



No. 10-048045- -00007-0000

Fecha: 2013-02-20 16:35:51

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 523 RESPUESTA

Dep. 2020 DIR.NUEVASCREA

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 63

Señor Director
DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Evento : 378
Actuación : 444

Referencia : Expediente No. 10.048.045
Asunto : Solicitud de patente para: **ARN BICATENARIO CON LÍPIDO
MODIFICADO QUE TIENE UN POTENTE EFECTO DE
INTERFERENCIA DEL ARN**
Solicitante : **NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE
AND TECHNOLOGY AND OTSUKA PHARMACEUTICAL CO.,
LTD**
Fecha de Solicitud : 23 de abril de 2010

1. Yo, Luz Clemencia DE PÁEZ, en mi condición de apoderada de la sociedad solicitante de la patente de la referencia, me refiero al oficio No. **18324** notificado por fijación en lista el 16 de octubre de 2012.

2. Mediante memorial del 9 de enero de 2013 se solicitó oportunamente plazo para responder la acción oficial. Mediante oficio No. **18324** se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Las observaciones realizadas en el oficio se refieren a las reivindicaciones 13 y 14 por revelar materia que esta exceptuada de patentabilidad, la claridad de las reivindicaciones 1, 9 y 12, y a la novedad de las reivindicaciones 1-12 en vista del documento **D1**: WO2007022470 y **D2**: WO2004065601.

3. **Respuesta a las objeciones**

De este modo y con el objeto de atender las objeciones arriba mencionadas, se desea presentar las siguientes modificaciones, aclaraciones y argumentos:

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel. (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax in U.S.A.: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 652 - Tel. (57-4) 604 4794 Ext. 6729 / 6731 - Fax: (57-4) 604 4731 - COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

3.1 Modificación de una solicitud en trámite

De acuerdo con el artículo 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, donde se establece que la modificación de una solicitud es posible en cualquier momento del trámite mientras no implique una ampliación de la solicitud inicial, me permito presentar un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 12 reivindicaciones, junto con un nuevo capítulo descriptivo.

El nuevo capítulo descriptivo sufrió las siguientes modificaciones:

- Se eliminaron las reivindicaciones 13 y 14,
- La reivindicación 9 se incluyó en la reivindicación 1, para definir las características del lípido que modifica la molécula de ARN. Así mismo se modificaron los términos de "cadena anticodificante" y "cadena codificante" con el fin de brindar mayor claridad al objeto de invención.
- La nueva reivindicación 11 (antigua reivindicación 12), hace referencia a la composición farmacéutica, definiendo las proporciones de sus componentes dentro del sistema.
- La nueva reivindicación 12, define con exactitud los compuestos de uno de los componentes de la composición farmacéutica.

En la descripción también se modificaron los conceptos de "cadena anticodificante" y "cadena codificante", en las páginas 7-8 y 14-16, en donde se definen dichos términos.

A partir de estos cambios tanto en el capítulo descriptivo como el pliego reivindicatorio, se ven superadas las objeciones con respecto a claridad y materia no patentable (incluyendo usos).

3.2 Observaciones con respecto a la falta de novedad

De acuerdo con el artículo 16, de la Decisión 486 de la Comunidad Andina, el cual se refiere a la novedad de la invención, señala:

Artículo 16: Una invención se considerará nueva cuando no esté comprendida en el estado de la técnica.

“El estado de la técnica comprenderá todo lo que haya sido accesible al público por una descripción escrita u oral, utilización, comercialización o cualquier otro medio antes de la fecha de presentación de la solicitud de patente, o en su caso, de la prioridad reconocida.

Se sabe que el método mediante el cual se evalúa la novedad de una invención, es a través de la comparación uno a uno de sus características esenciales. De este modo, para que una invención se objete por novedad, es porque sus características esenciales son exactamente iguales a las del estado de la técnica más cercano. Por lo tanto en caso que llegue a existir al menos una diferencia entre dicha comparación, se afirma que la invención SI cumple con el requisito de novedad.

Se demuestra la novedad de la presente invención sobre los documentos del estado de la técnica: D1 y D2, en vista de que ninguno de los anteriores divulga específicamente en sus enseñanzas, la molécula de ARN modificada con un ácido graso. Si comparamos las moléculas de ARN modificadas con colesterol, como se refleja en D1 y D2, tenemos que la estructura química de éste difiere con la de los ácidos grasos, ya que mientras el colesterol, es un lípido esteroide, en una combinación de hidrocarburos cíclicos, los ácidos grasos son cadenas hidrocarbonadas lineales, factor que implica de inmediato que los compuestos presentan propiedades químicas diferentes.

Dicha afirmación se pudo demostrar a partir de un ensayo experimental, con diferentes moléculas de ARN conocidas en el estado de la técnica (resultados en Anexo) y la aquí reivindicada. El primer experimento, en el que se determinó la actividad de luciferasa resultante bajo las siguientes concentraciones de las diferentes moléculas de ARN: siARN: (si 21A2/21B) no modificado, la segunda, una molécula de ARN modificada con colesterol: (si 21A2/Chol/21B) y por último la molécula de ARN modificada con un ácido graso: (si 21A2-C16/21B) (gráfica 1-Anexo 3). En un segundo experimento, en la determinación de la actividad de la luciferasa, de nuevo se emplearon moléculas de ARN, conocidas en el estado de la técnica, tales como: 27nt dsARN (Ds 27A1/27B) no modificado, 27nt dsARN modificada con colesterol: (Ds 27A1-Chol/27B) y 27nt dsARN

modificada con ácido graso, como se reporta en al presente solicitud: (Ds 27Al-CI61227B) (Ver gráfica 2, Anexo). De los resultados que arrojó dicho experimento, se comprobó la superioridad de la molécula de ARN modificada con ácido graso en el detenimiento de la actividad de un gen específico (actividad de la luciferasa en luciérnagas), en comparación a las otras moléculas. En anterior experimento, corresponde al ejemplo 1, páginas 37-39, del capítulo descriptivo.

Con lo anterior queda demostrada la diferencia tanto estructural como funcional de la molécula de ARN reivindicada con respecto a las reportadas en el estado de la técnica, lo que le otorga su carácter de novedad. Además, el efecto técnico de la presente solicitud demostrado en las pruebas anexas, indican que existe la altura inventiva necesaria para que se le conceda el privilegio solicitado

3.5 Conclusiones

Con el nuevo pliego reivindicatorio, fue posible superar las objeciones de claridad y excepción a la patentabilidad. Con respecto a la novedad de la invención, se realizó una comparación de la molécula de ARN modificada, encontrada en el estado de la técnica con la aquí reivindicada, y se encontró que en el momento de éstas dos diferir en la molécula del lípido que modifica la molécula de ARN, cambia la estructura, las propiedades químicas y por ende los resultados obtenidos. De ésta forma fue posible demostrar la novedad y superioridad de la presente invención con respecto al estado de la técnica

Con lo anterior, se ven satisfechos todos los requisitos imprescindibles para que el presente Despacho otorgue el derecho de patente a la invención de la presente solicitud.

4. Puesto que se ha dado respuesta a todas las objeciones formuladas por el Examinador, se solicita atentamente proceder al otorgamiento de la solicitud de patente. En este sentido, respetuosamente recordamos al Examinador que la patente no podrá ser negada con base en las objeciones diferentes a las expuestas en la acción oficial No. 18324, toda vez que al no haber sido trasladadas a mi representada, dicha decisión violaría tanto el tenor literal del artículo 45 de la Decisión 486 como el derecho constitucional al debido proceso. En este evento, y con base en el inciso 2 del artículo 45, respetuosamente solicitamos al Examinador expedir una nueva acción oficial que permita a mi representada contra argumentar las mismas o modificar la solicitud con el fin de cumplir los requisitos de patentabilidad.

5. ANEXOS

- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 12 reivindicaciones.
- Nuevo capítulo descriptivo (modificación en las páginas: 7-8, 14-16)
- Resultados experimentales-test comparativo
- Formulario de modificaciones en solicitud pendiente.

Señor Director,

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 de Usaqué

T.P.A. No. 23.555

COLO-17572-0841-001-0
AHAAHAID-236199WPC17572
No. M-2013-236199AHA

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	Espacio reservado para el adhesivo de radicación
---	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
MODIFICACIONES Y/O CORRECCIONES

1. Identificación del Trámite

☐ Error material	☒ Modificación a una Solicitud en trámite
☒ Patente de Invención	
☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☐ Registro de Diseño Industrial	
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados	

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒

NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY
Y
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Japón	3-1, Kasumigaseki 1-chome, Chiyoda-ku,	Tokyo, 1008921
y	y	y
Japón	9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku,	Tokyo 1018535
Respectivamente	Respectivamente	Respectivamente
Dirección electrónica		No. Fax
clientes@cavelier.com		2 11 86 50
		Número telefónico
		3 47 36 11

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

Apellidos y Nombre De Páez Luz Clemencia		Documento de identificación C.C. 35.456.344	Tarjeta profesional T.P.A. 23.555
Dirección y domicilio Carrera 4ª No. 72 –35		Ciudad Bogotá	
Dirección electrónica cavelier@cavelier.com	No. Fax 2 11 86 50	Número telefónico 3 47 36 11	
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general			

4. Datos del trámite

Corrección:

Expediente No 10.048.045

Aparece

Debe ser

Modificación:

- ☒ **Modificación al capítulo reivindicatorio.**
Presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 12 reivindicaciones y pido respetuosamente que el examen de patentabilidad sea realizado sobre estas nuevas reivindicaciones presentadas. Respetuosamente manifiesto que a pesar de eliminar materia del pliego reivindicatorio originalmente presentado, mi representada no renuncia a la protección que pueda obtener sobre dicha materia y se reserva el derecho de presentar una solicitud divisional que la contenga durante el trámite de la presente solicitud, beneficiándose de la fecha de prioridad inicialmente reivindicada.
- ☒ **Modificación al capítulo descriptivo.**
Presento nuevo capítulo descriptivo , el cual solicito que sea tenido en cuenta al realizar del examen de patentabilidad
- ☐ **Modificación al resumen.**
- ☐ **Modificación a los dibujos.**
- ☐ **Modificación al solicitante.**

5. Anexos

- ☐ Poder, si fuere el caso.
- ☒ Documento que contiene las modificaciones o correcciones.
- ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

6. Firma	
Nombre y apellidos	Firma
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
C.C. 35.456.344 DE Usaquén	Tarjeta Profesional 23.555 

66 AHAINCA\WPC17572\ID-236468

DESCRIPCIÓN-MODIFICADA

ARN BICATENARIO CON LÍPIDO MODIFICADO QUE TIENE UN POTENTE EFECTO DE INTERFERENCIA DEL ARN

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se relaciona con un ARN bicatenario con lípido modificado que puede inhibir de manera eficiente la expresión de un gen objetivo. Más específicamente, la presente invención se relaciona con un ARN bicatenario con lípido modificado que tiene alta resistencia a la nucleasa y alta eficiencia de captación celular, y produce un excelente efecto de interferencia del ARN.

TÉCNICA ANTERIOR

El desarrollo de los fármacos para el tratamiento eficiente de enfermedades intratables, tales como el cáncer y el SIDA, es un objeto importante a alcanzar en el campo de las ciencias biológicas. Un método potencial para lograr este objetivo es utilizar medicinas genéticas que actúan solamente sobre genes específicos. En particular, un método de interferencia del ARN (ARNi) que utiliza un ARN corto bicatenario de 21 bases de largo (ARN de interferencia corta: siARN) ha atraído recientemente mucho la atención como una medicina genética. El método de ARNi se reportó primero por Fire et al. en 1998 (ver Documento no Patente 1). De acuerdo con el informe de Fire et al., cuando se introduce en las células el ARN bicatenario de aproximadamente 100 pares de base que es homólogo a una región específica de un gen cuya función va a ser inhibida, el ARN bicatenario se digiere por la acción del Dicer en fragmentos de aproximadamente 20 a 25 pares base, y luego puesta en complejo con una

pluralidad de proteínas para formar un complejo ARN/proteína (este complejo se denomina como un RISC: un Complejo Silenciador Inducido por ARN), que se une a un sitio homólogo del mRNA producido del gen objetivo y que inhibe potencialmente de esta manera la expresión del gen. Sin embargo, se ha reportado que cuando el ARN largo bicatenario de aproximadamente 30 pares base o mayor se introduce en las células de mamífero, se induce una respuesta de interferón, que es una respuesta antiviral, originando así un fenómeno de apoptosis. Por lo tanto, se consideró difícil aplicar el método del ARNi a los mamíferos. Tuschl et al. sintetizó así químicamente el ARN bicatenario de 12 bases de largo que tiene extremos en suspensión en ambos extremos 3', y que se reportó que cuando tal ARN bicatenario se introduce directamente en las células de mamífero, el ARN bicatenario puede inhibir potencialmente la expresión del gen específicamente la secuencia, aunque evitando una respuesta de interferón (ver Documento no Patente 2). Tuschl et al. sintetizó además ARNs cortos bicatenarios que consisten de una región bicatenario de 19 pares base y extremo(s) en suspensión de varias longitudes a los extremos 3' o 5', e investigó sus efectos de interferencia del ARN. Como resultado, las observaciones mostraron que el siARN de 21 bases de largo que tiene un extremo en suspensión de 2 bases en ambos extremos 3' demostró un efecto de interferencia de ARN muy potente, mientras que ningún otro tipo de ARN corto bicatenario exhibió un efecto de interferencia de ARN notorio. Con base en este reporte, se utiliza comúnmente el método de interferencia de ARN que utiliza un ARN bicatenario de 21 bases de largo que tiene un extremo en suspensión de 2 bases en ambos extremos 3'. El método de inhibir la expresión del gen objetivo que utiliza un ARN corto bicatenario de 21 bases de largo se denomina aquí como el "método siARN", para distinguirlo del método ARNi.

En razón a que el método siARN utiliza ARN sintético, la preparación de la muestra es comparablemente fácil, y el manejo también es fácil; adicionalmente, se pueden producir efectos muy potentes. Por lo tanto, el método siARN ha atraído mucho la atención no solamente en el campo de ciencias biológicas, sino también en el campo de negocios de biotecnología.

Sin embargo, este excelente método del siARN también tiene problemas a ser resueltos. Como se describió anteriormente, el siARN está compuesto de una molécula de ARN que se descompone fácilmente por la acción de la nucleasa. Comparado con el ARN de cadena única, la región del ARN bicatenario tiene una resistencia comparativamente alta a la nucleasa contenida en el medio y/o una célula. Sin embargo, un ARN bicatenario que consiste de 19 pares base produce escasamente los efectos de interferencia del ARN conocidos. Como tal, se ha reportado que cuando se introdujo en las células que contienen la secuencia del gen objetivo, aunque el siARN sintético produce un potente efecto inhibitorio en la expresión del gen durante aproximadamente 2 a 4 días, su efecto de interferencia del ARN se reduce agudamente posteriormente, y se pierde casi completamente en aproximadamente siete días.

Varios siARN químicamente modificados se han reportado recientemente por suministrar siARN con una eficiencia de captación celular mejorada y prolongada, efectos de interferencia de ARN altamente activa. Por ejemplo, para mejorar la resistencia a la digestión de exonucleasa, los siARN modificados con un grupo amino, un grupo tiol o un sitio abásico sobre un extremo del siARN se han sintetizado. Sin embargo, se ha reportado que la mayoría de los siARN terminalmente modificados de 21 bases de largo tienen efectos de interferencia del ARN notoriamente reducidos.

En años recientes, J. Rossi et al. reportó que un ARN bicatenario de 27 pares base produjo un efecto de interferencia del ARN que es aproximadamente 100 veces mayor que aquel del ARN bicatenario de 21 bases de largo (ver Documento no Patente 3). Esto es presumiblemente porque después de que el ARN de 21 pares bases se cliva con una enzima similar a aRNasa III, Dicer, en un siARN de 21 bases de largo, el RISC del complejo de proteína reconoce el siARN, de tal manera que los efectos del siARN se pueden producir con una alta eficiencia.

Como se describió anteriormente, en razón a que el ARN de 27 bases de largo puede producir excelentes efectos de interferencia del ARN, las expectativas a utilizar este ARN como una medicina genética se incrementan. Sin embargo, se desconoce completamente el método técnico efectivo para mejorar el efecto de interferencia del ARN del ARN de 27 bases de largo. Adicionalmente, el método técnico para mejorar el efecto de interferencia del ARN del ARN bicatenario más corto o más largo de 27 bases, que tiene un efecto de interferencia del ARN, tampoco es claro.

Los ARN bicatenario que tienen unos efectos de interferencia del ARN se configuran generalmente por tener extremos en suspensión. Los ARN sin extremos en suspensión (es decir, que tienen extremos romos) también se han investigado por sus efectos de interferencia del ARN. Los resultados, sin embargo, sugieren que los efectos de interferencia del ARN de los ARN bicatenario de extremo truncado sobre el lado del extremo 5' de la cadena codificante son sustancialmente los mismos, o mejores que aquellos de los ARN bicatenario que

tienen un extremo en suspensión sobre el lado del extremo 5' de la cadena codificante (ver Documento no Patente 4).

Los lípidos tienen alta permeabilidad de membrana celular, y se conocen por ser útiles para suministrar los fármacos a las células. Enlazando tal lípido a un ARN bicatenario que tiene un efecto de interferencia del ARN se espera que se incremente la eficiencia de captación celular y produzca de esta manera efectos de interferencia del ARN más potentes. Sin embargo, se conoce que cuando un lípido es simplemente ligado a un ARN bicatenario que tiene un efecto de interferencia del ARN, el efecto de interferencia del ARN se reduce fuertemente. En la técnica anterior, un ARN bicatenario con lípido modificado tiene tanto un efecto de interferencia del ARN excelente como un efecto útil basado en el lípido que todavía tenía que ser construido.

Documento no Patente 1: Fire et al., Nature, 391, 806-811 (1998)

Documento no Patente 2: Tuschl et al., EMBO Journal, 20, 6877-6888 (2001).

Documento no Patente 3: J. Rossi et al., Nature Biotech., 23, 222-226 (2005).

Documento no Patente 4: J. T. Marques et al., Nature Biotech., 24, 559-565 (2005).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

PROBLEMA A SER RESUELTO POR LA INVENCION

Un objeto de la presente invención es suministrar un ARN, novedosos bicatenario que tiene una alta resistencia a la nucleasa y una alta eficiencia en la captación celular, y que es capaz de producir un excelente efecto de interferencia del ARN. Otro objeto de la presente invención es suministrar una composición

farmacéutica que contiene un ARN novedoso bicatenario. Un objeto adicional de la presente invención es suministrar un método para inhibir la expresión de un gen objetivo, que comprende introducir el ARN novedoso bicatenario en las células para inhibir la expresión del gen objetivo.

MEDIOS PARA RESOLVER EL PROBLEMA

Los presentes inventores condujeron una investigación extensa para lograr los anteriores objetivos, y encontraron que cuando un lípido está ligado, directamente o por vía de un ligador, a por lo menos uno del primero al sexto nucleótidos del extremo 5' de una cadena codificante de un ARN bicatenario que comprende la cadena anticodificante que tiene una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia objetivo en un gen objetivo, y una cadena codificante que tiene una secuencia de nucleótido complementaria a la cadena anticodificante, el ARN bicatenario es capaz de inhibir la expresión del gen objetivo, y el ARN bicatenario así construido tiene una alta resistencia a la nucleasa y una alta eficiencia de captación celular, y produce un excelente efecto de interferencia del ARN. La presente invención fue lograda como resultado de investigación adicional, con base en este hallazgo.

Más específicamente, la presente invención suministra el siguiente ARN bicatenario con lípido modificado, composiciones farmacéuticas que contienen el ARN novedoso bicatenario, métodos para inhibir la expresión de un gen objetivo, etc.

Ítem 1. Un ARN bicatenario con lípido modificado que comprende una cadena anticodificante que tiene una secuencia de nucleótido complementaria a una

secuencia objetivo en un gen objetivo, y una cadena codificante que tiene una secuencia de nucleótido complementaria a la cadena anticodificante, el ARN bicatenario es capaz de inhibir la expresión del gen objetivo, y la cadena codificante tiene un lípido ligado a por lo menos uno del primero al sexto nucleótidos del extremo 5' directamente o por vía de un ligador.

Ítem 2. Un ARN bicatenario con lípido modificado de acuerdo al Ítem 1 que es de extremo truncado sobre el lado del extremo 5' de la cadena codificante, y es de extremo truncado o tiene un extremo en suspensión sobre el lado del extremo 3' de la cadena codificante.

Ítem 3. Un ARN bicatenario con lípido modificado de acuerdo al Ítem 1 que tiene extremos en suspensión en ambos lados de los extremos 5' y 3' de la cadena codificante.

Ítem 4. Un ARN bicatenario con lípido modificado de acuerdo a uno cualquiera de los Ítems 1 a 3 en donde la cadena codificante consiste de 21 a 27 nucleótidos.

Ítem 5. Un ARN bicatenario con lípido modificado de acuerdo al Ítem 2 que es de extremo truncado en ambos lados de los extremos 5' y 3' de la cadena codificante, y en la cual cada una de las cadenas codificantes y contrasentido consisten de 27 nucleótidos.

Ítem 6. Un ARN bicatenario con lípido modificado de acuerdo al Ítem 2 que es de extremo truncado en ambos lados de los extremos 5' y 3' de la cadena codificante, y en la cual cada una de las cadenas codificantes y contrasentido consisten de 23 nucleótidos.

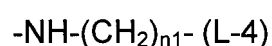
Ítem 7. Un ARN bicatenario con lípido modificado de acuerdo al Ítem 2 que es de extremo truncado sobre el lado del extremo 5' de la cadena codificante, y la cadena codificante consiste de 25 nucleótidos, y la cadena contrasentido consiste de 23 nucleótidos.

Ítem 8. Un ARN bicatenario con lípido modificado de acuerdo al Ítem 3, en donde cada una de las cadenas codificantes y contrasentido consiste de 21 nucleótidos.

Ítem 9. Un ARN bicatenario con lípido modificado de acuerdo a uno cualquiera de los Ítems 1 a 8, en donde el lípido es un ácido graso que tiene de 6 a 50 átomos de carbono.

Ítem 10. Un ARN bicatenario con lípido modificado de acuerdo a uno cualquiera de los Ítems 1 a 9, en donde el lípido es ácido láurico, ácido esteárico, ácido mirístico, o ácido palmítico.

Ítem 11. Un ARN bicatenario con lípido modificado de acuerdo a uno cualquiera de los Ítems 1 a 10, en donde el lípido está ligado a por lo menos uno del primero al sexto nucleótido del extremo 5' de la cadena codificante por vía de un ligador, el ligador se representa por la fórmula estructural.



en donde $n1$ es un entero de 1 a 40.

Ítem 12. Una composición farmacéutica que comprende el ARN bicatenario con lípido modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y una base farmacéuticamente aceptable.

Ítem 13. Uso del ARN bicatenario con lípido modificado de cualquiera de los ítems 1 a 10 para la producción de una composición farmacéutica con el fin de inhibir la expresión de un gen objetivo.

Ítem 14. Un método para inhibir la expresión de un gen objetivo que comprende introducir un ARN bicatenario con lípido modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en las células para inhibir la expresión del gen objetivo.

EFFECTO DE LA INVENCIÓN

El ARN bicatenario con lípido modificado de la presente invención se modificó con un lípido en el lado del extremo 5' de la cadena codificante, produciendo de esta manera un efecto de interferencia del ARN significativamente incrementado. Más específicamente, el ARN bicatenario con lípido modificado tiene un lípido ligado a un sitio específico del ARN, y así tiene una resistencia notoriamente mejorada a la nucleasa y la eficiencia en la captación celular, sin dañar el procesamiento del Dicer o la unión del ARN al RISC, y así puede contribuir mayormente al uso médico.

El ARN bicatenario con lípido modificado de la presente invención tiene una excelente capacidad de suministro intracelular, aun cuando se utilice solo. Por lo tanto, el ARN bicatenario con lípido modificado se puede introducir en las células sin el uso de ninguno de los reactivos de transfección de gen conocidos, o utilizando un reactivo de transfección de gen conocido en una cantidad reducida.

Por lo tanto, el ARN bicatenario con lípido modificado de la presente invención puede inhibir la expresión de la citotoxicidad, que es una preocupación cuando se utilizan reactivos de transfección de un gen conocido, asegurando de esta manera un alto grado de seguridad en las aplicaciones clínicas.

Así, la expresión del gen objetivo puede ser más efectivamente inhibida o afectada al utilizar la composición farmacéutica de la presente invención o al utilizar el método de inhibir la expresión del gen objetivo de acuerdo con la presente invención.

MEJOR MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

En esta especificación, el "extremo trunco" o el "terminado truncado" se refiere a una estructura terminal de un ARN bicatenario en el cual las bases en la región terminal de una cadena codificante y las bases en la región terminal de una cadena anticodificante complementaria a la cadena codificante son pareadas sin formar una cadena única. El "extremo en suspensión" se refiere a un porción terminal de una secuencia de nucleótido en la cual la cadena única está presente sin formar una cadena doble, porque las bases complementarias no están presentes en la región terminal de la cadena codificante del ARN bicatenario o de la región terminal de la cadena anticodificante complementaria a la cadena codificante.

El ARN bicatenario con lípido modificado de la invención comprende una cadena codificante que tiene una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia objetivo en un gen objetivo.

El gen objetivo aquí se refiere a un gen cuya expresión va a ser inhibida por el efecto de interferencia del ARN. El gen objetivo del ARN bicatenario con lípido modificado de la invención no está particularmente limitado, y se puede seleccionar adecuadamente de acuerdo con el uso pretendido del ARN bicatenario con lípido modificado.

La secuencia objetivo en el gen objetivo no está particularmente limitada en tanto que la expresión del gen se pueda inhibir mediante los efectos de interferencia del ARN. La secuencia objetivo se puede determinar adecuadamente de acuerdo con un método conocido, por ejemplo, utilizando una búsqueda NCBI BLAST, etc. Por ejemplo, la secuencia objetivo puede ser una región que consiste de 19 a 30 bases que siguen las bases "AA" en la región del exón 50 a 100 bases corriente abajo del codón de partida de la región de codificación (ORF) del gen objetivo, y que tiene un contenido de GC de aproximadamente 50%. Es experimentalmente conocido en este campo que efectos de interferencia de ARN excelentes se pueden obtener utilizando una cadena complementaria a tal secuencia objetivo. Por ejemplo, la secuencia objetivo se puede determinar de acuerdo a las instrucciones del IDT (Integrated DNA Technologies, Inc.; Dicer Substrate RNAi Design). Un reporte reciente reveló que un ARN bicatenario que tiene altos efectos de interferencia de ARN se pueden producir al construir un ARN bicatenario que tiene dos puntos: (i) un par A/U sobre el lado del extremo 5' de la cadena anticodificante; (ii) un par G/C sobre el lado del extremo 5' de la cadena codificante; y (iii) aproximadamente cinco pares A/U sobre el lado de la cadena 5' de la cadena anticodificante; (iv) y no tiene nueve o más de los pares G/C (Ui-Tei et al., Nucleic Acids Res., 32, 936-948 (2004)).

Cuando la cadena anticodificante del ARN bicatenario con lípido modificado de la invención no tiene un extremo en suspensión, la cadena anticodificante consiste de una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia objetivo. Cuando la cadena anticodificante tiene un extremo en suspensión en el extremo 5' y/o el extremo 3', la cadena anticodificante consiste de una secuencia de nucleótido que tiene una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia objetivo, y una secuencia de nucleótido del extremo en suspensión ligado al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia de nucleótido complementaria.

En la medida en que se puede lograr el efecto de interferencia del ARN, el número de nucleótidos que constituye la cadena anticodificante del ARN bicatenario con lípido modificado de la invención no está particularmente limitado, y se puede determinar adecuadamente de acuerdo con la estructura deseada del ARN bicatenario. El número de nucleótidos es usualmente 21 a 27, preferiblemente 21, 23, 25, o 27, y más preferiblemente 21, 23, o 27. Cuando la cadena anticodificante no tiene un extremo en suspensión, el número de nucleótidos que constituye la cadena codificante significa aquí el número total de nucleótidos que constituyen la secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia objetivo. Cuando la cadena anticodificante tiene un extremo en suspensión, el número de nucleótidos que constituyen la cadena anticodificante significa la suma del número de nucleótidos que constituye el extremo en suspensión y el número de nucleótidos que constituye la secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia objetivo. El ARN bicatenario con lípido modificado de la invención comprende una cadena codificante que tiene una secuencia de nucleótido complementaria a la cadena anticodificante.

Cuando la cadena codificante del ARN bicatenario con lípido modificado de la invención no tiene un extremo en suspensión, la cadena codificante consiste de una secuencia de nucleótidos complementaria a una parte o a todas las "secuencias de nucleótido complementarias a la secuencia objetivo" de la cadena anticodificante. Cuando la cadena codificante tiene un extremo en suspensión en el extremo 5' y/o el extremo 3', la cadena codificante consiste de: una secuencia de nucleótido complementaria a una parte o a toda la "secuencia de nucleótido complementaria a una secuencia objetivo" de la cadena anticodificante; y una secuencia de nucleótido del extremo en suspensión ligado al extremo 5' y/o extremo 3' de la secuencia de nucleótido complementaria de la cadena codificante. En la medida en que el efecto de interferencia del ARN se puede lograr, el número de nucleótidos que constituye la cadena codificante en el ARN bicatenario con lípido modificado de la invención no está particularmente limitado, y se puede determinar adecuadamente de acuerdo con la estructura deseada del ARN bicatenario. El número de los nucleótidos es usualmente 21 a 27, preferiblemente 21, 23, 25, o 27, y más preferiblemente 21, 23, o 27. Cuando la cadena codificante no tiene un extremo en suspensión, el número de nucleótidos que constituye la cadena codificante significa el número total de nucleótidos que constituye la secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia objetivo. Cuando la cadena codificante tiene un extremo en suspensión, el número de nucleótidos que constituye la cadena codificante significa la suma del número de nucleótidos que constituyen el extremo en suspensión, y el número de nucleótidos que constituyen la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia objetivo.

Los nucleótidos que constituyen la cadena codificante y la cadena anticodificante del ARN bicatenario con lípido modificado de la invención son

básicamente ribonucleótidos. Para mejorar la resistencia a la digestión enzimática, la secuencia del ARN puede contener varios nucleótidos químicamente modificados, tales como los nucleótidos modificados 2'-O-metil, los nucleótidos 2'-F-modificado, los nucleótidos LNA (Ácido Nucleico Asegurado), desoxiribunocleótidos, o similares. De manera particular, cuando el ARN bicatenario con lípido modificado de la invención tiene un extremo en suspensión, el extremo en suspensión de la cadena codificante y/o el ARN contra sentido puede estar compuesto de desoxiribunocleótidos. Ejemplos de tales nucleótidos químicamente modificados incluyen nucleótidos modificados en la estructura de fosfato tal como ADN/ARN modificado con fosforotioato y ADN/ARN modificado con boranofosfato; los nucleótidos modificados 2' tales como el ARN modificado con 2'-OMe y el ARN modificado con 2'-F; los nucleótidos modificados obtenidos al reticular una molécula de azúcar de un nucleótido, tal como el LNA (Ácido Nucleico Asegurado) y el ENA (ácidos nucleicos con puente de etileno 2'-O, 4'-C); los nucleótidos modificados tienen diferentes estructuras, tales como PNA (Ácido Nucleico Péptido) y morfolino-nucleótido; los nucleótidos de modificados en la base tales como 5-fluorouridina y 5-propiluridina; y similares.

El ARN bicatenario con lípido modificado de la invención no está particularmente limitado estructuralmente, en tanto las cadenas codificantes y anticodificantes se hibriden en una cadena doble. Por ejemplo, el ARN bicatenario con lípido modificado tiene preferiblemente la siguiente estructura: una estructura (A) en la cual el ARN bicatenario es de extremo truncado (es decir, tiene un extremo truncado) sobre el lado del extremo 5' de la cadena codificante, y es extremo truncado o tiene un extremo en suspensión (región de cadena única) sobre el lado del extremo 3' de la cadena codificante; una estructura (B) en la cual el ARN bicatenario tiene extremos en suspensión sobre los lados del extremo 5' y

3' de la cadena codificante. La estructura en la cual el ARN bicatenario tiene un extremo en suspensión sobre el lado del extremo 3' de la cadena codificante que incluye casos cuando la región del extremo 3' de la cadena codificante forma un extremo en suspensión, y casos cuando la región del extremo 5' de la cadena anticodificante forma un extremo en suspensión. La estructura en la cual el ARN bicatenario tiene un extremo en suspensión sobre el lado del extremo 5' de la cadena codificante incluye el caso en el cual la región del extremo 5' de la cadena codificante forma un extremo en suspensión, y el caso en el cual la región del extremo 3' de la cadena anticodificante forma un extremo en suspensión.

Entre los ARN bicatenario que se pueden utilizar para formar el ARN bicatenario con lípido modificado de la invención, los ARN bicatenario que tienen las estructuras (A-1) a (A-3) mostrados adelante son particularmente preferibles entre aquellos que tienen la estructura anterior (A), y los ARN bicatenario de la estructura (B-1) mostrados adelante son particularmente preferibles entre aquellos que tienen la estructura anterior (B) para lograr un efecto de interferencia del ARN mejorado. La estructura (A-1), en la cual el ARN bicatenario es de extremo truncado en ambos lados de los extremos 5' y 3' de la cadena codificante, y cada una de las cadenas codificantes y anticodificantes consisten de 27 nucleótidos; la estructura (A-2), en la cual ARN bicatenario es de extremo truncado en ambos lados de los extremos 5' y 3' de la cadena codificante, y cada una de las cadenas codificantes y anticodificantes consiste de 23 nucleótidos, respectivamente; la estructura (A-3), en la cual el ARN bicatenario es de extremo truncado sobre el lado del extremo 5' de la cadena codificante, y la cadena codificante consiste de 25 nucleótidos, y la cadena anticodificante consiste de 23 nucleótidos; y la estructura (B-1), en la cual el ARN bicatenario tiene extremos en suspensión que consiste cada uno de dos nucleótidos tanto en el extremo 3' de la cadena

codificante como el extremo 3' de la cadena anticodificante, y cada una de las cadenas codificantes y anticodificantes consisten de 21 nucleótidos.

Más específicamente, en las estructuras (A-1) y (A-2), las cadenas codificantes y anticodificantes se hibridan sin extremos en suspensión formados sobre los extremos. En la estructura (A-3), las cadenas codificantes y anticodificantes se hibridan de tal manera que el ARN bicatenario es de extremo truncado sobre el extremo 5' de la cadena codificante, y el primero y segundo nucleótido del extremo 3' de la cadena codificante forman un extremo en suspensión. La estructura (A-1) es aquella de los primeros 19 nucleótidos del extremo 5' de la cadena codificante y el tercero a 21 nucleótidos del extremo 3' de la cadena anticodificante se hibridan de tal manera que el primero y segundo nucleótido del extremo 3' de la cadena codificante, y el primero y segundo nucleótido del extremo 3' de la cadena anticodificante forman extremos en suspensión, respectivamente.

El ARN bicatenario con lípido modificado de la invención tiene al menos un lípido ligado a por lo menos uno del primero al sexto nucleótido del extremo 5' de la cadena codificante. El ARN bicatenario con lípido modificado de la invención no tiene sustituyentes en ninguna otra posición que en la región de extremo 5' de la cadena codificante. Más específicamente, ningún sustituyente está presente en ninguna otra área más que en la región de extremo 5' de la cadena codificante y en la cadena anticodificante, y estas áreas consisten de nucleótidos. El o los lípidos de enlace solamente en la región de extremo 5' de la cadena codificante pueden mejorar la eficiencia de la captación celular y suministran un efecto de interferencia del ARN notoriamente excelente.

El lípido enlazado a la cadena codificante del ARN bicatenario con lípido modificado de la invención no está particularmente limitado, y los ejemplos de éstos incluyen lípidos simples (ésteres de ácidos grasos con varios alcoholes); lípidos complejos tales como fosfolípidos y glicolípidos; lípidos derivados tales como ácidos grasos, alcoholes superiores, vitaminas solubles en lípido, esteroides, e hidrocarburos. Para mejorar la eficiencia de la captación celular y el efecto de interferencia del ARN, el lípido utilizado es preferiblemente un lípido derivado, más preferiblemente un ácido graso que tiene 6 a 50 átomos de carbono, aún más preferiblemente un ácido graso que tiene 10 a 22 átomos de carbono, particularmente preferiblemente un ácido graso que tiene 12 a 18 átomos de carbono, más particularmente preferiblemente ácido láurico, ácido esteárico, ácido mirístico, o ácido palmítico, y más preferiblemente ácido palmítico.

La manera de enlazar el lípido a la cadena codificante para formar el ARN bicatenario con lípido modificado de la invención no está particularmente limitada. El lípido puede estar ligado directamente o por vía de un ligador a la cadena codificante. En la presente invención, el ligador por vía del cual está ligado el lípido a la cadena codificante no es el ligador que consiste de ácido nucleico. El ligador no está particularmente limitado en tanto que el lípido y la cadena codificante se pueden ligar a través de éste. Por ejemplo, los ligadores que tienen las siguientes estructuras se pueden utilizar como el ligador:



-CO-(CH ₂) _{n1} -CO-	(L-6)
-CO-(CH ₂) _{n1} -NH-	(L-7)
-NH-(CH ₂) _{n1} -NH-	(L-8)
-CO-NH-(CH ₂) _{n1} -NH-CO-	(L-9)
-C(=S)-NH-(CH ₂) _{n1} -NH-CO-	(L-10)
-C(=S)-NH-(CH ₂) _{n1} -NH-C(=S)-	(L-11)
-CO-O-(CH ₂) _{n1} -O-CO-	(L-12)
-C(=S)-O-(CH ₂) _{n1} -O-CO-	(L-13)
-C(=S)-O-(CH ₂) _{n1} -O-C(=S)-	(L-14)
-CO-NH-(CH ₂) _{n1} -O-CO-	(L-15)
-C(=S)-NH-(CH ₂) _{n1} -O-CO-	(L-16)
-C(=S)-NH-(CH ₂) _{n1} -O-C(=S)-	(L-17)
-CO-NH-(CH ₂) _{n1} -O-CO-	(L-18)
-C(=S)-NH-(CH ₂) _{n1} -CO-	(L-19)
-C(=S)-O-(CH ₂) _{n1} -NH-CO-	(L-20)
-C(=S)-NH-(CH ₂) _{n1} -O-C(=S)-	(L-21)
-NH-(CH ₂ CH ₂ O) _{n2} -CH(CH ₂ OH)-	(L-22)
-NH-(CH ₂ CH ₂ O) _{n2} -CH ₂ -	(L-23)

En las Fórmulas anteriores (L-4) a (L-21), n1 es un entero de 1 a 40, preferiblemente un entero de 2 a 20, y más preferiblemente un entero de 2 a 12.

En las Fórmulas anteriores (L-22) y (L-23), n2 es un entero de 1 a 20, preferiblemente un entero de 1 a 10, y más preferiblemente un entero de 1 a 6.

Los ligadores de las Fórmulas (L-4) a (L-23) pueden enlazar la cadena codificante sobre cualquier lado izquierdo o derecho. Preferiblemente, un sitio específico de la cadena codificante (o el ácido nucleico del conjugado de ácido

nucleico) está ligado al lado derecho de los ligadores de las Fórmulas (L-4) a (L-23), y el lípido está ligado en su lado izquierdo.

El sitio de enlace del lípido al ligador se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con los tipos de lípido y el ligador utilizado. Por ejemplo, cuando se utiliza un ácido graso como el lípido, éste se puede ligar por vía de una unión de éster, una unión de amida, o una unión similar formada entre el grupo carboxilo del ácido graso y el ligador. Más específicamente, cuando se utiliza un ácido graso como el lípido, el lípido está preferiblemente ligado mediante sustitución del -OH del grupo carboxilo del ácido graso con el ligador.

El ligador se selecciona adecuadamente de acuerdo con el tipo de lípido que se va a ligar. Cuando se utiliza ácido graso como el lípido, se utilizan preferiblemente los ligadores representados por la Fórmula (L-4).

Además de los ligadores anteriormente mencionados, también son utilizables otros ligadores. Ejemplos de éstos incluyen ligadores bifuncionales (ligadores que contienen dos grupos funcionales), tal como N-succinimidil=3-(2-piridilditio)propionato, ácido N-4-maleimido butírico, S-(2-piridilditio)cisteamina, yodoacetoxisuccinimida, N-(4-maleimidobutiloxi)succinimida, ácido N-[5-(3'-maleimida propilamida)-1-carboxipentil]iminodiacético, ácido N-(5-aminopentil)-iminodiacético, y similares. En la cadena codificante, el nucleótido ligado al lípido o al ligador utilizado para enlazar el lípido no está particularmente limitado, en tanto éste sea al menos uno del primer al sexto de los nucleótidos desde el extremo 5' de la cadena codificante, preferiblemente por lo menos uno del primero al cuarto nucleótido desde el extremo 5', más preferiblemente el primero y/o segundo

nucleótido desde el extremo 5', y particularmente preferiblemente el nucleótido sobre el extremo 5' (el primer nucleótido desde extremo 5').

El sitio de enlace de la cadena codificante al lípido o el ligador utilizado para enlazar el lípido no está particularmente limitado. Éste se enlaza preferiblemente mediante la sustitución del átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo de la porción de ácido fosfórico de un nucleótido específico de la cadena codificante.

El número de lípidos ligados al ARN bicatenario con lípido modificado de la invención, no está particularmente limitado. Por ejemplo, uno a tres lípidos, preferiblemente uno o dos lípidos, y más preferiblemente un lípido se puede ligar.

El ARN bicatenario con lípido modificado de la invención se puede producir al sintetizar una cadena codificante que tiene al menos un lípido enlazado a éste, y una cadena anticodificante, respectivamente, e hibridar las cadenas codificantes y anticodificantes de acuerdo con métodos conocidos. La cadena codificante que tiene el lípido ligado a éste también se puede producir de acuerdo a métodos sintéticos conocidos.

El ARN bicatenario modificado de la invención se puede introducir en las células para inhibir o dañar la expresión de un gen objetivo, y por lo tanto se puede utilizar como un fármaco para inhibir o dañar la expresión de un gen objetivo o una composición para terapia génica, es decir, una composición farmacéutica. La composición farmacéutica de la invención se puede formular en varias formas de dosis. Ejemplos de las formas de dosis de la composición farmacéutica de la invención incluyen preparaciones líquidas tales como líquidos

(tales como jarabes), gotas, e inyecciones; preparaciones sólidas tales como tabletas, píldoras, polvos, gránulos, y cápsulas (tales como cápsulas suaves); y similares. Cuando la composición farmacéutica de la invención es una preparación líquida, la composición puede ser criopreservada, o preservada después de remover el agua de ésta mediante liofilización, etc. Las preparaciones liofilizadas y los jarabes secos, etc. se pueden utilizar en forma de soluciones al agregar agua destilada para inyección, agua estéril o similar cuando se utiliza. Cuando la composición farmacéutica de la invención es una preparación sólida, la composición se puede utilizar en la forma de una solución al agregar agua destilada para inyección, agua estéril, o similar, cuando se utiliza.

La composición farmacéutica puede consistir de un ARN bicatenario con lípido modificado solo, o puede contener además un portador farmacéuticamente aceptable, si es necesario. El portador que se va a utilizar no está particularmente limitado en tanto éste no dañe el efecto inhibitorio de la expresión del gen objetivo del ARN bicatenario modificado de la invención, y se puede seleccionar adecuadamente de acuerdo a la forma de dosis. Ejemplos de portadores que se pueden utilizar incluyen agua purificada, soluciones de azúcar acuoso, amortiguadores, solución salina fisiológica, soluciones de polímero acuoso, agua libre de RNasa, etc. Cuando la composición farmacéutica de la invención contiene el portador, las proporciones de estos componentes en la composición no están particularmente limitadas, en tanto éstos no dañen la expresión del gen objetivo los efectos inhibitorios y de daño del ARN bicatenario modificado de la invención, y se puedan seleccionar adecuadamente de acuerdo a las formas de dosis.

Por ejemplo, la composición farmacéutica de la invención puede contener el ARN bicatenario modificado en una cantidad de 0.001 a 50, más preferiblemente 0.01 a 10, y aún más preferiblemente 0.1 a 1. La composición

farmacéutica de la invención puede contener el portador en una cantidad de 50 a 99.999 % en peso, preferiblemente 90 a 99.99 % en peso, y aún más preferiblemente 99 a 99.9 % en peso, con base en el peso total de la composición.

El gen objetivo y la enfermedad para la cual se utiliza la composición farmacéutica de la invención no están particularmente limitados. La relación entre el gen objetivo y la enfermedad se conoce. El tipo de célula en la cual la composición farmacéutica de la invención se introduce no está limitado. Las células que se van a utilizar pueden ser células derivadas de humano o células derivadas de animal no humano. La composición farmacéutica de la invención se puede utilizar *in vitro* o *in vivo*.

La cantidad y el método para introducir el ARN bicatenario con lípido modificado de la invención en células son las mismas que los métodos siARN convencionales. Por ejemplo, cuando la composición farmacéutica de la invención se utiliza para introducir el ARN bicatenario con lípido modificado en las células *in vitro*, se puede utilizar un método para cultivar células en la presencia de una cantidad apropiada de la composición farmacéutica. Cuando la composición farmacéutica de la invención se utiliza para introducir el ARN bicatenario con lípido modificado en células cultivadas o en células extraídas del cuerpo vivo *in vitro*, el ARN bicatenario con lípido modificado de la invención se puede introducir en la presencia de suero. Cuando la composición farmacéutica de la invención se utiliza para introducir el ARN bicatenario con lípido modificado en las células *in vivo*, se puede utilizar la inyección directa de la composición farmacéutica en el tejido; inyección intravenosa, subcutánea, muscular, intraperitoneal, intraocular, gastrointestinal o dental; administración por inhalación en la cavidad nasal, cavidad oral, pulmón, o similar; administración oral; administración transdérmica a

través de la piel; administración transmucosa a través de la mucosa oral, mucosa vaginal, mucosa ocular, mucosa rectal, y mucosa uterina; y métodos similares.

Cuando se utiliza la composición farmacéutica de la invención, se puede utilizar opcionalmente en conjunto con un reactivo de transfección de gen conocido utilizado para transfectar el siARN hacia las células. Alternativamente, la composición farmacéutica de la invención puede contener un reactivo de transfección de gen. El ARN bicatenario con lípido modificado contenido en la composición farmacéutica de la invención tiene excelentes capacidades de transfección celular, aún cuando se utiliza solo. Por lo tanto, el ARN bicatenario con lípido modificado se puede introducir en las células sin utilizar un reactivo de transfección de gen conocido utilizado para suministrar siARN en las células, o utilizar un reactivo de transfección de gen en una cantidad reducida.

La composición farmacéutica de la invención se puede utilizar en una cantidad efectiva, por ejemplo, una cantidad tal que el ARN bicatenario con lípido modificado se introduce en una cantidad de 0.001 a 10 pM, preferiblemente 0.001 a 1 pM, y más preferiblemente 0.01 a 0.1 pM, por célula.

La composición farmacéutica de la invención puede inhibir o dañar la expresión de un gen objetivo para evitar de esta manera, mejorar, o tratar una enfermedad causada por la expresión del gen objetivo.

La presente invención suministra además un método para inhibir la expresión del gen de un gen objetivo. El método para inhibir la expresión del gen objetivo comprende transfectar el ARN bicatenario con lípido modificado en las células.

El gen objetivo o la enfermedad no están particularmente limitados, y la relación entre el gen objetivo y la enfermedad se conoce, como se mencionó anteriormente. El tipo de célula en la cual se introduce el ARN bicatenario modificado de la invención no está limitado. Las células que se van a utilizar pueden ser células derivadas de humano o células animales no humanas. El ARN bicatenario modificado de la invención se puede introducir *in vitro* o *in vivo*.

En el método para inhibir la expresión de un gen objetivo de la invención, la cantidad y el método para introducir el ARN bicatenario con lípido modificado de la invención en las células es igual que el método siARN convencionales, y se puede seleccionar adecuadamente. Por ejemplo, en el método para inhibir la expresión de un gen objetivo de la invención, introducir el ARN bicatenario con lípido modificado de la invención en las células *in vitro*, una etapa de cultivar células en la presencia de una cantidad apropiada del ARN bicatenario con lípido modificado se puede utilizar. En el método de inhibir la expresión de un gen objetivo de la invención, introducir el ARN bicatenario con lípido modificado en las células cultivadas o en las células extraídas del cuerpo vivo *in vitro*, se puede una etapa de introducir el ARN bicatenario con lípido modificado de la invención en las células en la presencia del suero. En el método de inhibir la expresión de un gen objetivo de la invención, introducir el ARN bicatenario con lípido modificado en las células *in vivo*, se puede utilizar una etapa como se describe enseguida; la inyección directa del ARN bicatenario con lípido modificado de la invención en el tejido; la inyección intravenosa, subcutánea, muscular, intraperitoneal, intraocular, gastrointestinal, dental o similar; la administración por inhalación en la cavidad nasal, la cavidad oral, pulmón o similar; la administración oral; la administración transdérmica a través de la piel; la

administración transmucosa a través de la mucosa oral, la mucosa de la vagina, la mucosa ocular, la mucosa rectal, y la mucosa uterina; y etapas similares. Al llevar una cantidad efectiva del ARN bicatenario con lípido modificado a contacto con las células, el ARN bicatenario con lípido modificado de la invención se puede introducir a las células. Por ejemplo, el ARN bicatenario con lípido modificado se administra en una cantidad de 0.001 a 10 pM, preferiblemente 0.001 a 1 pM, y más preferiblemente 0.01 a 0.1 pM, por célula.

El ARN bicatenario con lípido modificado de la invención tiene excelente capacidad de transfección celular, aún cuando se utilice solo. Por lo tanto, el ARN bicatenario con lípido modificado se puede introducir en las células sin utilizar un reactivo de transfección de gen conocido, o utilizar un reactivo de transfección de gen en una cantidad reducida.

El método para inhibir la expresión de un gen objetivo de acuerdo con la presente invención puede inhibir o dañar la expresión del gen objetivo para evitar de esta manera, mejorar, o tratar una enfermedad causada por la expresión del gen objetivo.

EJEMPLOS

La presente invención se describe en detalle con referencia a los siguientes Ejemplos; sin embargo, la invención no se limita por estos Ejemplos.

Ejemplo 1: Efectos Inhibitorios de los ARN bicatenario con Lípido Modificado 5' sobre la Expresión del Gen Luciferasa

1. Síntesis de los ARN bicatenario con Lípido Modificado que Apuntan al Gen Luciferasa

1-1. Secuencias de las Cadenas codificantes y las Cadenas anticodificantes

Los ARN bicatenario que contiene cadenas codificantes con 21 a 27 bases de largo y Cadenas anticodificantes con 21 a 27 bases de largo se diseñaron teniendo una secuencia homóloga a la Renilla luciferasa y capaz de suprimir la expresión del gen de Renilla luciferasa. Tales ARN bicatenario pueden producir varias formas de cadenas dobles, dependiendo de la combinación de la cadena anticodificante y la cadena codificante. Los siguientes nombres se asignaron a estos ARN bicatenario. "DS (bicatenario) ARNs": los ARN bicatenario completamente no contienen un extremo en suspensión (una región de cadena única) (es decir, los ARN bicatenario que contienen los extremos truncados tanto de los lados de los extremos 5' como 3' de la cadena codificante); "si ARNs": los ARN bicatenario que contienen extremos en suspensión (colgantes) sobre ambos lados de extremo de éstos; y "ARNs RO (Cuelgan a la Derecha)": los ARN bicatenario que contienen un extremo en suspensión solamente sobre el lado derecho cuando el lado del extremo 5' de la cadena codificante se muestra sobre el lado izquierdo. Los nombres de éstos varios ARN bicatenario se distinguen al diseñar la cadena codificante como "A" ("A1" o "A2") y la cadena anticodificante como "B", y al indicar los números de las bases de cada ARN de cadena única, es decir, la cadena codificante y la cadena anticodificante. En razón a que se diseñaron dos tipos de Cadenas codificantes, ellas se designan cada una como "A1" y "A2" para clasificación. Como para los ARN bicatenario modificados con lípido en la región de extremo 5' de la cadena codificante, la designación "Cx

(x=16 o 12)" se da después del nombre de cada cadena codificante. Las secuencias de los ARN utilizados son como sigue.

Cadenas codificantes:

27nt 27A1: 5'-CUGGCCUUUCACUACUCCUACGAGCAC-3' (SEQ ID NO: 1)

25nt 25A1: 5'-CUGGCCUUUCACUACUCCUACGAGC-3' (SEQ ID NO: 2)

23nt 23A1: 5'-CUGGCCUUUCACUACUCCUACGA-3' (SEQ ID NO: 3)

21nt 21A1: 5'-CUGGCCUUUCACUACUCCUAC-3' (SEQ ID NO: 4)

21nt 21A2: 5'-GGCCUUUCACUACUCCUACGA-3' (SEQ ID NO: 5)

Cadenas anticodificantes:

27nt 27B: 5'-GUGCUCGUAGGAGUAGUGAAAGGCCAG-3' (SEQ ID NO: 6)

25nt 27B: 5'-GCUCGUAGGAGUAGUGAAAGGCCAG-3' (SEQ ID NO: 7)

23nt 27B: 5'-UCGUAGGAGUAGUGAAAGGCCAG-3' (SEQ ID NO: 8)

21nt 27B: 5'-GUAGGAGUAGUGAAAGGCCAG-3' (SEQ ID NO: 9)

1-2. Síntesis de los ARN bicatenario con Lípido No Modificado que Apuntan al Gen de Luciferasa

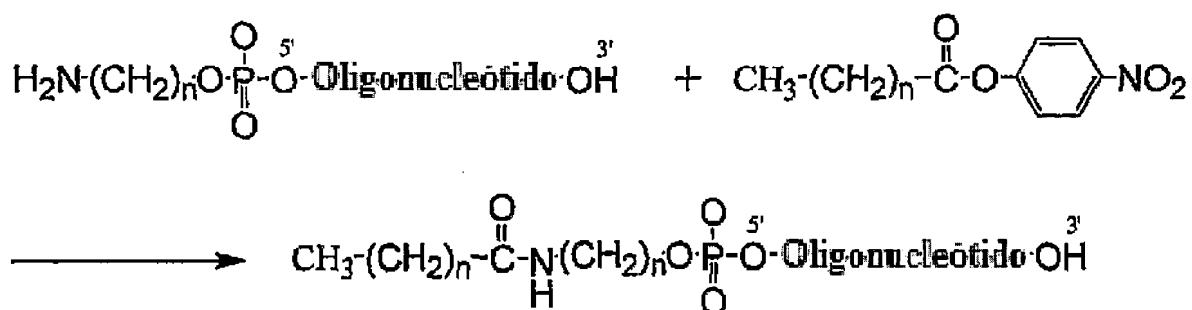
Se prepararon varios ARN bicatenario utilizando las cadenas codificantes y las Cadenas anticodificantes listadas anteriormente. Cada ARN bicatenario se preparó al mezclar cantidades equimolares de una cadena codificante y una cadena anticodificante en un amortiguador universal (Hayashi Kasei Co., Ltd.), calentando la mezcla a 92°C durante 2 minutos, y luego reduciendo gradualmente la temperatura a 4°C. Los varios ARN bicatenario resultantes se electroforizaron sobre un gel de poliacrilamida al 20% a 250 V durante 60 minutos, y luego confirmados al secar con un kit de tinción de plata (GE

1-3. Síntesis de los ARN bicatenario con Lípido Modificado que Apuntan al Gen de Luciferasa

Esquema de Reacción 1



37 2/10



Un proceso sintético específico se describe adelante. Para aminorar el extremo 5' de la cadena codificante, se pudo efectuar un proceso convencional (el proceso sintético de fosforamidita) utilizando un Modificador 5'-Amino C6 (Glen Research) sobre la síntesis de fase sólida de ARN, para sintetizar de esta manera una cadena codificante modificada con un grupo aminoalquilo en el extremo 5' (21 bases de longitud). La cadena codificante modificada con un grupo aminoalquilo en el extremo 5', que se había purificado mediante HPLC se sometió a un análisis MALDI-TOF MS, se compró de Hayashi Kasei Co., Ltd. La cadena codificante resultante modificada con un grupo aminoalquilo en el extremo 5' tiene $-(CH_2)_6-NH_2$ ligado al extremo 5' (el residuo de fosfato del primer nucleótido desde el extremo 5'). La concentración del ARN de cadena única resultante se determinó al medir la absorbancia a 260 nm que utiliza un espectrómetro. El ARN de cadena única modificado con el grupo aminoalquilo se mezcló con un compuesto lípido que contiene éster activo (N-hidroxisuccinimida éster de ácido palmítico (Sigma-Aldrich), o 4-nitrofenil éster de ácido láurico (TCI)) disuelto en DMF (N,N-dimetilformamida) bajo condiciones de condensación para sintetizar una cadena codificante con lípido modificado. Después de la reacción, la solución de la reacción se purificó mediante HPLC para remover los reactivos no deseados en la solución de reacción que contiene la cadena codificante con lípido modificado. La purificación HPLC se efectuó con el Amortiguador A: 100% 20 mM TEAA (pH 7.0) y el Amortiguador B: 70% CH_3CN /20 mM TEAA (pH 7.0) a un gradiente lineal de 10-100% de Amortiguador B durante un período de 50 minutos. Se utilizó CAP

CELL (4.6 x 150 mm, 5 μm; Shiseido) como la columna de purificación. La FIG. 2 muestra los resultados analíticos del HPLC de ejemplo. La cadena codificante modificada con lípido purificada mediante HPLC se liofilizó y se disolvió en agua purificada, después de lo cual la concentración y el rendimiento sintético de éstos se determinaron mediante análisis espectral UV.

Los modelos estructurales y los rendimientos de las cadenas codificantes modificadas con lípido resultante son como sigue.

27A1C16:	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{CUGGCCUUUCACUACUCCUACGAGCAC}-'$	Rend.	<u>83.20 %</u>
27A1C12:	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{CUGGCCUUUCACUACUCCUACGAGCAC}-'$		<u>49.02 %</u>
25A1C16:	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{CUGGCCUUUCACUACUCCUACGAGC}-3'$		<u>47.36 %</u>
23A1C16:	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{CUGGCCUUUCACUACUCCUACGA}-3'$		<u>28.14 %</u>
21A1C16:	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{CUGGCCUUUCACUACUCCUAC}-3'$	Rend.	<u>61.55 %</u>
21A2C16:	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{GGCCUUUCACUACUCCUACGA}-3'$	Rend.	<u>47.10 %</u>
21A2C12:	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{GGCCUUUCACUACUCCUACGA}-3'$	Rend.	<u>21.46 %</u>

Las cadenas codificantes con lípido modificado resultante fueron as con las Cadenas anticodificantes para producir los ARN bicatenario con modificado. Los ARN se cadena doble se formaron de acuerdo con el mis edimiento como se describió anteriormente, y se confirmaron durante 20% de electroforesis de gel de poliacrilamida. La Figura 1 muestra las estructuras de los ARN

bicatenario con lípido modificado. La Figura 1B, X es 16 cuando se liga con un derivado de ácido palmítico, y x es 12 cuando se liga a un derivado ácido láurico.

2. Resistencia a Enzima Degradativa de los ARN bicatenario de los lípidos Modificado

Se evaluó la resistencia de la nucleasa del 27nt dsARN de lípido modificado con (Ds 27A1C16/27B). Primero, el 27nt dsARN modificado con un lípido en el extremo 5' de la cadena codificante, ajustado a una concentración final 2µM, se incubó a 37°C en un medio RPMI-1640 (Invitrogen) que contiene 10% de FBS (Sanko Junyaku, Co., Ltd.) (Volumen final: 110 µl). después de 0 h, 0-5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h, y 48 h, cada 10 µl de alícuota se muestreo y se insertó en un tubo de muestra que contiene 2µl de un tinte de carga. Con el fin de detener posteriormente la reacción de degradación, la muestra fue tomada rápidamente Liofilizada en nitrógeno líquido y preservada a -20°C. El producto de muestra resultante se electroforizó sobre un gel de poliacrilamida al 20% a 250 V durante 70 minutos. El producto fue entonces entintado con un kit de teñido en plata (GE Health Care Bioscience) (ver el manual del producto para condiciones de teñido), y someterse a un análisis de gel sobre un Chemilmager 4000 (Alpha Innotech Corporation). Como comparaciones, 21siARN de 21 bases de largo (si 21A2/21B), que es generalmente de uso amplio, y el 27nt dsARN (DS 27A1/27B) fueron similarmente evaluadas por sus resistencias nucleasas. La Figura 3 muestra los resultados de la electroforesis de gel.

Como resultado, los 21siARN fueron rápidamente degradados en medio que contenía suero, y se confirmó la desaparición de estos en aproximadamente 1 a 2 horas. De otra parte, el 27nt de dsARN no modificado y el 27nt dsARN

modificado con lípido tuvo una resistencia a la nucleasa mucho mayor que aquella del 21siARN, y estos ARN bicatenarios aún permanecen después de 48 horas. Estos resultados conducen a un nuevo hallazgo de que el ARN bicatenario con lípido modificado poseía estabilidad in vivo marcadamente mayor que aquella del 21siARN que es generalmente de uso amplio.

3. Procesamiento Mediante Dicer de los ARN bicatenario con Lípido Modificado que Apunta el Gen de Luciferasa

Se evaluó procesar mediante el Dicer recombinante los ARN bicatenario sintetizados y los ARN bicatenario con lípido modificado. Los experimentos de clivaje Dicer fueron efectuados como sigue. Diez microlitros de 0.5 U de Dicer recombinante (Gene Therapy Systems) y los ARN bicatenario no modificados o los ARN bicatenario con lípido modificado o ajustado a una concentración final de 2μM en solución de 20 mM Tris-HCL (pH 8.0), 15mM NaCl, y 2.5 mM Mg₂Cl preparados en tubos de muestras, y luego las muestras fueron incubadas en una incubadora a 37°C durante 2 horas. Con el fin de detener posteriormente la reacciones de clivaje mediante el Dicer, se agregó 2μl de la solución de parada del Dicer (Gene Therapy Systems) en las soluciones de reacciones, seguido por la adición de 2μl de un tinte de carga. Los productos de muestra resultante fueron electroforizados sobre un gel de poliacrilamida al 20% a 250 V durante 70 minutos. Los productos fueron entonces secados con un kit de teñido de plata (GE Health Care Bioscience) (ver el manual del producto para condiciones de teñido), y sometido a análisis de gel sobre un Chemilmager 4000 (Alpha Innotech corporation). Como un control, 21siARN (si21A2/21B) también se analizó mediante electroforesis de gel. Los resultados se muestran en la Figura 4.

Los resultados mostraron que, entre los ARN bicatenario en los cuales las cadenas codificantes de los Ds ARN (Ds 27A1/27B, Ds 25A1/25B, Ds 23A1/23B, y Ds 21A1/21B) se modificaron con un lípido, se observaron bandas con Ds 27A1c16/27B y Ds 27A1C12/27B en posiciones similares al 21siARN no modificado por la acción de un Dicer recombinante, indicando fuertemente así la producción de los siARN de 21 bases de largo que contiene un extremo en suspensión de dos bases mediante el clivaje base.

También con Ds 25A1C16/25B y Ds 23A1C16/23B, se observaron nuevas bandas en posiciones similares al 21siARN en la presencia del Dicer, revelando que ellos fueron procesados por el Dicer. Con Ds 21A1C16/21B, de otro lado, no se observó ningún cambio significativo en la presencia del Dicer, revelando que este no fue procesado por el Dicer.

Más aun, procesado por el Dicer los ARN bicatenario, en los cuales las cadenas codificantes de los RO 27A1/25B, RO 25A1/23B, RO 23A1/23B y RO 21A1/19B) contiene cada uno un extremo en suspensión de dos bases sobre la región de extremo 3' de la cadena codificante fueron modificada con un lípido, fue similarmente evaluada. Como resultado, con los tres tipos, es decir, RO 27A1C16/25B, RO 25A1C16/23B, y RO 23A1C16/21B, fueron observadas bandas en posiciones similares al 21siARN en la presencia del Dicer, revelando que ellos fueron procesados por el Dicer. El RO 27A1C16/25B, RO 25A1C16/23B en particular, demuestran efectos de procesamiento significativos mediante el Dicer. Con un 21A1C16/19B relativamente corto, de otro lado no se observó ningún cambio, en el ARN bicatenario aún en la presencia del Dicer, sugiriendo que este no fue procesado por el Dicer. Adicionalmente, el procesamiento por Dicer de los ARN bicatenario en el cual las cadenas codificantes de los RO ARN (RO 27A1/23B y RO 25A1/21B) que contienen los extremos en suspensión para las cuatro

bases sobre la región de extremo 3' de la cadena codificante fueron modificados con un lípido, así como también un ARN bicatenario en el cual la cadena codificante del RO ARN (RO 27A1 /21B) que contiene el extremo en suspensión de seis bases sobre la región de extremo 3' de la cadena codificante se evaluó la cadena codificante del RO ARN (RO 27A1 /21B) que contiene un extremo se modificó con lípido. Como resultado, todos los RO ARN anteriormente mencionados fueron procesados por Dicer, y se observaron nuevas bandas en las mismas posiciones que el 21nt siARN.

Adicionalmente, el procesamiento de Dicer de los ARN bicatenarios en los cuales de las cuales las cadenas codificantes RO ARN (RO 25A1 /27B, RO 23A1 /25B y RO 23A1 /27B) que contiene un extremo en suspensión sobre la región de extremo 5' de la cadena anticodificante se modificaron con un lípido fueron similarmente evaluados. Como resultado, con algunos de los RO ARN con lípido codificado que contienen el extremo de suspensión sobre la región de extremo 5' de la cadena anticodificante, se observaron nuevas bandas en razón del procesamiento por Dicer; sin embargo se observaron bandas al mismo tiempo en posiciones similares a aquellas observadas en ausencia de Dicer, revelando que la tasa de procesamiento mediante Dicer fue más lenta que la tasa de procesamiento para los Ds ARN y los otros RO ARN.

4. Inhibición de la Expresión del Gen de Luciferasa Mediante los ARN bicatenarios Modificados con Lípido

Los efectos de interferencia de los ARN bicatenarios no modificados sintetizados y los ARN bicatenarios con lípido modificado fueron evaluados utilizando Renilla luciferasa como un blanco. Las células Hela (células de cáncer

cervical humano; institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University) ajustados a 1×10^5 células/ml antes de los experimentos fueron sembrados sobre placas de 96 pozos a 100 μ l por pozo, e incubados a 37°C durante toda la noche. Al siguiente día, se removió el medio viejo sobre el pozo, y se agregó un nuevo medio libre de antibiótico a 80 μ l, y una solución de complejo de un vector que comprende las luciferasas de luciérnaga y Renilla (psiCHECKTM -2 Vector; Promega y LipofectaminaTM 2000 (nombre comercial; Invitrogen) se agregó 10 μ l por pozo que contiene las células HeLa. El vector de expresión se ajustó a 0.02 μ g por pozo, y la lipofectaminaTM 2000 se ajustó a 0.2 μ g por pozo, y OptiMem (Invitrogen) se utilizó para ajustar el volumen a un nivel necesario. Para formar un complejo, el vector de expresión y la lipofectaminaTM 2000 se mezclaron utilizaron OptiMem, y luego se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la adición de la solución del complejo, las células fueron incubadas a 37°C durante 4 horas en la presencia de CO₂ al 5%. Después de la incubación, los ARN bicatenario no modificados y los ARN bicatenario modificados con un lípido en el extremo, que contiene la secuencia contra sentido homologa a la secuencia del gen de la luciferasa de Renilla, fueron puestos en complejo con lipofectaminaTM 2000 (Invitrogen) a concentraciones finales de 0 nM, 0.2 nM, 0.5 nM, 1 nM, 2 nM, 5 nM, y 10 nM, y 10 μ l cada una de las soluciones del complejo resultantes se agregó a las células HeLa en las cuales se introdujo el vector de expresión. El volumen final por pozo fue de 100 μ l. la solución del complejo de cada ARN y la lipofectaminaTM 2000 se preparó al mezclar la solución de ARN acuoso a 5 μ l por pozo y una solución de lipofectaminaTM 2000 (0.2 μ L) y OptiMem a 5 μ l por pozo, incubando la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la introducción del ARN, las células fueron incubadas durante 48 horas, y los niveles de la expresión de luciferasa de luciérnaga y Renilla fueron ensayados utilizando un sistema de ensayo de luciferasa Dual-

GloTM (Promega) y un luminómetro (Microumat LB 96P; Berthold) y los efectos inhibitorios de la expresión de la luciferasa de Renilla fueron determinado con base en el nivel de la expresión de luciferasa de luciérnaga como un control.

La Figura 5 muestra los efectos inhibitorios sobre la expresión del gen logrados cuando la concentración de los ARN de cadena no modificados y los ARN bicatenario con modificado con lípido fue de 0.2 nM. Como resultado, se encontró que cuando los ARN bicatenario que contiene un extremo del lado del extremo 5' de la cadena codificante, tal como los Ds ARN y los RO ARN, fueron modificados con un lípido, estos ARN bicatenario demostraron efectos de interferencia del ARN dramáticamente mejorados sobre los efectos suministrados por los ARN de cadena que tenían la misma estructura pero que no fueron modificados con un lípido. También se encontró que tales efectos de interferencia altos de la ARN fueron logrados, sin importar la longitud de la cadena o la posición del extremo de suspensión del RO ARN, al modificar el extremo 5' de la cadena codificante con un lípido, comparado con el RO ARN no modificado con la misma estructura. Estos resultados condujeron a un nuevo hallazgo de que los efectos de interferencia del ARN se puede mejorar dramáticamente al modificar con un lípido de extremo 5' de la cadena codificante de las moléculas con interferencia de ARN que contiene el extremo truncado del lado del extremo 5' de la cadena codificante tales como la Ds ARN y los RO ARN. Tradicionalmente, el si 21A2C16/21B y si 21A2C12/21B en el cual el extremo 5' de la cadena codificante del 21nt si ARN se modificó con un lípido, también se encontró que se demostraron los efectos de interferencia del ARN mayores que los efectos suministrados mediante el 21nt si ARN modificado.

5. Efectos de la Interferencia de los ARN bicatenario Modificado con Lípido que Apuntan a los Genes de Luciferasa (Sin Utilizar un Reactivo de Transfección de Gen)

Los ARN bicatenario modificados con lípido se transfectaron en célula solas sin utilizar los reactivos de transfección del gen tales como Lipofectamina™ 2000 o similares, y se evaluaron sea que ellos demostraran o no efectos de transferencia del ARN.

Las células HeLa (células de cáncer cervical humana; Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University) se ajustaron a 1×10^5 células/ml antes de que los experimentos fueran sembrados en una placa de 96 pozos a 100 µl por pozo de incubado 37°C toda la noche. Al día siguiente, el medio viejo sobre el pozo fue removido, un nuevo, medio libre de antibióticos agregando 80µl por pozo, y la solución del complejo de un vector que expresa la luciferasa de luciérnaga y Regilla (psiCHECK™ -2 Vector; Promega) y Lipofectamina™ 2000 (nombre comercial; Invitrogen) se agregó 10µl por pozo que contiene las células HeLa. El vector de expresión se ajustó a 0.02 µg por pozo, y la lipofectamina™ 2000 se ajustó a 0.2 µg por pozo, y OptiMem (Invitrogen) se utilizó para ajustar el volumen a un nivel necesario. Para formar un complejo, el vector de expresión y la lipofectamina™ 2000 se mezclaron utilizaron OptiMem, y luego la mezcla se incubo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la adición de la solución del complejo, las células fueron incubadas a 37°C durante 4 horas en la presencia de CO₂ al 5%. Cada pozo fue entonces lavado con 100 µl del medio tres veces para remover la lipofectamina™ 2000 del pozo. Un medio que contiene 90 µl de antibiótico fue posteriormente agregados a las células y los ARN bicatenarios no modificado y los ARN bicatenario modificados

con lípidos que contienen la secuencia contra sentido homologa a la secuencia del gen de la luciferasa de Renilla, se ajustaron con el OptiMem para preparar las muestras a concentraciones finales de 0 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 600 nM, 800 nM y 1µl y 10µl cada una las muestras resultantes se agregó a las células, que fueron entonces encubadas a 37°C durante 48 horas. Los niveles de expresión de luciferasa de luciérnaga y Renilla fueron ensayados utilizando un sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo™ (Promega) y un luminómetro (MicroLumat LB 96P; Berthold). Como comparaciones, también se evaluaron 21nt siARN no modificado (si 21A1/21B) y 27nt dsARN (Ds 27A1/27B) por sus efectos de interferencia al ARN bajo las mismas condiciones que se describieron anteriormente.

Los efectos de interferencia del ARN se determinaron al evaluar el nivel de expresión de luciferasa de Renilla sobre el nivel de expresión de luciferasa de luciérnaga como un control. La Figura 6A muestra resultados para el si 21A2/21B, Ds 27A1/27B y Ds 27A1C16/27B cuando la concentración final fue de 50nM a 1µM, y la Figura 6B muestra los resultados para Ds 23A1/23B y Ds 23A1C16/23B cuando la concentración final fue de 25nM a 800 nM. Como resultado, se reveló que el Ds 27A1C16/27B y Ds 23A1C16/23B modificado con ácido palmítico de la región de extremo 5' de la cadena codificante suprimió la expresión de luciferasa de Renilla, dependientemente de la concentración del ARN bicatenario; de esta manera, estos ARN bicatenario, en razón a que ellos fueron modificados con ácido palmítico, se transfectaron a las células solas y de esta manera produjo las reacciones de interferencia de ARN. de otro lado, los ARN bicatenario no modificados (si 21A2/21B, Ds 27A1/27B y Ds 23A1C16/23B) no demostraron efectos inhibitorios de la expresión del gen significativos a un a altas concentraciones. Esto confirmo adicionalmente que los ARN bicatenario modificado con ácido palmítico tuvieron una eficiencia de toma celular

marcadamente superior, y demostraron una excelente capacidad para inhibir la expresión de gen sin utilizar un reactivo de transfección de gen.

6. Evaluación de la Eficiencia de Tomas Celular de los ARN bicatenarios Modificados con Lípido

Célula HeLa (células de cáncer cervical humana; Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University) , las células A549 (células de cáncer de pulmón humano; Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University), y las células SH10-TC (células de cáncer estomago humano; Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University), se ajustaron a 1×10^5 células/ml antes de los experimentos, así como también las células Jurkat (células de leucemia linfática aguda); Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University) y las células K-562 (células de leucemia mielogena crónica), ajustadas a 2×10^5 células/ml antes de los experimentos fueron sembradas sobre empaques de 24 pozos a 1mL por pozo, las células se incubaron en un medio que contenía 10% de suero bobino fetal (FBS; Sanko Junyaku, Inc.) y antibióticos a 37°C en la presencia del 5% de CO² .con relación al antibiótico y al medio utilizado aquí, el antibiótico fue una estreptomycinina para todas las células, el medio fue un medio MEM (Invitrogen) para la células HeLa, y un medio RPMI-1640 (Invitrogen) para las otras células. Antes de la transfección de los oligonucleótidos fluorescentemente marcados, estos medios fueron remplazados con un medio libre de antibiótico (450 µl). Los oligonucleótidos fueron marcados con 6-FAM en la región de extremo 5' de la cadena anticodificante 27nt fueron utilizados como oligonucleótidos fluorescentemente marcados, y los oligonucleótidos fueron pareados con las cadenas codificantes 27nt no modificada o la cadena codificante 27nt modificada con un lípido que su región de extremo 5'para formar cadenas

dobles. Los experimentos de eficiencia de toma celular se efectuaron como sigue. Para formar un complejo de los oligonucleótidos y la lipofectaminaTM 2000 (Invitrogen) marcada fluorescentemente, 50µl de una solución mezclada obtenida al combinar 25µl de una solución mezclada de 10µl de una solución de 10µl de oligonucleótido fluorescentemente marcado acuoso y 15µl de la solución de OptiMem con 25µl de una solución marcada de 2µl de la solución de lipofectaminaTM 2000 (Invitrogen) y 23µl de la solución de OptiMem se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cuando la lipofectaminaTM 2000 (Invitrogen) no se utilizó (Sección F en la Figura 7; -LF2000), La solución de OptiMem se utilizó en lugar de 2 µl de la solución de lipofectaminaTM 2000, y las mezclas se prepararon de acuerdo con el mismo procedimiento anterior. Los 50 µl resultantes del complejo de oligonucleótido fluorescentemente marcado se agregaron a 450 µl de células preparadas anteriormente (la concentración final de los ARN bicatenario: 200 nM), y se incubaron a 37°C durante 4 horas en la presencia de CO₂ al 5%. Las células fueron lavadas posteriormente con PBS (-) o el medio tres veces, y la eficiencia de la toma celular, de los ARN bicatenario se evaluó utilizando una microscopia de laser de fluorescencia confocal y citometría de flujo.

En la evaluación utilizando un microscopio laser fluorescente confocal, se utilizó un sistema Radiance 2000 (Bio Rad), y se observó fluorescencia utilizando un láser argón. En la citometría de flujo, la eficiencia de la toma celular por 10.000 conteos de células se midió utilizando un citómetro coulter EPICS XL (Beckman coulter). El software XL EXPO32TM (Beckman coulter) se utilizó en los análisis de citometría de flujo.

Los resultados son mostrados en las figuras 7-1 a 7-3. La sección F (-LF2000) de la figura 7-3 muestra los resultados cuando es utilizado el lipofectaminaTM 2000, y la sección A a E (+LF2000) en las figuras 7-1 a 7-3 muestran los resultados cuando se utilizó lipofectaminaTM 2000 como un reactivo de transfección de gen. La sección A en la figura 7-1 muestra los resultados de la eficiencia de la toma celular de los varios ARN bicatenario en las células Hela, utilizando lipofectaminaTM 2000 como un reactivo de transfección de gen; la sección B muestra en la figura 7-1 los resultados para las células A549, la sección C de la figura 7-1 muestra los resultados para las células SH10-TC; la sección D en la figura 7-2 muestra los resultados para las células K-562; y la sección E en la figura 7-3 muestra los resultados para las células Jurkat. La sección F en la figura 7-3 muestra los resultados de la eficiencia de la toma celular de varios ARN bicatenario en células Hela sin utilizar un reactivo de transfección de gen comercialmente disponible. Consecuentemente, la transfección de los ARN bicatenario no modificados y los ARN de cadena modificados con lípido en todas las células (células Hela, células A549, células SH10-TC, células jurkat, y células K-562) se confirmaron en presencia de lipofectaminaTM 2000. Particularmente con el 27A1C16/27B modificado con ácido palmítico en el extremo 5' de la cadena codificante, una eficiencia muy alta de la toma celular se observó utilizando microscopia de laser con fluorescencia con focal y citometría de flujo, es comparado a ARN bicatenario no modificada y el ARN bicatenario modificado con ácido láurico. Adicionalmente, la observación utilizando una microscopia laser de fluorescencia con focal sugirió que el ARN doble de cadena modificado con ácido palmítico fuera localizado en el citoplasma de las células. En las células adherentes (células Hela, células A549, y las células SH10-TC) en particular, esta eficiencia de la toma fue notablemente evidente. Adicionalmente, el análisis citométrico de flujo confirmo que el ARN bicatenario modificado con ácido

palmítico demostró una eficiencia de toma celular mayor que el ARNB no modificado en la presencia de lipofectaminaTM 2000. Estos resultados condujeron a un nuevo hallazgo que cuando el ARN bicatenario está covalentemente ligado con un lípido tal como un ácido palmítico o el similar en la región de extremo 5' de la cadena codificante, el ARN bicatenario demostró eficiencia en la toma de muestra celular dramáticamente mejorada y se puede localizar en el citoplasma de las células.

Ejemplo 2: efectores inhibitorios de los ARN de cadenas dobles modificados con lípidos sobre la expresión de gen VEGF

1. Síntesis de los ARN bicatenario modificados con lípidos que apuntan al gen de VEGF

1-1. secuencias de cadenas codificantes y Cadenas anticodificantes

Los ARN bicatenario, que contienen una cadena codificante de 27 o 21 bases de largo y una cadena con contra sentido que tiene 27 o 21 bases de largo se designaron teniendo una secuencia homologa al VEGF (el factor de crecimiento endotelial vascular) y capaz de suprimir la capacidad de expresión del gen VEGF. Los siguientes experimentos fueron conducidos utilizando estos ARN bicatenario. El 27nt de ARN es un ARN de cadena completamente doble que contiene un extremo en suspensión (una región de cadena única) (es decir, un ARN bicatenario que tiene los extremos truncados tanto de los lados de los extremos 5' de la cadena codificante), y el 21siARN bicatenario que contiene 2 extremos en suspensión base sobre los extremos 3' tanto de la cadena codificante

como contra sentido. Consecuencias del 27nt dsARN y 21siARN utilizada como sigue.

27nt dsARN:

Cadena codificante: v27A: 5' –CUUCCUACAAGCACAACAAAUGUGAAUA-3'
(SEQ ID NO: 10)

Cadena anticodificante: v27B: 3' –GAAGGAUGUCGUGUUGUUUACACUUAC-5'
(SEQ ID NO: 11)

21 siARN:

Cadena codificante: v21A: 5' –UCCUACAGCACAACAAAUGUG-3' (SEQ IN NO: 12)

Cadena anticodificante: v21B: 3' GAAGGAUGUCGUGUUGUUUAC-5' (SEQ ID NO: 13)

1-2. síntesis de los ARN bicatenario no modificados con lipido que apuntan al gen de VEGF

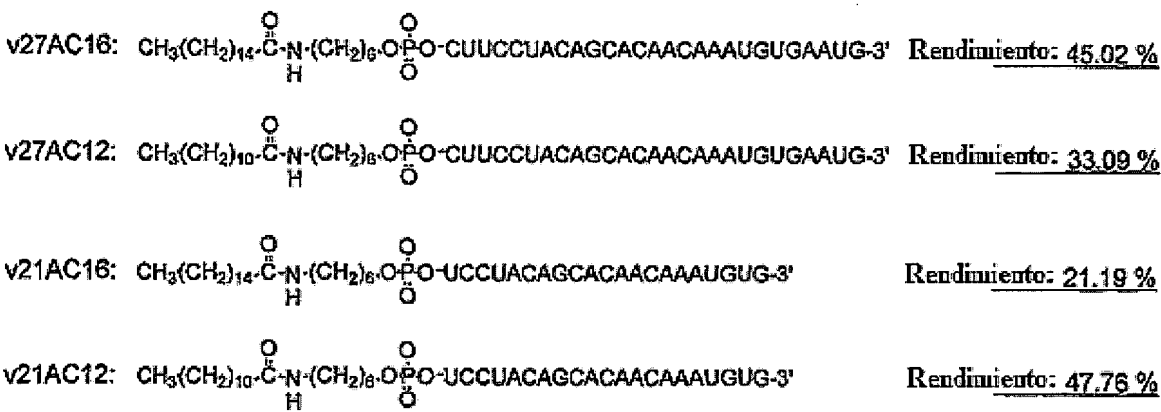
Las cadenas codificantes anteriormente mencionadas y las cadenas contrasentido fueron hibridizadas de la misma manera que el ejemplo 1 para formar cadenas doble, produciendo de esta manera ARN de cadenas doble no modificados con lípido.

Transformación de las cadenas dobles se confirmó mediante electroforesis de gel de acrilamida al 20% de acuerdo con el mismo procedimiento del ejemplo 1.

1-3. síntesis de los ARN bicatenario modificados con lípido que apuntan al gen de VEGF

Los ARN bicatenario modificado con lípido en los cuales un lípido se ligó al extremo 5' de las cadenas codificantes de los ARN bicatenario mencionados anteriormente capaces de inhibir el gen VEGF se sintetizaron. En los ARN bicatenario modificados con lípido, el lípido fue covalentemente unido por vía del grupo aminoalquilo (modificador amino C6; Glen Research) ligado al extremo 5' de la cadena codificante anteriormente mencionada. Los ARN de cadena única modificados con lípido (Cadenas codificantes) fueron sintetizados de acuerdo al mismo procedimiento del ejemplo 1.

Los modelos estructurales y los rendimientos de los ARN modificados con lípido que apuntan a el gen VEGF fueron como sigue.



Las cadenas codificantes modificadas con lípido resultantes fueron pareadas con Cadenas anticodificantes para producir los ARN bicatenario modificados con lípido. La formación de cadenas doble se confirmó mediante electroforesis de gel de acrilamida al 20% de acuerdo al mismo procedimiento del ejemplo 1. En la

figura 8 muestra las estructuras de los ARN bicatenario modificados con lípido. En los ARN modificados con lípido apuntan al gen de VEGF, los momentos de elusión también fueron los mismos substancialmente que el ejemplo 1.

2. procesamiento mediante Dicer en los ARN bicatenario modificados con lípido que apuntan al gen VEGF

El procesamiento mediante el Dicer recombinante de los ARN bicatenario modificados con lípido y los ARN bicatenario modificados con lípido se evalúa. Los experimentos de clivaje Dicer fueron efectuados de acuerdo al mismo procedimiento del ejemplo 1. Los resultados se muestran en la figura 9.

Como resultado, con los Ds v27AC16/v27B y Ds v27AC12/v27B se preparan bandas en posiciones diferentes al 21siARN modificado mediante la acción de un Dicer recombinante, indicando fuertemente así la producción de los siARN de 21 bases de largo que contienen un extremo en suspensión 2 bases mediante el clivaje Dicer. Estos resultados establecieron que unir un lípido al extremo 5' de la cadena codificante del 27nt dsARN no impide el procesamiento Dicer. Con el si v21AC16/v21B y si v2AC12/v21B, de otro lado, no se observó ningún cambio en la presencia del Dicer, es comparado con cuando el Dicer estaba ausente, revelando que ellos no fueron procesados por el Dicer.

3. inhibición del gen de expresión VEGF mediante ARN bicatenario modificados con lípido

El 21nt siARN con todos los extremos no modificados, el 27nt dsARN con los extremos no modificados, el 27nt dsARN modificado con un lípido en el extremo 5' de la cadena codificante (27nt dsARN modificado con un lípido en el

extremo), y el 21nt siARN modificado con un lípido en el extremo 5' de la cadena codificante (21nt siARN modificado con un lípido en el extremo) se evaluaron por sus efectos inhibitorios sobre la expresión del gen VEGF, utilizando células Hela (células de cáncer cervical humana; Institute Of Development, Aging and Cancer, Tohoku University), células A549 (células de cáncer de pulmón humano; Institute Of Development, Aging and Cancer, Tohoku University), células SH10-TC (células de cáncer de estómago humano; Institute Of Development, Aging and Cancer, Tohoku University), células Jurkat (células de leucemia linfática aguda; Institute Of Development, Aging and Cancer, Tohoku University), y las células K-562 (células de leucemia mielogena crónica; Institute Of Development, Aging and Cancer, Tohoku University). Además, los ARN bicatenario que no tienen un homólogo de la secuencia al gen VEGF (27nt dsARN (Random) y 21nt siARN (Random)), así como también los ARN bicatenario modificado con lípido los cuales el lípido estuvo ligado al extremo 5' de las cadenas codificantes de estos ARN bicatenario, fueron evaluados de manera similar.

Los experimentos fueron efectuados de acuerdo con los siguientes procedimientos. Las células Hela, las células A549, y las células SH10-TC se ajustaron a 1×10^5 células/ml antes de los experimentos, así también como las células Jurkat y las células K-562 se ajustaron a 2×10^5 células/ml antes de los experimentos, fueron sembradas sobre placas de 24 pozos a 500 μ l por pozo, y fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. Al siguiente día, se removió el medio viejo sobre los pozos, y se agregó un medio libre de antibiótico nuevo a 450 μ l por pozo. El medio MEM se utilizó para las células Hela, y el medio PRMI-640 se utilizó para las otras células. Un complejo de los ARN bicatenario modificados o no modificados con lípido (25 μ l) que contienen una secuencia contra sentido homóloga a la secuencia del gen VEGF con una solución lipofectamina™ 2000

(Invitrogen) (25 µl) se formó, y entonces 50 µl de cada una de las soluciones de ARN bicatenario se agregó a 450 µl de cada una de las células anteriormente mencionadas. El volumen final por pozo fue de 500 µl por pozo. La solución del complejo de cada ARN la solución de lipofectaminaTM 2000 se preparó al mezclar la solución de ARN acuoso a 25 µl por pozo y una solución de lipofectaminaTM 2000 (2 µl) y OptiMem a 25 µl por pozo, he incubando la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la introducción del ARN, las células fueron incubadas a 37°C durante 48 horas en la presencia de CO₂ al 5%. Después de la incubación las células fueron lavadas con PBS (-) 3 veces y el ARN total en las células se extrajo utilizando un kit RNeasy plus mini (Quiagen). Las reacciones RT-PCR fueron posteriormente efectuadas para medir la cantidad de mRNA en VEGF. El kit de RT-PCR Quiagen OneStep (Quiagen) se utilizó para la reacción de RT-PCR, y 5' -CCC TGA GAT CGA GTA CAT CTT-3' (SEQ ID NO: 14) y 5' -ACC GCC TCG GCT TGT CAC-3' (SEQ ID NO: 15) se utilizaron como los cebadores de PCT para el VEGF. Como un control, el GAPDH se midió con el mismo procedimiento. 5' -GGAAAGCTGTGGCGTGATG-3' (SEQ ID NO: 16) y 5'-CTGTTGCTGTAGCCGTATTC-3' (SEQ ID NO: 17) se utilizaron como los cebadores para GAPDH. Las reacciones RT-PCR se efectuaron como sigue. En la reacción RT (Transcripción Reversa) se efectúa a 50°C durante 30 minutos, la reacción PCR que involucro 25 a 28 ciclos repetidos (dependiendo de las células utilizadas) de una reacción de separación bicatenario a 92°C durante 30 segundos, una reacción de hibridación a 55°C durante 30 segundos, y una reacción de elongación a 68°C durante 45 segundos, se efectuó. Lastimosamente, se efectuó la incubación a 68°C durante 10 minutos, la temperatura disminuyo a 4°C, y se completó la reacción. Los reactivos, ARN total, cebadores y los similares utilizados en el RT-PCR se prepararon de acuerdo con las condiciones de reacción del kit RT-PCR Quiagen OneStep Quiagen (Quiagen). Después de las

reacciones RT-PCR, se agregaron 2 µl del tinte de carga y los productos RT-PCR derivados de los mARN del VEGF y el GAPDH se confirmaron utilizando un gel de agarosa al 2%. Los efectos inhibitorios sobre la expresión del gen se evaluaron al medir el gen de expresión VEGF en las células en las cuales se transfectaron los ARN bicatenario (tanto los no modificados como modificados), asumiendo que el nivel de expresión del gen VEGF en las células de control (células en las cuales los ARN bicatenario no se transfectaron) fue del 100%. El error en los niveles de expresión de las células estuvo correctamente basado en el nivel de expresión del gen de control (GAPDH).

Las figuras 10-1 a 10-3 muestran los resultados de los efectos de interferencia del ARN de los ARN bicatenario no modificados y los ARN bicatenario modificados con lípido cuando el gen VEGF fue el blanco y la concentración de los ARN bicatenario fue de 200 nM. La grafica A de la figura 10-1 muestra los efectos inhibitorios de los ARN bicatenario no modificados y los ARN bicatenario modificados con lípido sobre la expresión del gen VEGF en las células Hela; grafica B la figura 10-2 muestra los resultados para las células A549; la gráfica C en la figura 10-2 muestra los resultados para las células SH10-TC; la gráfica D en la figura 10-3 muestra los resultados para las células Jurkat; y la gráfica E en la figura 10-3 muestra los resultados para las células K-562. Estos resultados revelaron que el Ds v27AC16/v27B y Ds v27AC12/v27B, se obtuvo cada uno al modificar el extremo 5' de la cadena codificante de los ARN de la cadena doble con 27 base de largo (Ds v27A/v27B) con un lípido, así como también el si v21AC16/v21B y si v21AC12/v21B, obtenido cada uno al modificar el extremo 5' de la cadena codificante del ARN con cadena doble de 21 bases de largo (si v21A/v21B) con un lípido, poseía efectos inhibitorios muy altos sobre la expresión del gen VEGF, comparado con los ARN bicatenario no modificados (si

v21A/v21B y Ds v27A/v27B). El Ds v27AC16/v27B modificado con ácido palmítico, en particular, demostró efectos inhibitorios marcadamente mayores sobre la expresión del gen par todas las células (las células Hela, las células A549, las células SH10-TC, las células Jurkat, y las células K-549), comparado con los ARN bicatenario no modificados (si v21A/v21B y Ds v27A/v27B). Esto confirmo que los efectos de interferencia del ARN se pueden mejorar dramáticamente al modificar los ARN bicatenario con los lípidos tal como ácido palmítico y similares. Los ARN bicatenario no modificados y los ARN bicatenario modificados con lípido no tienen una secuencia homologa al gen VEGF también fueron evaluados de manera similar por sus efectos inhibitorios sobre la expresión del gen, pero ninguno de los ARN bicatenario demostraron ningún efecto inhibitorio significativo sobre el gen VEGF. Estos resultados revelaron que los ARN bicatenario apuntados al VEGF utilizados aquí inhibieron la expresión del gen objetivo de una manera altamente especifica de secuencia, y también sugirieron que los efectos colaterales sobre las células se pueden reducir al ligar un lípido a los ARN bicatenario.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra las estructuras de los ARN bicatenario no modificados y modificados con lípido sintetizados en el ejemplo 1.

La figura 2 muestra los resultados del análisis HPLC realizados sobre los ARN de cadena única modificados con lípido en el ejemplo 1.

La figura 3 muestra las resistencias a las nucleasas de los ARN bicatenario modificados con lípido del extremo 5', que fueron medidos en el ejemplo 1.

La figura 4 muestra los resultados de la evaluación del procesamiento mediante Dicer de cada uno de los ARN bicatenario modificados con lípido en el ejemplo 1.

La figura 5 muestra los resultados de evaluación de la interferencia de los ARN en los 27nt dsARN modificados con lípido a una concentración de 0.2 nM en el ejemplo 1.

En la figura 6 se muestran los resultados de la evaluación de los efectos de interferencia de los ARN bicatenario modificados con lípido en el extremo 5' (sin utilizar un agente de transferencia de gen) en el ejemplo 1.

En la figura 7-1 se muestra los resultados de evaluación de la toma celular de los ARN bicatenario modificados con lípido en las células Hela y A549 en el ejemplo 1; en donde "FL" denota imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia; "Trans" denota imágenes tomadas con un microscopio de contraste de fase en el mismo campo de la visión de aquel de las imágenes de FL; y "Merge" denota imágenes en las cuales la imagen FL y la imagen Trans fueron súper impuestas.

La figura 7-2 muestra los resultados de evaluación de la toma celular de los ARN bicatenario modificados con lípido en las células SH10-TC y K-562 en el ejemplo 1; en donde "FL" denota imágenes tomadas con un microscopio de contraste de fase en el mismo campo de la visión de aquel de las imágenes de FL; y "Merge" denota imágenes en las cuales la imagen FL y la imagen Trans fueron súper impuestas.

La figura 7-3 muestra los resultados de evaluación de la toma celular de los ARN bicatenario modificados con lípido en las células Jurkat y Hela en el ejemplo 1; en donde "FL" denota imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia; "Trans" denota imágenes tomadas con un microscopio de contraste de fase en el mismo campo de la visión de aquel de las imágenes de FL; y "Merge" denota imágenes en las cuales la imagen FL y la imagen Trans fueron súper impuestas.

La figura 8 muestra las estructuras de los ARN bicatenario no modificados y modificados por lípido sintetizados en el ejemplo 2.

La figura 9 muestra los resultados de evaluación del procesamiento mediante Dicer de cada uno de los ARN bicatenario modificados con lípido en el ejemplo 2.

La figura 10-1 muestra los resultados de evaluación de los efectos de interferencia de los ARN bicatenario modificados con lípido sobre el gen VEGF en las células Helas en el ejemplo 2.

La figura 10-2 muestra los resultados de evaluación de los efectos de interferencia de los ARN bicatenario modificados con lípido sobre el gen VEGF en A549 y las células SH10-TC en el ejemplo 2.

La figura 10-3 muestra los resultados de evaluación de los efectos de interferencia de los ARN bicatenario modificados con lípido sobre el gen VEGF en las células Jurkat y K-567 en el ejemplo

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

1. Un ARN bicatenario modificado con lípido que comprende una cadena anticodificante que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia objetivo en un gen objetivo, y una cadena codificante que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la cadena anticodificante,

y el ARN bicatenario es capaz de inhibir la expresión del gen objetivo, y la cadena codificante que tiene un lípido ligado a por lo menos uno del primero al sexto nucleótido del extremo 5' directamente o por vía de un ligador, y el lípido es un ácido graso que comprende de 6 a 50 átomos de carbono.
2. Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene un extremo truncado en el extremo 5' de la cadena codificante, y tiene un extremo truncado o tiene un extremo en suspensión en el extremo 3' de la cadena codificante.
3. Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene extremos en suspensión en los extremos 5' y 3' de la cadena codificante.
4. Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la cadena codificante consiste de 21 a 27 nucleótidos.

5. Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con la reivindicación 2 que tiene extremos truncados tanto en el extremo 5' como en el 3' de la cadena codificante, y en la cual cada una de las cadenas codificantes y anticodificantes consiste de 27 nucleótidos.
6. Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con la reivindicación 2 que tiene extremos truncados tanto en el extremo 5' como en el 3' de la cadena codificante, y en la cual cada una de las cadenas codificantes y anticodificantes consiste de 23 nucleótidos.
7. Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con la reivindicación 2 que tiene extremos truncados en el lado 5' de la cadena codificante, y la cadena codificante consiste de 25 nucleótidos y la cadena anticodificante consiste de 23 nucleótidos.
8. Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con la reivindicación 3 en donde cada una de las cadenas codificantes y anticodificantes consiste de 21 nucleótidos.
9. Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde el lípido es ácido láurico, es ácido esteárico, ácido mirístico, o ácido palmítico.
10. Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en donde el lípido está ligado a por lo menos uno del primero al sexto nucleótidos desde el extremo 5' de la cadena

codificante por vía de un ligador, siendo el ligador representado por la formula estructural:



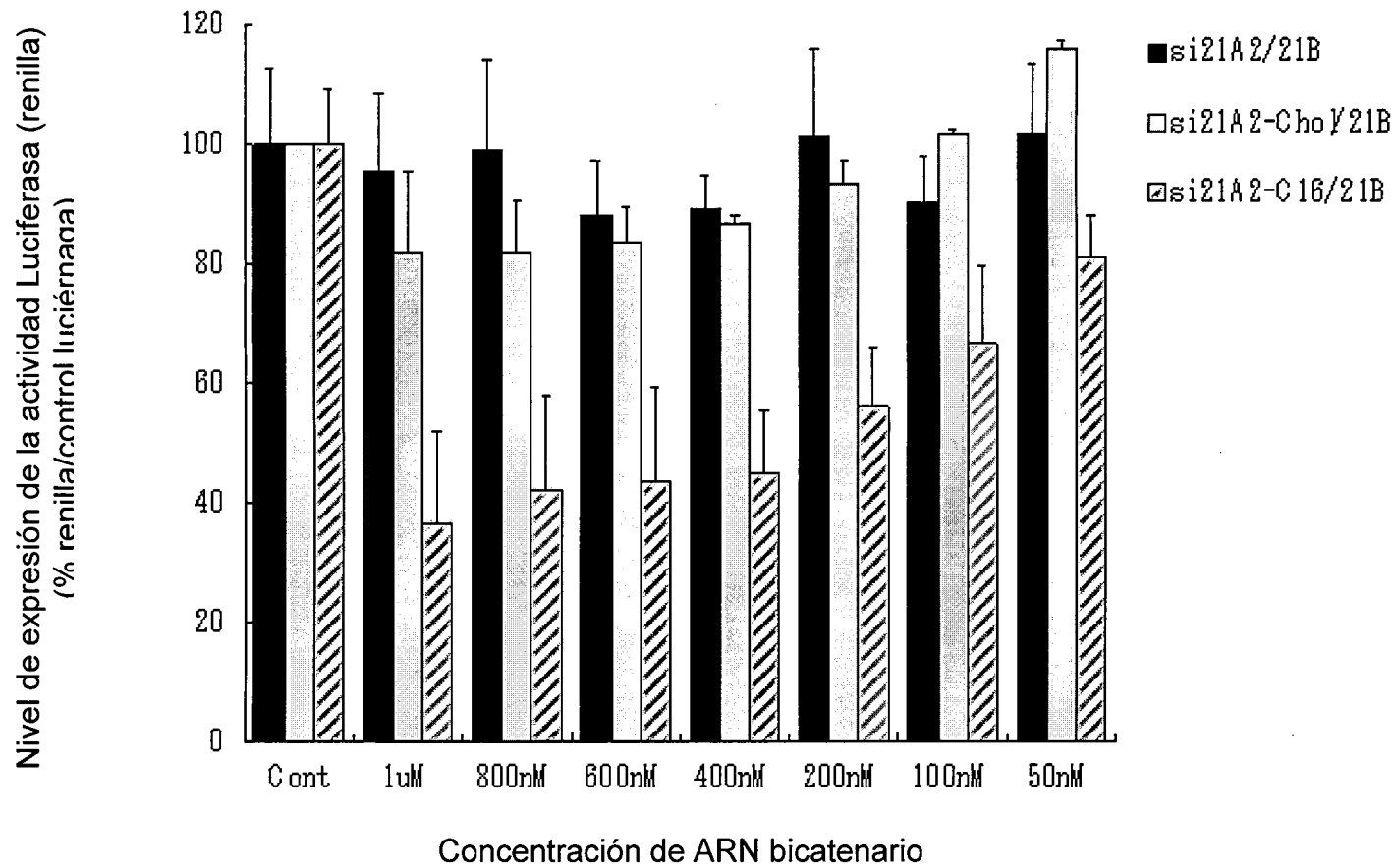
en donde (nl) es un entero de 1 a 40.

11. Una composición farmacéutica que comprende el ARN bicatenario modificado con lípido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en una proporción de 0.001 a 50, o más preferiblemente de 0.01 a 10, y todavía más preferiblemente de 0.1 a 1 y una base farmacéuticamente aceptable en una proporción de 50 a 99.99% (p/p), preferiblemente de 90 a 99.99% (p/p) y todavía más preferiblemente de 99 a 99.99% (p/p), con base en el peso total de la composición.
12. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la base farmacéuticamente aceptable puede ser seleccionada de: agua purificada, soluciones acuosas de azúcar, soluciones tampón fisiológica salina, soluciones acuosas de polímero, Rnase libre de agua, entre otros.

63
6

GRÁFICAS DE RESULTADOS EXPERIMENTALES-TEST COMPARATIVO

1



2

