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 18

	acaacucaau gagcuucc	18
	<210> 19	
	<211> 18	
	<212> ARN	
5	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Sintetizado químicamente	
	<400> 19	
	aggcuuaaac gcagcugc	18
10	<210> 20	
	<211> 18	
	<212> ARN	
	<213> artificial	
	<220>	
15	<223> Sintetizado químicamente	
	<400> 20	
	uuucaugcua caguacug	18
	<210> 21	
	<211> 19	
20	<212> ARN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Sintetizado químicamente	
	<400> 21	
25	ccucaguac uguagcuaa	19
	<210> 22	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> artificial	
30	<220>	
	<223> Sintetizado químicamente	
	<400> 22	
	ggcagcuauc uuacagaca	19
	<210> 23	
35	<211> 19	
	<212> ARN	

	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Sintetizado químicamente	
	<400> 23	
5	agagcucgga cugcagua	19
	<210> 24	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> artificial	
10	<220>	
	<223> Sintetizado químicamente	
	<400> 24	
	gggucuucca ucuagaaca	19
	<210> 25	
15	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Sintetizado químicamente	
20	<400> 25	
	gguggagacu agagcaga	19
	<210> 26	
	<211> 19	
	<212> ARN	
25	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Sintetizado químicamente	
	<400> 26	
	ccuccaagac agagacgaa	19
30	<210> 27	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> artificial	
	<220>	
35	<223> Sintetizado químicamente	
	<400> 27	

	ggaagcuau ugaguugua	19
	<210> 28	
	<211> 19	
	<212> ARN	
5	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Sintetizado químicamente	
	<400> 28	
	gcagcugcgu uuaagccua	19
10	<210> 29	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> artificial	
	<220>	
15	<223> Sintetizado químicamente	
	<400> 29	
	caguacugua gcaugaaau	19
	<210> 30	
	<211> 19	
20	<212> ARN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Sintetizado químicamente	
	<400> 30	
25	uaugcuacag uacugaggg	19
	<210> 31	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> artificial	
30	<220>	
	<223> Sintetizado químicamente	
	<400> 31	
	ugucuguaag auagcugcc	19
	<210> 32	
35	<211> 19	
	<212> ARN	

<213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 32

5 uacucgcagu ccgagcucu 19
 <210> 33
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 33
 uguucuagau ggaagaccc 19
 <210> 34

15 <211> 19
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

20 <400> 34
 ucugccucua gucuccacc 19
 <210> 35
 <211> 19
 <212> ARN

25 <213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 35
 uucgucucug ucuuggagg 19

30 <210> 36
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>

35 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 36

	uacaacucaa ugagcuucc	19
	<210> 37	
	<211> 19	
	<212> ARN	
5	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Sintetizado químicamente	
	<400> 37	
	uaggcuuaaa cgcacugc	19
10	<210> 38	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> artificial	
	<220>	
15	<223> Sintetizado químicamente	
	<400> 38	
	auuucaugcu acaguacug	19
	<210> 39	
	<211> 19	
20	<212> ARN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Sintetizado químicamente	
	<400> 39	
25	ccucaguacu guagcauga	19
	<210> 40	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> artificial	
30	<220>	
	<223> Sintetizado químicamente	
	<400> 40	
	cucaguacug uagcaugaa	19
	<210> 41	
35	<211> 19	
	<212> ARN	

<213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 41
 5 uacuguagca ugaaacaaa 19
 <210> 42
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 42
 ucaugcuaca guacugagg 19
 <210> 43
 15 <211> 19
 <212> ARN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 20 <400> 43
 uucaugcuac aguacugag 19
 <210> 44
 <211> 19
 <212> ARN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 44
 30 uuuguuucau gcuacagua 19

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico bicatenario capaz de regular negativamente la expresión de ARNm de DDIT4 (SEQ ID NO: 1) que tiene la estructura (A2) que se establece a continuación:

(A2) 5' N¹-(N)x-Z 3' (hebra antisentido)

5 3' Z'-N²-(N')y-z" 5' (hebra sentido)

en la que cada uno de N², N y N' es un ribonucleótido modificado o no modificado, o una unidad estructural no convencional;

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

10 en la que cada uno de x y y es 18;

en la que N² está unido covalentemente a (N')y;

en la que N¹ está unido covalentemente a (N)x y se empareja erróneamente con el ARNm de DDIT4 (SEQ ID NO: 1), y se selecciona del grupo que consiste en: uridina natural o modificada, y

desoxirribouridina;

15 en la que z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es una unidad estructural de protección o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 5' de N2-(N')y;

en la que cada uno de Z y Z' está presente o ausente independientemente, pero si está presente tiene independientemente 1-5 nucleótidos consecutivos, unidades estructurales no nucleótidos, unidades estructurales no convencionales o una combinación de los mismos o una unidad estructural de fármaco o vitamina unida covalentemente en el terminal 3' de la hebra en la que está presente;

20 en la que la secuencia de (N')y es complementaria a la secuencia de (N)x; y en la que la secuencia de N²-(N')y comprende una hebra sentido y N¹-(N)x comprende una hebra antisentido expuesta en el par de oligonucleótidos SEQ ID NOS: 21 y 30.

2. La molécula de ácido nucleico bicatenario de la reivindicación 1, que tiene la estructura

5' UAUGCACAGUACUGAGGG -Z 3' (SEQ ID NO:30 antisentido)



3' Z'-AUACGAUGUCAUGACUCCC – z" 5' (SEQ ID NO:21 sentido)

25 en la que cada uno de A, C, G, U es independientemente un ribonucleótido modificado o no modificado, o una unidad estructural no convencional;

en la que cada "l" representa el apareamiento de bases entre los ribonucleótidos/unidades estructurales no convencionales;

30 en la que cada uno de Z y Z' está presente o ausente independientemente, pero si está presente tiene independientemente 1-5 nucleótidos consecutivos, unidades estructurales no nucleótidos, unidades estructurales no convencionales o una combinación de los mismos o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 3' de la hebra en la cual está presente; y

35 en la que z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es una unidad estructural de protección o una unidad estructural conjugada unida covalentemente en el terminal 5' de N2-(N')y; o una

sal farmacéuticamente aceptable de tal molécula.

3. La molécula de ácido nucleico bicatenario de la reivindicación 2, en la que la hebra antisentido (SEQ ID NO: 30) comprende una o más pirimidinas y/o purinas modificadas con 2'OMe azúcar, un 2'-5' ribonucleótido en la posición 5, 6, 7 u 8, y un saliente de nucleótido o no nucleótido terminal 3'.

4. La molécula de ácido nucleico bicatenario de la reivindicación 2, en la que la hebra antisentido (SEQ ID NO: 30) comprende ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones (5'>3') 1, 3, 8, 11 y 15, un 2'-5' ribonucleótido en la posición 6, y una unidad estructural C3Pi-C3OH o C3Pi-C3Pi unida covalentemente al terminal 3'.

5. La molécula de ácido nucleico bicatenario de la reivindicación 2 o 3, en la que la hebra sentido (SEQ ID NO: 21) comprende una o más 2'OMe pirimidina, una unidad estructural de nucleótido o no nucleótido unida covalentemente en el terminal 3' y una unidad estructural de protección unida covalentemente en el terminal 5'.

10. La molécula de ácido nucleico bicatenario de la reivindicación 5, en la que la hebra sentido (SEQ ID NO: 21) comprende ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones (5'>3') 16 y 18, una unidad estructural C3OH o C3Pi unida covalentemente en el terminal 3'; y una unidad estructural de protección unida covalentemente en el terminal 5', en la que la unidad estructural de protección se selecciona del grupo que consiste en: una unidad estructural de desoxirribonucleótido abásica invertida, una unidad estructural amino C6 y una unidad estructural THNB.

15. La molécula de ácido nucleico bicatenario de la reivindicación 5, en la que la hebra sentido (SEQ ID NO: 21) comprende ribonucleótidos enlazados 2'-5' en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19, una unidad estructural C3OH o C3Pi unida covalentemente en el terminal 3' y, opcionalmente, una unidad estructural de protección unida covalentemente en el terminal 5'.

20. La molécula de ácido nucleico bicatenario de la reivindicación 2 o 3, en la que la hebra antisentido (SEQ ID NO: 30) comprende ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones (5'>3') 1, 3, 8, 11 y 15, un 2'-5' ribonucleótido en la posición 6, y una unidad estructural C3Pi-C3Pi unida covalentemente al terminal 3'; y la hebra sentido (SEQ ID NO: 21) comprende ribonucleótidos modificados con 2'OMe azúcar en las posiciones (5'>3') 16 y 18, un saliente terminal C3Pi 3'; y una unidad estructural de desoxirribonucleótido abásica invertida unida covalentemente en el terminal 5'.

25. La molécula de ácido nucleico bicatenario de la reivindicación 1, en la que cada uno de (N)x y (N')y comprende al menos un ribonucleótido de pirimidina modificado con 2'-O-metil azúcar.

30. La molécula de ácido nucleico bicatenario de la reivindicación 9, en la que z" está presente y se selecciona del grupo que consiste en una unidad estructural de ribosa abásica, unidad estructural de desoxiribosa abásica, modificaciones de ribosa abásica y unidades estructurales de desoxiribosa abásica que incluyen modificaciones de alquilo 2'O; unidades estructurales de ribosa abásica y desoxiribosa abásica invertidas y modificaciones de los mismos; C6-imino-Pi; un nucleótido espejo que incluye L-ADN y L-ARN; nucleótido 5'OMe; y análogos de nucleótidos que incluyen 4', 5'-nucleótido de metileno; 1-(β-D-eritrofuranosil) nucleótido; 4'-tio nucleótido, nucleótido carbocíclico; 5'-aminoalquil fosfato; 1,3-diamino-2-propil fosfato, 3-aminopropil fosfato; 6-aminohexil fosfato; 12-aminododecil fosfato; hidroxipropil fosfato; nucleótido 1,5-anhidrohexitol; nucleótido alfa; nucleótido treo-pentofuranosilo; nucleótido 3', 4'-seco acílico; nucleótido 3,4-dihidroxibutilo; nucleótido 3,5-dihidroxipentilo, unidad estructural abásica 5'-5'-invertido; fosfato de 1,4-butanodiol; 5'-amino; metilfosfonato puente o no puente, unidades estructurales 5'-mercaptopo o una unidad estructural fenil hidrocarbilo, por ejemplo THNB; y/o en la que Z' comprende una unidad estructural C3Pi; y/o en la que Z comprende una unidad estructural C3Pi-C3Pi.

35. La molécula de ácido nucleico bicatenario de la reivindicación 9, en la que la molécula de ácido nucleico comprende una o más nucleobases modificadas; y en la que dicha una o más nucleobases modificadas se seleccionan independientemente del grupo que consiste en xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 5- tiouracilo y citosina, 5-propenil uracilo y citosina, 6-aza uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, amino, tiol, tioalquilo, hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina, análogo de pirazolotriazina y aciclonucleótidos; y/o en la que la molécula de ácido nucleico comprende una o más modificaciones del esqueleto del fosfodiéster, dicha una o más modificaciones del esqueleto del fosfodiéster se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: un fosforotioato, 3'-(o 5')-desoxi-3'-(o 5')-tio-fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenatos, 3'-(o 5')-desoxi fosfinatos, boranofosfatos, 3'-(o 5')-desoxi-3'-(o 5') amino fosforamidatos, hidrogenofosfonatos, ésteres de boranofosfato, fosforamidatos, alquil o arilfosfonatos y enlaces fosfotriéster.

40. La molécula de ácido nucleico bicatenario de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que una o ambas de la hebra sentido y/o hebra antisentido comprenden 1-5 desoxirribonucleótidos, 1-5 unidades estructurales no nucleótidos, 1-5 unidades estructurales no convencionales o una combinación de las mismas unidas covalentemente en el terminal 3' de la hebra sentido, la hebra antisentido o tanto la hebra sentido como la hebra antisentido; y/o en la que una o ambas de la hebra sentido y/o la hebra antisentido comprenden un grupo fosfato en el terminal 5'; y/o en la que una o ambas de la hebra sentido y/o la hebra antisentido comprenden un grupo fosfato en el terminal 3'.

45. Una composición que comprende la molécula de ácido nucleico bicatenario de cualquiera de las reivindicaciones 1-12; y un portador farmacéuticamente aceptable.

50. La composición de la reivindicación 13 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto en el que la expresión del gen DDIT4 está asociada con la etiología o progresión de la enfermedad o trastorno.

FIGURA 1A

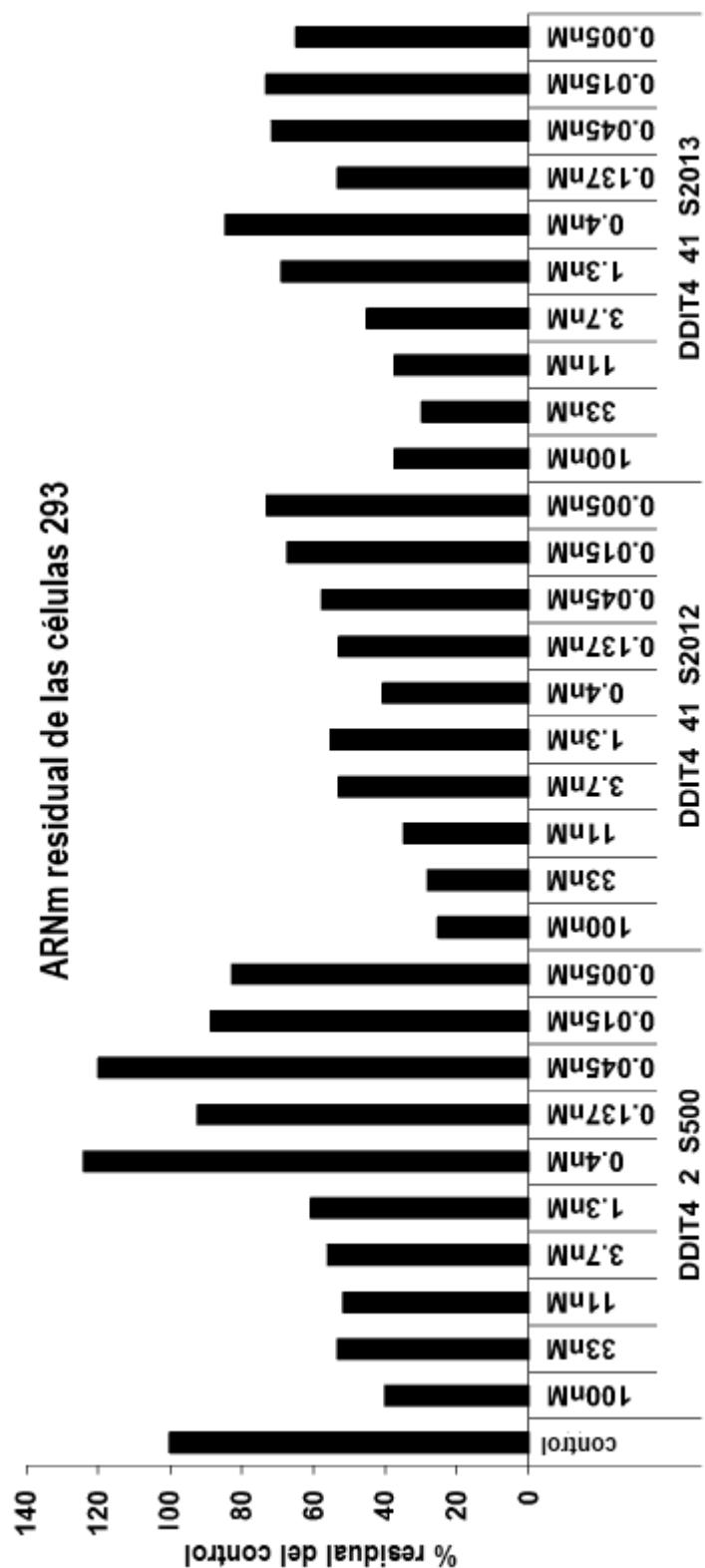


FIGURA 1B

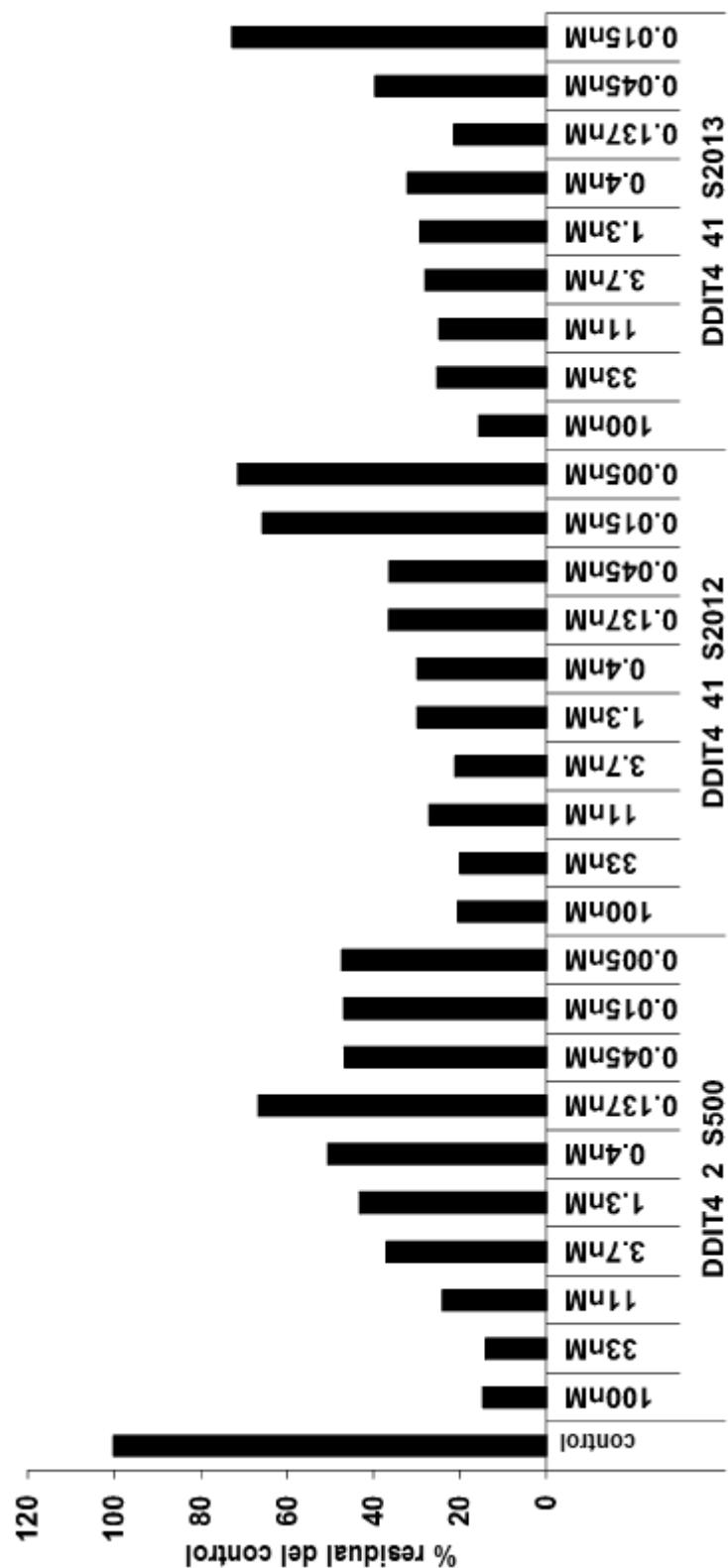


FIGURA 1C

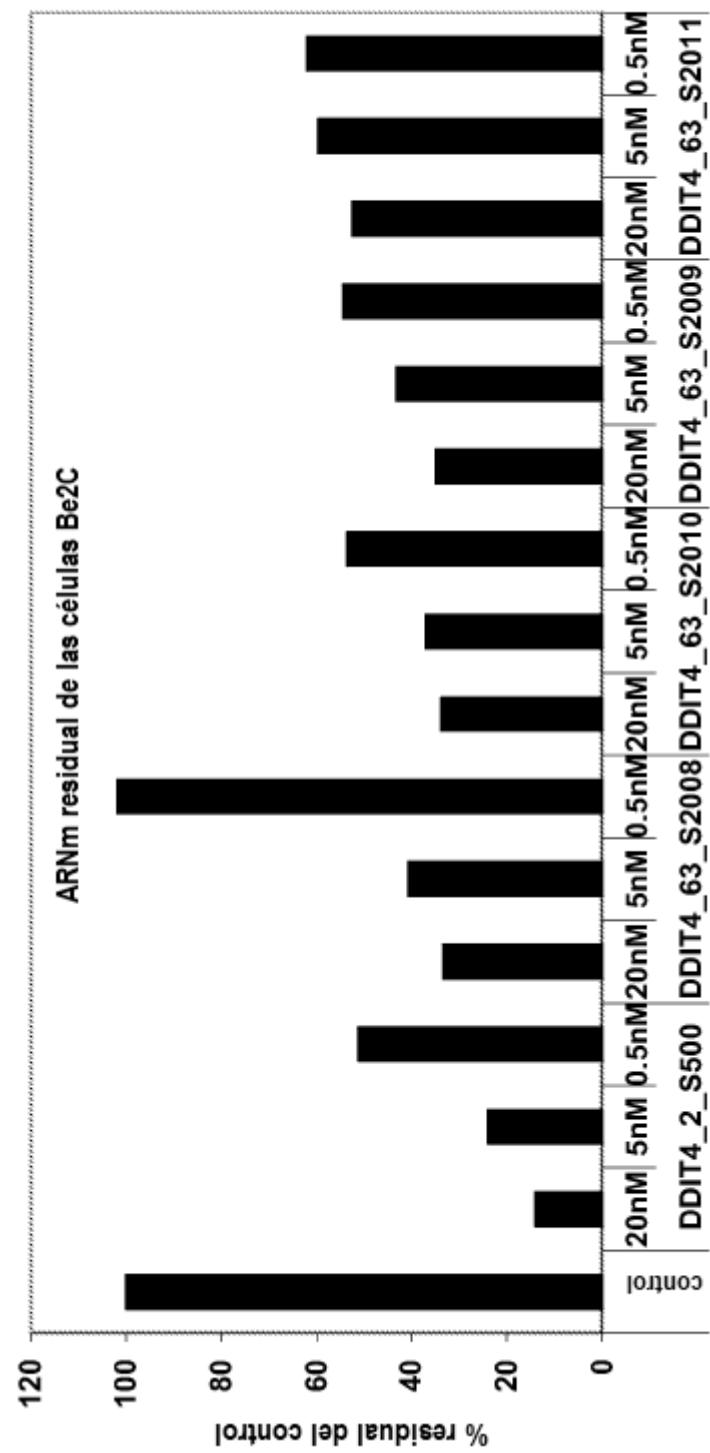


FIGURA 1D

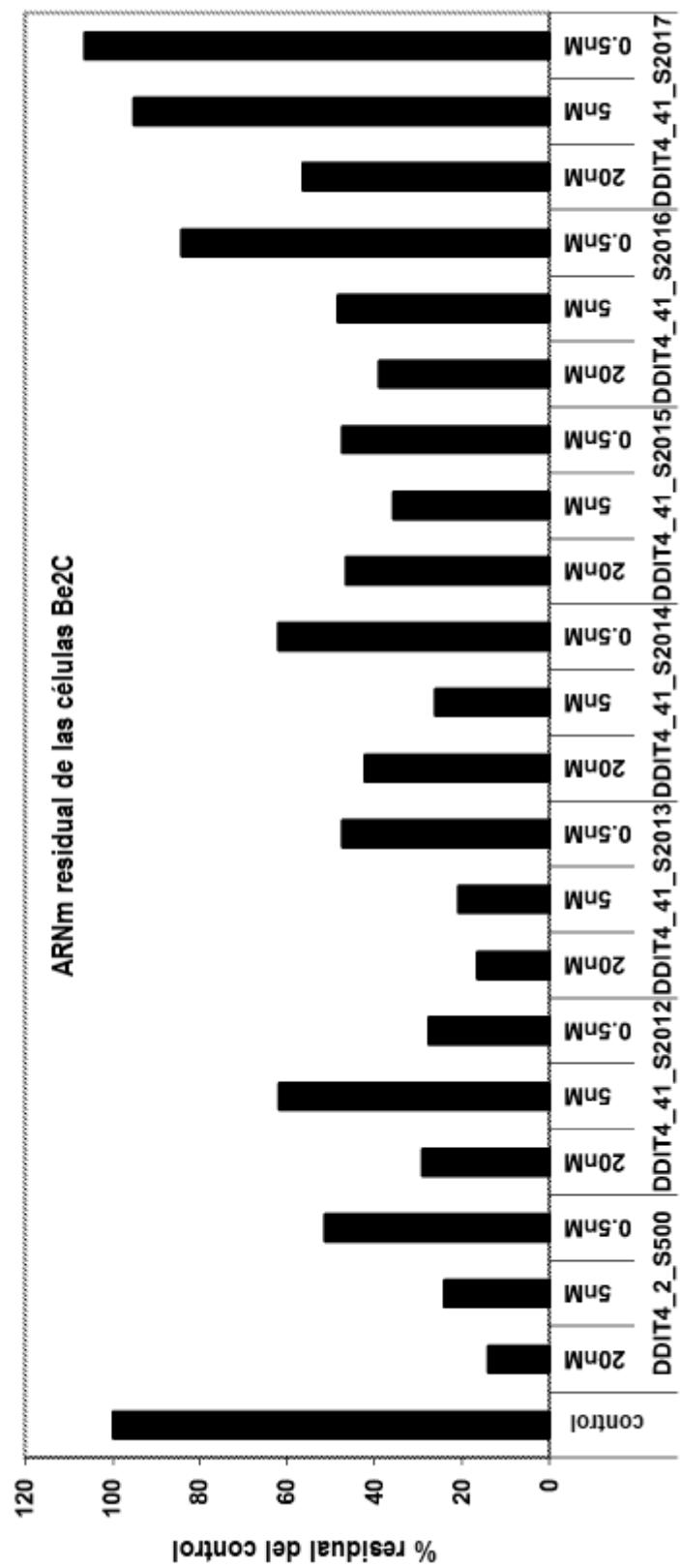


FIGURA 1E

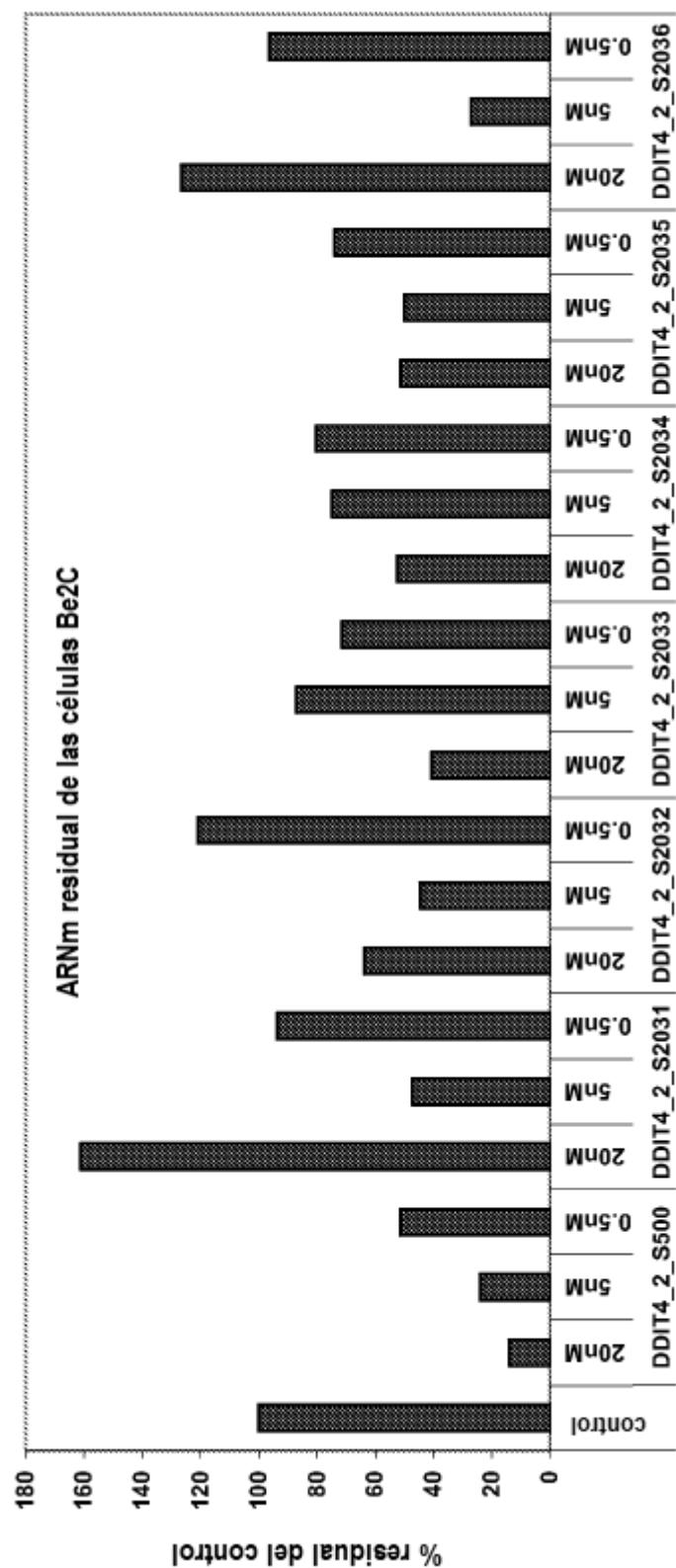


FIGURA 1F

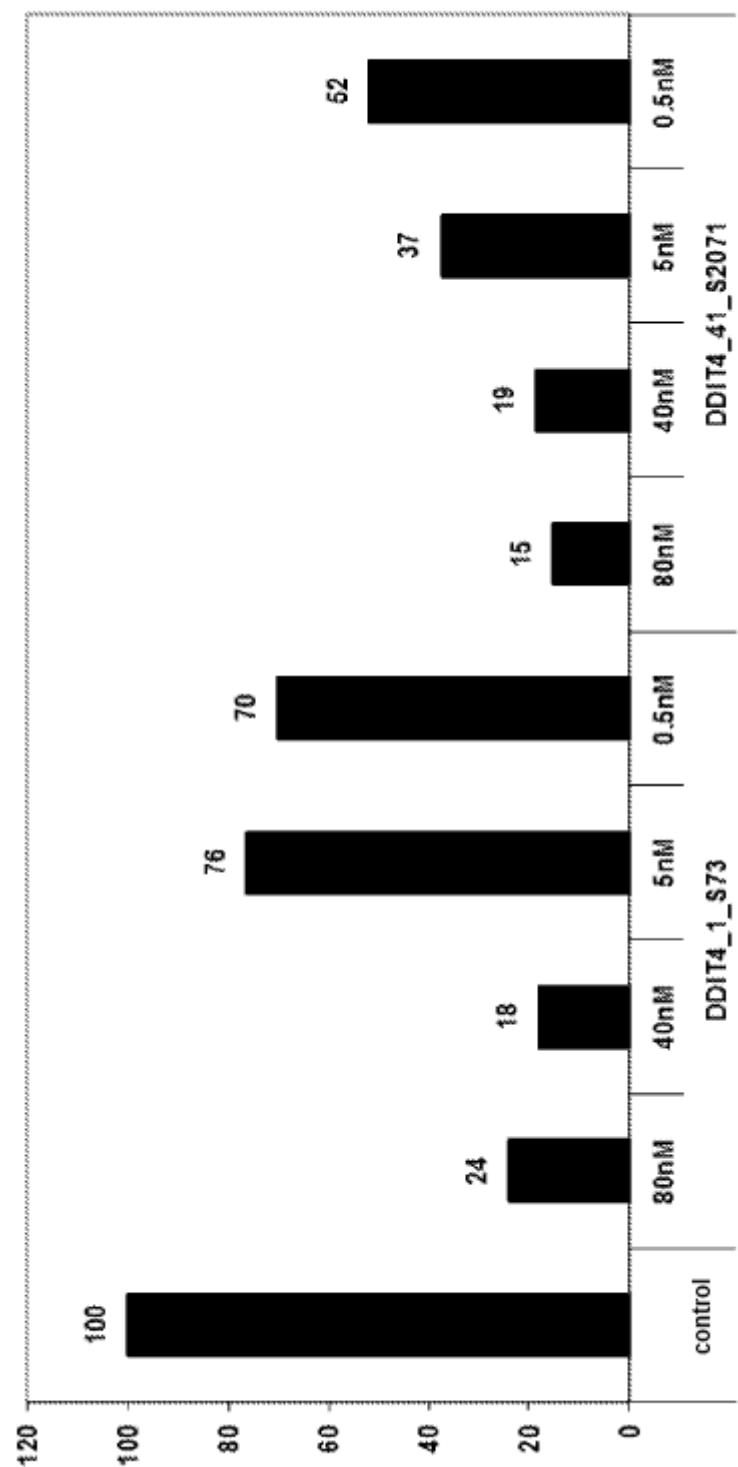


FIGURA 2

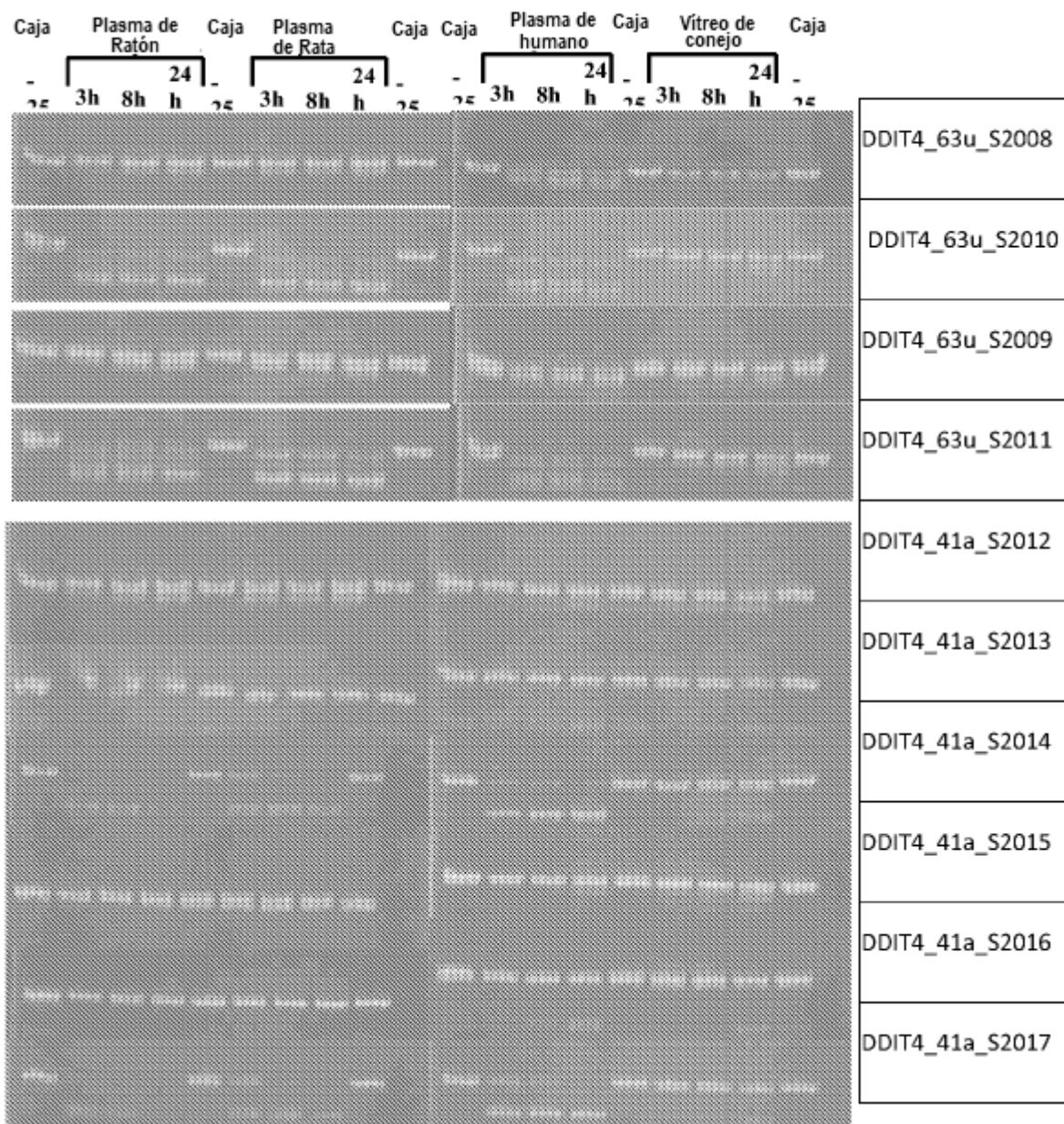


FIGURA 3A

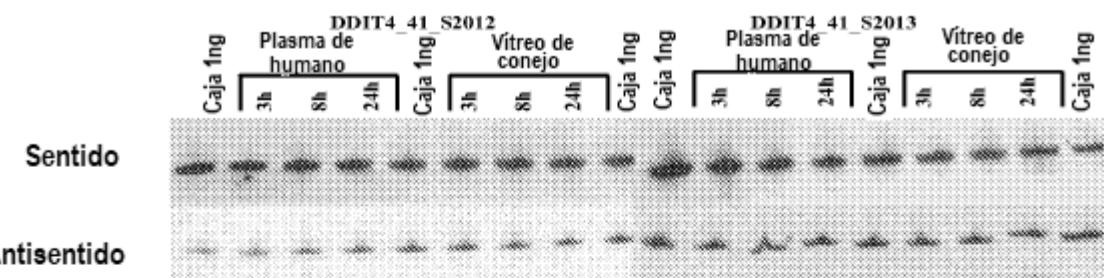


FIGURA 3B

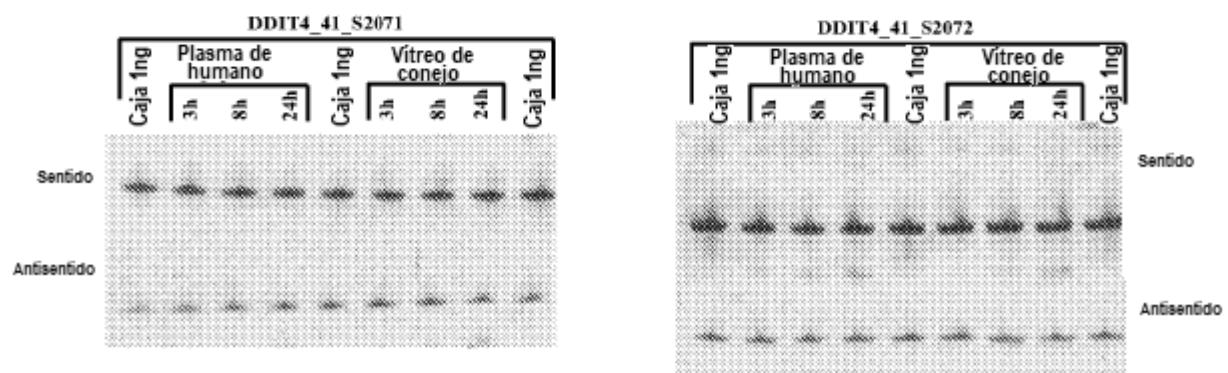


FIGURA 3C

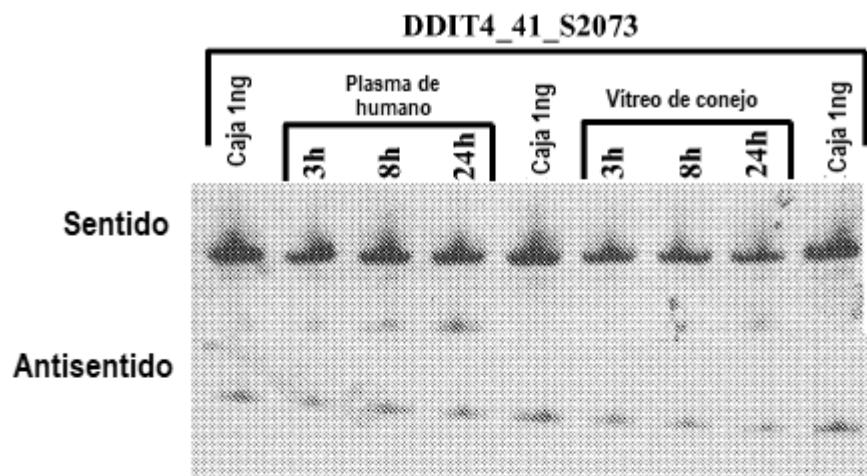


FIGURA 3D

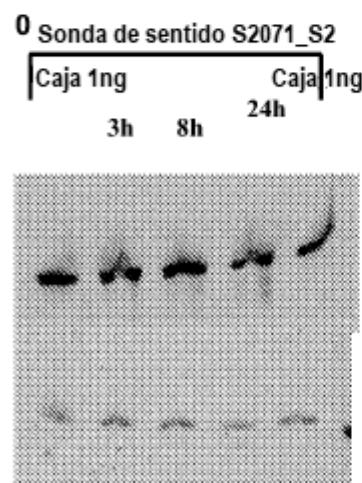


FIGURA 4A

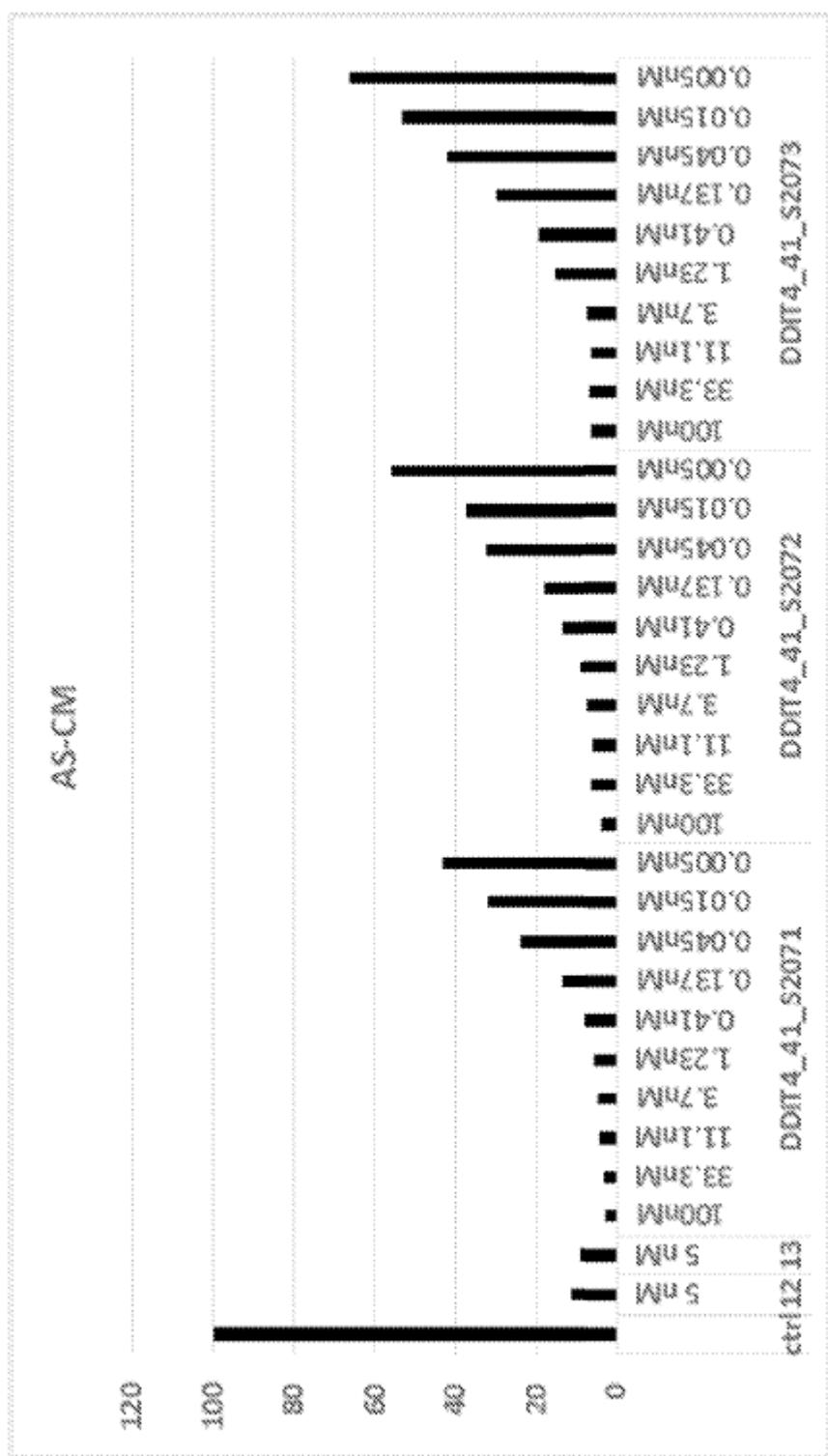


FIGURA 4B

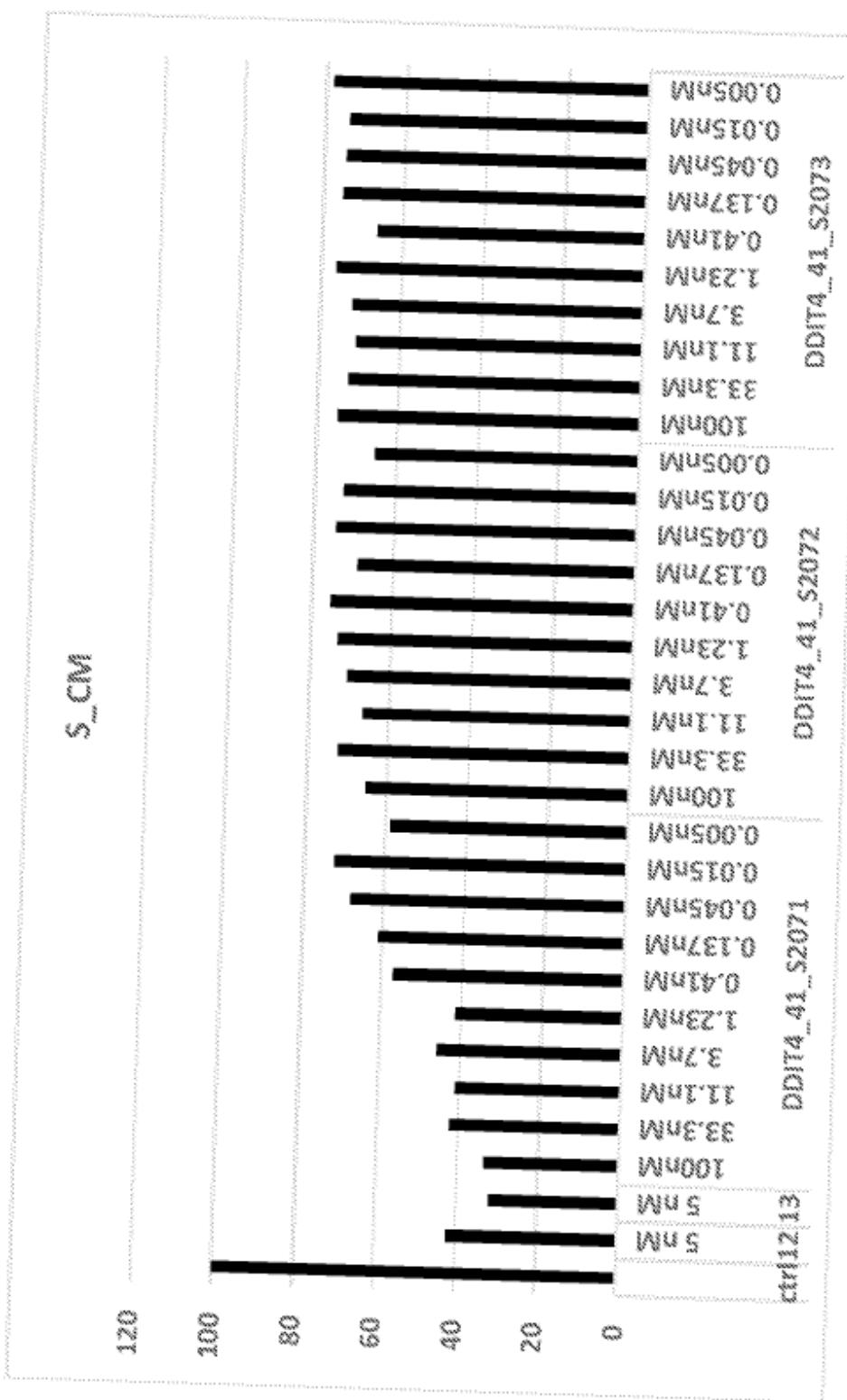


FIGURA 5A

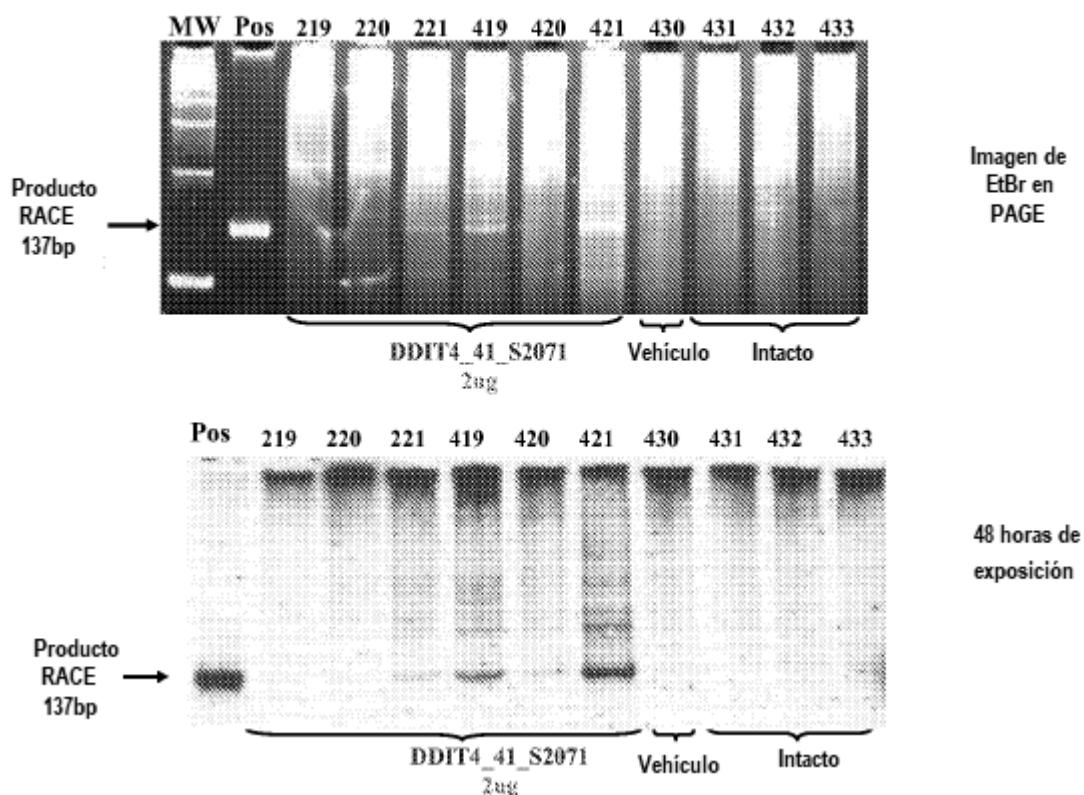


FIGURA 5B

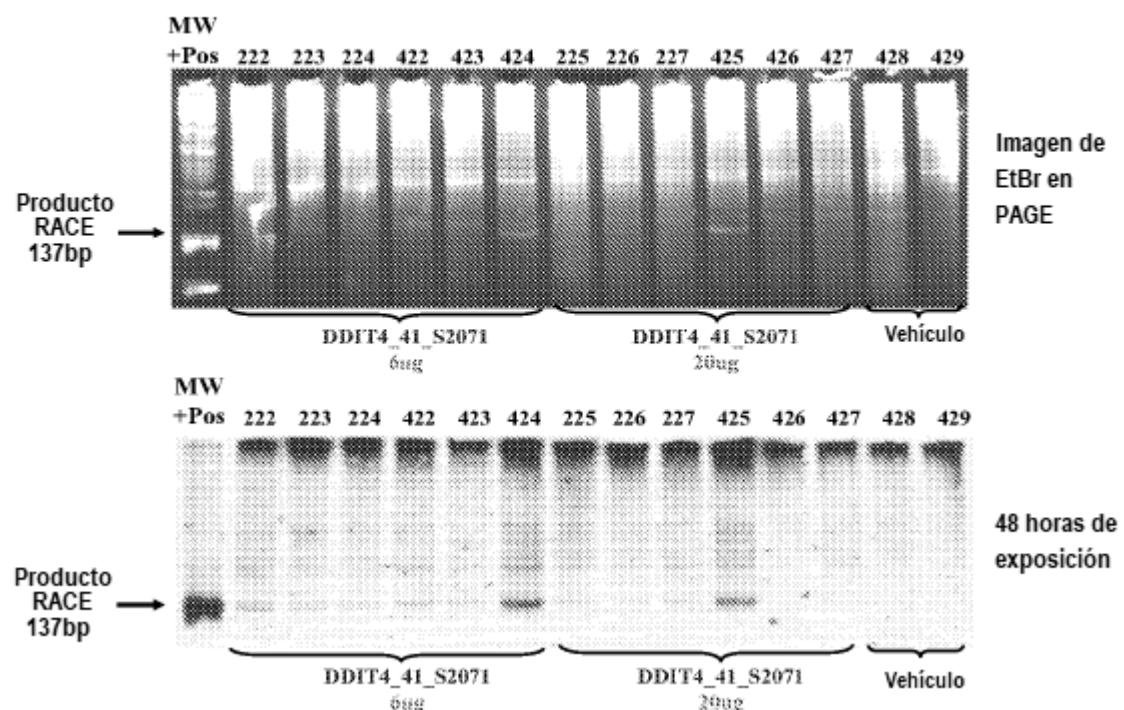


FIGURA 5C

