

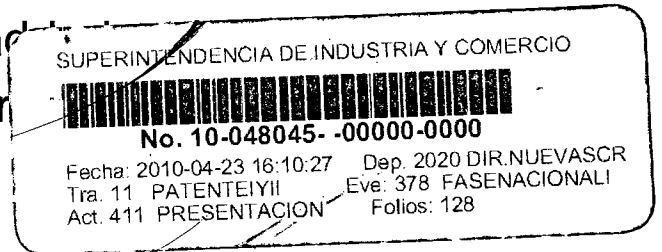


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT BT



Delegatura de Propiedad
División de Nuevas Cr



SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

10-48045

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

ARN BICATENARIO CON LIPIDO MODIFICADO QUE TIENE

UN POTENTE EFECTO DE INTERFERENCIA DEL ARN

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND

TECHNOLOGY y OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

DOMICILIO

TOKYO, JAPON

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C.,

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-048045- -00000-0000

Fecha: 2010-04-23 16:10:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 128

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:														
1	☒ Patente de Invención. ☒ Capítulo I.	☐ Patente de Modelo de Utilidad. ☐ Capítulo II.												
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY Y OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. Sociedades constituidas y existentes bajo las leyes de Japón. Dirección: 3-1, Kasumigaseki 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, 1008921, Japón y 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 1018535, Japón Respectivamente Domicilio: Tokyo, Japón Respectivamente	IDENTIFICACIÓN <table><tr><td>C.C.</td><td>☐</td><td>NIT</td><td>☐</td></tr><tr><td>C.E.</td><td>☐</td><td>Otro</td><td>☐</td></tr><tr><td colspan="2">Número</td><td>Cual</td><td>_____</td></tr></table>	C.C.	☐	NIT	☐	C.E.	☐	Otro	☐	Número		Cual	_____
C.C.	☐	NIT	☐											
C.E.	☐	Otro	☐											
Número		Cual	_____											
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 211 86 50 E-mail: clientes@cavelier.com Domicilio: Bogotá, Colombia.	IDENTIFICACIÓN <table><tr><td>C.C.</td><td>☒</td><td>NIT</td><td>☐</td></tr><tr><td>C.E.</td><td>☐</td><td>Otro</td><td>☐</td></tr><tr><td colspan="2">Número</td><td>Cual</td><td>_____</td></tr></table> Número 35.456.344 T.P 23.555	C.C.	☒	NIT	☐	C.E.	☐	Otro	☐	Número		Cual	_____
C.C.	☒	NIT	☐											
C.E.	☐	Otro	☐											
Número		Cual	_____											
4 INVENTOR (ES) (72)	1. Takanori KUBO 2-3-20-302 Yasuhigashi, Asaminami-ku, Hiroshima-shi, Hiroshima 7310153, Japón 3. Hidekazu TOYOBUKU c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. 1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 5410045, Japón	2. Hideki OHBA c/o NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY Kyushu, 807-1, Aza Nohoshita, Shuku-machi, Tosu-shi, Saga 8410052, Japón 4. Hirotake HAYASHI c/o HAYASHI KASEI CO., LTD. 2-7, Tenjinbashi 1-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 5300041, Japón												

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/JP2008/069829 Fecha: 24 de octubre de 2008
Publicación Internacional No. WO 2009/054551 A3 Fecha: 30 de abril de 2009

6

Título (54)

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

7

Clasificación Internacional (51)

A61K 047/048

8

Prioridad

SI☒ NO☐

(33) País de Origen

JP

(32) Fecha

24/10/2007

(31) Número de Solicitud

2007-276985

9

Comprobante de pago No.: 10-24,713 Fecha: 05 de abril de 2010
Comprobante de pago No.: 10-27,478 Fecha: 12 de abril de 2010
Comprobante de pago No.: 10-27,494 Fecha: 12 de abril de 20140

10

Anexos:

☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 554.000.oo.

☒ Comprobante de pago por 4 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$104.000.oo.

☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☐ Poderes, si fuere el caso.

☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐ Declaraciones.

☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.

☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.

☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☒ Arte final 12x12

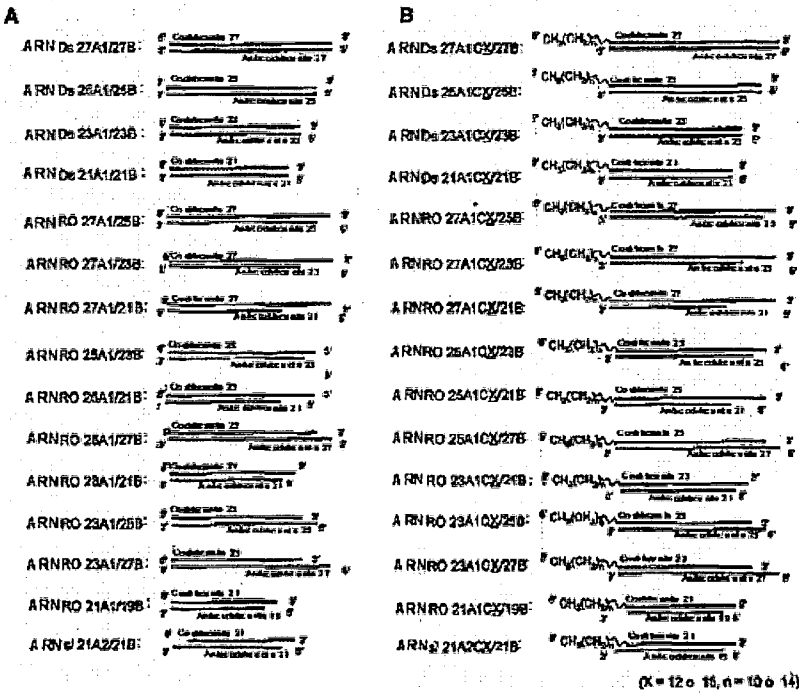
☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

Fig. 1



4

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2009/054551 A3

Descripción:

Páginas 40 en el idioma original

Páginas 52 en español

Reivindicaciones: Número (s) 14

Figuras: Número (s) 10

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.
3. ☒ Listado de Secuencias.
4. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

(51) International Patent Classification:
A61K 47/48 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/JP2008/069829

(22) International Filing Date:
24 October 2008 (24.10.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
2007-276985 24 October 2007 (24.10.2007) JP

(71) Applicants (for all designated States except US): NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY [JP/JP]; 3-1, Kasumigaseki 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, 1008921 (JP). OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. [JP/JP]; 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, 1018535 (JP).

(71) Applicant (for JP only): HAYASHI KASEI CO., LTD. [JP/JP]; 2-7, Tenjinbashi 1-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka, 5300041 (JP).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KUBO, Takanori [JP/JP]; 2-3-20-302, Yasuhigashi, Asaminami-ku, Hi-

roshima-shi, Hiroshima, 7310153 (JP). OHBA, Hideki [JP/JP]; c/o NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, Kyushu, 807-1, Aza Nonoshita, Shuku-machi, Tosu-shi, Saga, 8410052 (JP). TOYOBOKU, Hidekazu [JP/JP]; c/o OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., 1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka, 5410045 (JP). HAYASHI, Hirotake [JP/JP]; c/o HAYASHI KASEI CO., LTD., 2-7, Tenjinbashi 1-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka, 5300041 (JP).

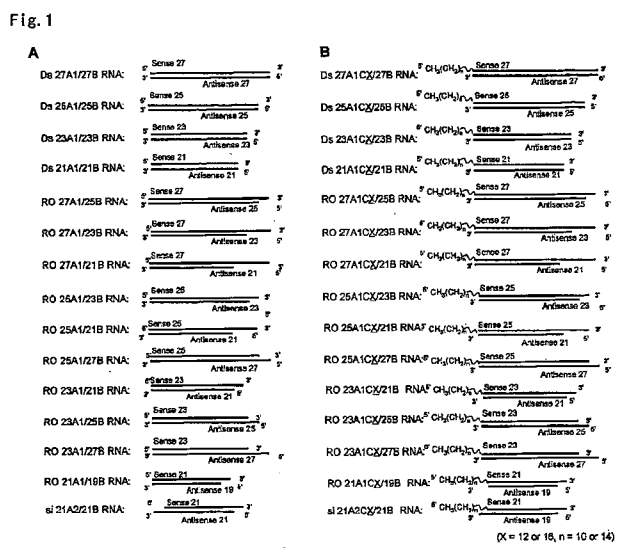
(74) Agents: Saegusa & Partners et al.; Kitahama TNK Building, 1-7-1, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 5410045 (JP).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,

[Continued on next page]

(54) Title: LIPID-MODIFIED DOUBLE-STRANDED RNA HAVING POTENT RNA INTERFERENCE EFFECT



(57) Abstract: An object of the present invention is to provide a novel double-stranded RNA that has high nuclease resistance and high cellular uptake efficiency, and that is capable of producing an excellent RNA interference effect. The present invention provides a lipid-modified double-stranded RNA comprising a sense strand having a nucleotide sequence complementary to a target sequence, and an antisense strand having a nucleotide sequence complementary to the sense strand, the double-stranded RNA being capable of inhibiting the expression of the target gene, the sense strand having a lipid linked to at least one of the first to sixth nucleotides from the 5' end side directly or via a linker.

WO 2009/054551 A3

WO 2009/054551 A3

GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(88) Date of publication of the international search report:
28 January 2010

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

DESCRIPTION

LIPID-MODIFIED DOUBLE-STRANDED RNA
HAVING POTENT RNA INTERFERENCE EFFECT

5 TECHNICAL FIELD

The present invention relates to a lipid-modified double-stranded RNA that can efficiently inhibit the expression of a target gene. More specifically, the present invention relates to a lipid-modified double-stranded RNA which has high
10 resistance to nuclease and high cellular uptake efficiency, and produces an excellent RNA interference effect.

BACKGROUND ART

The development of drugs for the efficient treatment of
15 intractable diseases, such as cancer and AIDS, is an important object to be achieved in the life science field. One potential method to achieve this object is using genetic medicines that act only on specific genes. In particular, an RNA interference (RNAi) method using a short double-stranded RNA 21 bases long (small
20 interfering RNA: siRNA) has recently been attracting much attention as such a genetic medicine. The RNAi method was first reported by Fire et al. in 1998 (see Non-Patent Document 1). According to the report of Fire et al., when a double-stranded RNA of about 100 base pairs that is homologous to a specific
25 region of a gene whose function is to be inhibited is introduced into cells, the double-stranded RNA is digested by the action of Dicer into fragments of about 20 to 25 base pairs, and then complexed with a plurality of proteins to form a RNA/protein complex (this complex is referred to as a RISC: a RNA-Induced
30 Silencing Complex), which binds to a homologous site of mRNA produced from the target gene and thereby potently inhibits gene expression. However, it was reported that when a long double-stranded RNA of about 30 base pairs or longer is introduced into mammalian cells, an interferon response, which is an antiviral
35 response, is induced, thus causing the phenomenon of apoptosis.

Therefore, it was considered difficult to apply the RNAi method to mammals. Tuschl et al. thus chemically synthesized a 21-base-long double-stranded RNA that has dangling ends at both the 3' ends, and reported that when such a double-stranded RNA is directly introduced into mammalian cells, the double-stranded RNA can potentially inhibit gene expression sequence-specifically, while avoiding an interferon response (see Non-Patent Document 2). Tuschl et al. further synthesized short double-stranded RNAs consisting of a double-stranded region of 19 base pairs and dangling end(s) of various lengths at the 3' or 5' ends, and investigated their RNA interference effects. As a result, observations show that 21-base-long siRNA having a dangling end of 2 bases at both the 3' ends demonstrated a very potent RNA interference effect, whereas no other type of short double-stranded RNA exhibited a remarkable RNA interference effect. Based on this report, the RNA interference method using a 21-base-long double-stranded RNA having a dangling end of 2 bases at both the 3' ends is commonly used. The method of inhibiting the expression of a target gene using a short double-stranded RNA 21 bases long is herein referred to as the "siRNA method", to distinguish it from the RNAi method.

Because the siRNA method uses synthetic RNA, sample preparation is comparatively easy, and handling is also easy; furthermore, very potent effects can be produced. Therefore, the siRNA method has been attracting much attention not only in the life science field, but also in the biotechnology business field.

However, this excellent siRNA method also has problem to be solved. As described above, siRNA is composed of an RNA molecule that is readily decomposed by the action of nuclease. Compared to single-stranded RNA, the double-stranded RNA region has a comparatively high resistance to nuclease contained in medium and/or a cell. However, a double-stranded RNA consisting of 19 base pairs scarcely produces the known RNA interference effects. As such, it has been reported that when introduced into cells containing a target gene sequence, although synthetic siRNA

9

produces a potent gene expression-inhibitory effect for about 2 to about 4 days, its RNA interference effect is sharply reduced thereafter, and is almost completely lost in about seven days.

Various chemically modified siRNAs have recently been reported to provide synthetic siRNAs with enhanced cellular uptake efficiency and prolonged, highly active RNA interference effects. For example, to enhance the resistance to exonuclease digestion, siRNAs modified with an amino group, a thiol group, or an abasic site on the end of the siRNA have been synthesized.

10 However, it has been reported that most of the terminally modified siRNAs 21 bases long have remarkably reduced RNA interference effects.

In recent years, J. Rossi et al. reported that a double-stranded RNA of 27 base pairs produces an RNA interference effect that is about 100 times greater than that of a double-stranded RNA of 21 base long (see Non-Patent Document 3). This is presumably because after an RNA of 27 base pairs is cleaved with an RNase III-like enzyme, Dicer, into a 21-base-long siRNA, the protein complex RISC recognizes the siRNA, so that the siRNA effects can be produced with a high efficiency.

As described above, because 27-base long RNA can produce excellent RNA interference effects, expectations to use this RNA as a genetic medicine are increasing. However, the technical method effective for enhancing the RNA interference effect of the 27-base-long RNA is completely unknown. Furthermore, the technical method for enhancing the RNA interference effect of a double-stranded RNA shorter or longer than 27 bases, which has an RNA interference effect, is also unclear.

Double-stranded RNAs having RNA interference effects are generally configured to have dangling ends. RNAs with no dangling ends (i.e., having blunt ends) have also been investigated for their RNA interference effects. The results, however, suggest that the RNA interference effects of double-stranded RNAs blunt-ended on the 5' end side of the sense strand are substantially the same as, or lower than those of double-

stranded RNAs having a dangling end on the 5' end side of the sense strand (see Non-Patent Document 4).

Lipids have high cell membrane permeability, and are known to be useful to deliver drugs into cells. Linking such a lipid to a double-stranded RNA having an RNA interference effect is expected to increase the cellular uptake efficiency and thereby produce more potent RNA interference effects. However, it is known that when a lipid is simply linked to a double-stranded RNA having an RNA interference effect, the RNA interference effect is sharply reduced. In the prior art, a lipid-modified double-stranded RNA having both an excellent RNA interference effect and a useful effect based on a lipid had yet to be constructed.

Non-Patent Document 1: Fire et al., Nature, 391, 806-811 (1998)

Non-Patent Document 2: Tuschl et al., EMBO Journal, 20, 6877-6888 (2001)

Non-Patent Document 3: J. Rossi et al., Nature Biotech., 23, 222-226 (2005)

Non-Patent Document 4: J. T. Marques et al., Nature Biotech., 24, 559-565 (2005).

DISCLOSURE OF THE INVENTION

PROBLEM TO BE SOLVED BY THE INVENTION

An object of the present invention is to provide a novel double-stranded RNA that has high nuclease resistance and high cellular uptake efficiency, and that is capable of producing an excellent RNA interference effect. Another object of the present invention is to provide a pharmaceutical composition containing the novel double-stranded RNA. A further object of the present invention is to provide a method of inhibiting the expression of a target gene, comprising introducing the novel double-stranded RNA into cells to inhibit the expression of the target gene.

MEANS FOR SOLVING THE PROBLEM

The present inventors conducted extensive research to achieve the above objects, and found that when a lipid is linked, directly or via a linker, to at least one of the first to sixth nucleotides from the 5' end of a sense strand of a double-stranded RNA comprising the sense strand having a nucleotide sequence complementary to a target sequence in a target gene, and an antisense strand having a nucleotide sequence complementary to the sense strand, the double-stranded RNA being capable of inhibiting the expression of the target gene, the thus-constructed double-stranded RNA has high nuclease resistance and high cellular uptake efficiency, and produces an excellent RNA interference effect. The present invention was accomplished as a result of further research, based on this finding.

More specifically, the present invention provides the following lipid-modified double-stranded RNA, pharmaceutical compositions containing the novel double-stranded RNA, methods of inhibiting the expression of a target gene, etc.

Item 1. A lipid-modified double-stranded RNA comprising a sense strand having a nucleotide sequence complementary to a target sequence in a target gene, and an antisense strand having a nucleotide sequence complementary to the sense strand, the double-stranded RNA being capable of inhibiting expression of the target gene, and the sense strand having a lipid linked to at least one of the first to sixth nucleotides from the 5' end directly or via a linker.

Item 2. A lipid-modified double-stranded RNA according to Item 1 which is blunt-ended on the 5' end side of the sense strand, and is blunt-ended or has a dangling end on the 3' end side of the sense strand.

Item 3. A lipid-modified double-stranded RNA according to Item 1 which has dangling ends on both the 5' and 3' end sides of the sense strand.

Item 4. A lipid-modified double-stranded RNA according to any one of Items 1 to 3 wherein the sense strand consists of 21 to 27 nucleotides.

Item 5. A lipid-modified double-stranded RNA according to Item 2 which is blunt-ended on both the 5' and 3' end sides of the sense strand, and in which each of the sense and antisense strands consists of 27 nucleotides.

5 Item 6. A lipid-modified double-stranded RNA according to Item 2 which is blunt-ended on both the 5' and 3' end sides of the sense strand, and in which each of the sense and antisense strands consists of 23 nucleotides.

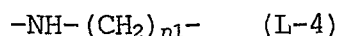
Item 7. A lipid-modified double-stranded RNA according to Item 2
10 which is blunt-ended on the 5' end side of the sense strand, the sense strand consisting of 25 nucleotides, and the antisense strand consisting of 23 nucleotides.

Item 8. A lipid-modified double-stranded RNA according to Item 3, wherein each of the sense and antisense strands consists of 21
15 nucleotides.

Item 9. A lipid-modified double-stranded RNA according to any one of Items 1 to 8, wherein the lipid is a fatty acid having 6 to 50 carbon atoms.

Item 10. A lipid-modified double-stranded RNA according to any
20 one of Items 1 to 9, wherein the lipid is lauric acid, stearic acid, myristic acid, or palmitic acid.

Item 11. A lipid-modified double-stranded RNA according to any one of Items 1 to 10, wherein the lipid is linked to at least one of the first to sixth nucleotides from the 5' end of the sense
25 strand via a linker, the linker being represented by the structural formula



wherein $n1$ is an integer of 1 to 40.

Item 12. A pharmaceutical composition comprising the lipid-
30 modified double-stranded RNA of any one of claims 1 to 10 and a pharmaceutically acceptable base.

Item 13. Use of the lipid-modified double-stranded RNA of any one of Items 1 to 10 for the production a pharmaceutical composition in order to inhibit the expression of a target gene.

35 Item 14. A method of inhibiting the expression of a target gene

comprising introducing a lipid-modified double-stranded RNA of any one of claims 1 to 10 into cells to inhibit the expression of the target gene.

5 EFFECT OF THE INVENTION

The lipid-modified double-stranded RNA of the present invention is modified with a lipid in the 5' end side of the sense strand, thereby producing a significantly increased RNA interference effect. More specifically, the lipid-modified
10 double-stranded RNA has a lipid linked to a specific site of the RNA, and thus has remarkably enhanced resistance to nuclease and cellular uptake efficiency, without impairing Dicer processing or the binding of RNA to RISC, and thus can greatly contribute to medical use.

15 The lipid-modified double-stranded RNA of the present invention has excellent ability of intracellular delivery, even when used alone. Therefore, the lipid-modified double-stranded RNA can be introduced into cells without the use of any known gene transfection reagents, or using a known gene transfection
20 reagent in a reduced amount. Therefore, the lipid-modified double-stranded RNA of the present invention can inhibit the expression of cytotoxicity, which is a concern when using known gene transfection reagents, thereby ensuring a high degree of safety in clinical applications.

25 Thus, the expression of the target gene can be more effectively inhibited or impaired by using the pharmaceutical composition of the present invention or by using the method of inhibiting the expression of a target gene according to the present invention.

30

BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

In this specification, the "blunt end" or "blunt-ended" refers to a terminal structure of a double-stranded RNA in which bases in the terminal region of a sense strand and bases in the
35 terminal region of an antisense strand complementary to the sense

strand are paired without forming a single strand. The "dangling end" refers to a terminal portion of a nucleotide sequence in which a single strand is present without forming a double strand, because complementary bases are not present in the terminal
5 region of the sense strand of the double-stranded RNA or the terminal region of the antisense strand complementary to the sense strand.

The lipid-modified double-stranded RNA of the invention comprises a sense strand having a nucleotide sequence
10 complementary to a target sequence in a target gene.

The target gene herein refers to a gene whose expression is to be inhibited by the RNA interference effect. The target gene of the lipid-modified double-stranded RNA of the invention is not particularly limited, and can be suitably
15 selected according to the intended use of the lipid-modified double-stranded RNA.

The target sequence in the target gene is not particularly limited as long as the expression of the gene can be inhibited by RNA interference effects. The target sequence can be
20 suitably determined according to a known method, for example, using an NCBI BLAST search, etc. For example, the target sequence may be a region consisting of 19 to 30 bases following the bases "AA" in the exon region 50 to 100 bases downstream of the start codon of the coding region (ORF) of the target gene, and having a
25 GC content of about 50%. It is experientially known in this field that excellent RNA interference effects can be obtained using a strand complementary to such a target sequence. For example, the target sequence can be determined according to the instructions of IDT (Integrated DNA Technologies, Inc.; Dicer Substrate RNAi
30 Design). A recent report revealed that a double-stranded RNA having high RNA interference effects can be produced by constructing a double-stranded RNA which has: (i) an A/U pair on the 5' end side of the antisense strand; (ii) a G/C pair on the 5' end side of the sense strand; and (iii) about five A/U pairs
35 on the 5' end side of the antisense strand; (iv) and does not

have nine or more G/C pairs (Ui-Tei et al., Nucleic Acids Res., 32, 936-948 (2004)).

When the sense strand of the lipid-modified double-stranded RNA of the invention does not have a dangling end, the sense strand consists of a nucleotide sequence complementary to the target sequence. When the sense strand has a dangling end at the 5' end and/or the 3' end, the sense strand consists of a nucleotide sequence having a nucleotide sequence complementary to the target sequence, and a nucleotide sequence of the dangling end linked to the 5' end and/or the 3' end of the complementary nucleotide sequence.

As long as the RNA interference effect can be achieved, the number of nucleotides that constitute the sense strand of the lipid-modified double-stranded RNA of the invention is not particularly limited, and can be suitably determined according to the desired structure of the double-stranded RNA. The number of nucleotides is usually 21 to 27, preferably 21, 23, 25, or 27, and more preferably 21, 23, or 27. When the sense strand does not have a dangling end, the number of nucleotides that constitute the sense strand herein means the total number of nucleotides constituting the nucleotide sequence complementary to the target sequence. When the sense strand has a dangling end, the number of nucleotides that constitutes the sense strand means the sum of the number of nucleotides constituting the dangling end and the number of nucleotides constituting the nucleotide sequence complementary to the target sequence. The lipid-modified double-stranded RNA of the invention comprises an antisense strand having a nucleotide sequence complementary to the sense strand.

When the antisense strand of the lipid-modified double-stranded RNA of the invention does not have a dangling end, the antisense strand consists of a nucleotide sequence complementary to a part or all of the "nucleotide sequence complementary to a target sequence" of the sense strand. When the antisense strand has a dangling end at the 5' end and/or the 3' end, the antisense strand consists of: a nucleotide sequence complementary to a part

or all of the "nucleotide sequence complementary to a target sequence" of the sense strand; and a nucleotide sequence of the dangling end linked to the 5' end and/or the 3' end of the complementary nucleotide sequence of the antisense strand. As
5 long as the RNA interference effect can be achieved, the number of nucleotides that constitute the antisense strand in the lipid-modified double-stranded RNA of the invention is not particularly limited, and can be suitably determined according to the desired structure of the double-stranded RNA. The number of the
10 nucleotides is usually 21 to 27, preferably 21, 23, 25, or 27, and more preferably 21, 23, or 27. When the antisense strand does not have a dangling end, the number of nucleotides that constitute the antisense strand means the total number of nucleotides constituting the nucleotide sequence complementary to
15 the target sequence. When the antisense strand has a dangling end, the number of nucleotides that constitute the antisense strand means the sum of the number of nucleotides constituting the dangling end, and the number of nucleotides constituting the nucleotide sequence complementary to the target sequence.

20 The nucleotides that constitute the sense strand and the antisense strand of the lipid-modified double-stranded RNA of the invention are basically ribonucleotides. To enhance the resistance to enzymatic digestion, the RNA sequence may contain various chemically modified nucleotides, such as 2'-O-methyl-
25 modified nucleotides, 2'-F-modified nucleotides, LNA (Locked Nucleic Acid) nucleotides, deoxyribonucleotides, or the like. Particularly, when the lipid-modified double-stranded RNA of the invention has a dangling end, the dangling end of the sense strand and/or the antisense RNA may be composed of
30 deoxyribonucleotides. Examples of such chemically modified nucleotides include phosphate backbone-modified nucleotides such as phosphorothioate-modified DNA/RNA and boranophosphate-modified DNA/RNA; 2'-modified nucleotides such as 2'-OMe-modified RNA and 2'-F-modified RNA; modified nucleotides obtained by crosslinking
35 a sugar molecule of a nucleotide, such as LNA (Locked Nucleic

17

Acid) and ENA (2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acids);
modified nucleotides having different backbones, such as PNA
(Peptide Nucleic Acid) and morpholine-nucleotide; base-modified
nucleotides such as 5-fluorouridine and 5-propyluridine; and the
5 like.

The lipid-modified double-stranded RNA of the invention
is not particularly limited structurally, as long as the sense
and antisense strands are hybridized into a double strand. For
example, the lipid-modified double-stranded RNA preferably has
10 the following structure: a structure (A) in which the double-
stranded RNA is blunt-ended (i.e. has a blunt end) on the 5' end
side of the sense strand, and is blunt-ended or has a dangling
end (single-stranded region) on the 3' end side of the sense
strand; a structure (B) in which the double-stranded RNA has
15 dangling ends on the 5' and 3' end sides of the sense strand. The
structure in which the double-stranded RNA has a dangling end on
the 3' end side of the sense strand includes cases when the 3'-
end region of the sense strand forms a dangling end, and cases
when the 5'-end region of the antisense strand forms a dangling
20 end. The structure in which the double-stranded RNA has a
dangling end on the 5' end side of the sense strand includes the
case in which the 5' end region of the sense strand forms a
dangling end, and the case in which the 3' end region of the
antisense strand forms a dangling end.

25 Among the double-stranded RNAs that can be used to form
the lipid-modified double-stranded RNA of the invention, double-
stranded RNAs having the structures (A-1) to (A-3) shown below
are particularly preferable among those having the above
structure (A), and double-stranded RNAs of the structure (B-1)
30 shown below are particularly preferable among those having the
above structure (B) to achieve a further enhanced RNA
interference effect. The structure (A-1), in which the double-
stranded RNA is blunt-ended on both the 5' and 3' end sides of
the sense strand, and each of the sense and antisense strands
35 consists of 27 nucleotides; the structure (A-2), in which the

double-stranded RNA is blunt-ended on both the 5' and 3' end sides of the sense strand, and each of the sense and antisense strands consists of 23 nucleotides, respectively; the structure (A-3), in which the double-stranded RNA is blunt-ended on the 5' end side of the sense strand, and the sense strand consists of 25 nucleotides, and the antisense strand consists of 23 nucleotides; and the structure (B-1), in which the double-stranded RNA has dangling ends each consisting of two nucleotides on both the 3' end of the sense strand and the 3' end of the antisense strand, and each of the sense and antisense strands consists of 21 nucleotides.

More specifically, in the structures (A-1) and (A-2), sense and antisense strands are hybridized without no dangling end formed on the ends. In the structure (A-3), sense and antisense strands are hybridized so that the double-stranded RNA is blunt-ended on the 5' end of the sense strand, and the first and second nucleotides from the 3' end of the sense strand form a dangling end. The structure (B-1) is that the first to 19th nucleotides from the 5' end of the sense strand and the third to 21st nucleotides from the 3' end of the antisense strand are hybridized so that the first and second nucleotides from the 3' end of the sense strand, and the first and second nucleotides from 3' end of the antisense strand form dangling ends, respectively.

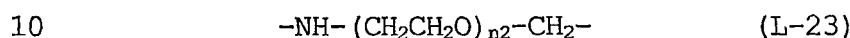
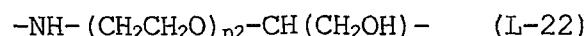
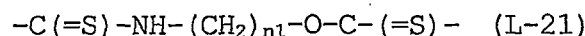
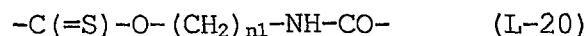
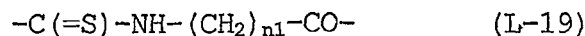
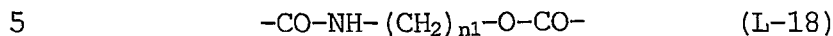
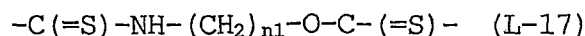
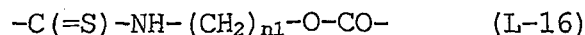
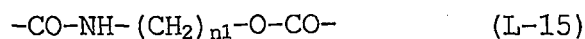
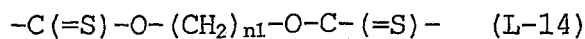
The lipid-modified double-stranded RNA of the invention has at least one lipid linked to at least one of the first to sixth nucleotides from the 5' end of the sense strand. The lipid-modified double-stranded RNA of the invention has no substituents at any other position than the 5' end region of the sense strand. More specifically, no substituents are present in any other area than the 5' end region of the sense strand and in the antisense strand, and these areas consist of nucleotides. Linking lipid(s) only to the 5' end region of the sense strand can enhance cellular uptake efficiency and provide a remarkably excellent RNA interference effect.

The lipid linked to the sense strand of the lipid-modified double-stranded RNA of the invention is not particularly limited, and examples thereof include simple lipids (esters of fatty acids with various alcohols); complex lipids such as phospholipids and glycolipids; derived lipids such as fatty acids, higher alcohols, lipid soluble vitamins, steroids, and hydrocarbons. To enhance the cellular uptake efficiency and the RNA interference effect, the lipid used is preferably a derived lipid, more preferably a fatty acid having 6 to 50 carbon atoms, still more preferably a fatty acid having 10 to 22 carbon atoms, particularly preferably a fatty acid having 12 to 18 carbon atoms, more particularly preferably lauric acid, stearic acid, myristic acid, or palmitic acid, and most preferably palmitic acid.

The manner of linking of the lipid to the sense strand to form the lipid-modified double-stranded RNA of the invention is not particularly limited. The lipid may be linked directly or via linker to the sense strand. In the present invention, the linker via which the lipid is linked to the sense strand is not the linker consisting of nucleic acid. The linker is not particularly limited as long as the lipid and the sense strand can be linked therethrough. For example, linkers having the following structures can be used as the linker:

- | | | |
|----|---|--------|
| | -O-Co-O- | (L-1) |
| | -NH-CO-O- | (L-2) |
| 25 | -NH-CO-NH- | (L-3) |
| | -NH-(CH ₂) _{n1} - | (L-4) |
| | -S-(CH ₂) _{n1} - | (L-5) |
| | -CO-(CH ₂) _{n1} -CO- | (L-6) |
| | -CO-(CH ₂) _{n1} -NH- | (L-7) |
| 30 | -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) |
| 35 | -C(=S)-O-(CH ₂) _{n1} -O-CO- | (L-13) |

-14-



In the above Formulas (L-4) to (L-21), $n1$ is an integer of 1 to 40, preferably an integer of 2 to 20, and more preferably an integer of 2 to 12.

15 In the above Formulas (L-22) and (L-23), $n2$ is an integer of 1 to 20, preferably an integer of 1 to 10, and more preferably an integer of 1 to 6.

The linkers of Formulas (L-4) to (L-23) may link the sense strand on either the left or right side. Preferably, a specific site of the sense strand (or the nucleic acid of nucleic acid conjugate) is linked on the right side of the linkers of Formulas (L-4) to (L-23), and a lipid is linked on their left side.

The linking site of the lipid to the linker may be appropriately selected according to the types of lipid and linker used. For example, when a fatty acid is used as the lipid, it can be linked via an ester bond, an amide bond, or like bond formed between the carboxyl group of the fatty acid and the linker. More specifically, when a fatty acid is used as the lipid, the lipid is preferably linked by substitution of $-OH$ of the carboxyl group of the fatty acid with the linker.

The linker is suitably selected according to the type of lipid to be linked. When a fatty acid is used as the lipid, the linkers represented by Formula (L-4) are preferably used.

35 In addition to the above-mentioned linkers, other linkers are also usable. Examples thereof include bifunctional

linkers (linkers containing two functional groups), such as N-succinimidyl=3-(2-pyridyldithio)propionate, N-4-maleimide butyric acid, S-(2-pyridyldithio)cysteamine, iodoacetoxysuccinimide, N-(4-maleimidebutyloxy)succinimide, N-[5-(3'-maleimide propylamide)-1-carboxypentyl]iminodiacetic acid, N-(5-aminopentyl)-iminodiacetic acid, and the like. In the sense strand, the nucleotide linked to the lipid or to the linker used for linking the lipid is not particularly limited, as long as it is at least one of the first to sixth nucleotides from the 5' end of the sense strand, preferably at least one of the first to fourth nucleotides from the 5' end, more preferably the first and/or second nucleotide from the 5' end, and particularly preferably the nucleotide on the 5' end (the first nucleotide from the 5' end).

The linking site of the sense strand to the lipid or to the linker used for linking the lipid is not particularly limited. It is preferably linked by substitution of the hydrogen atom of the hydroxyl group of the phosphoric acid portion of a specific nucleotide of the sense strand.

The number of lipids linked to the lipid-modified double-stranded RNA of the invention is not particularly limited. For example, one to three lipids, preferably one or two lipids, and more preferably one lipid can be linked.

The lipid-modified double-stranded RNA of the invention can be produced by synthesizing a sense strand having at least one lipid linked thereto, and an antisense strand, respectively, and hybridizing the sense and antisense strands according to known methods. The sense strand having a lipid linked thereto can also be produced according to known synthetic methods.

The modified double-stranded RNA of the invention can be introduced into cells to inhibit or impair the expression of a target gene, and therefore can be used as a pharmaceutical for inhibiting or impairing the expression of a target gene or a composition for gene therapy, i.e., a pharmaceutical composition. The pharmaceutical composition of the invention can be formulated

into various dosage forms. Examples of dosage forms of the pharmaceutical composition of the invention include liquid preparations such as liquids (such as syrups), drops, and injections; solid preparations such as tablets, pills, powders, granules, and capsules (such as soft capsules); and the like. When the pharmaceutical composition of the invention is a liquid preparation, the composition may be cryopreserved, or preserved after removing water therefrom by lyophilization, etc. Lyophilized preparations and dry syrups, etc. may be used in the form of solutions by adding distilled water for injection, sterile water or the like when used. When the pharmaceutical composition of the invention is a solid preparation, the composition may be used in the form of a solution by adding distilled water for injection, sterile water, or the like, when used.

The pharmaceutical composition may consist of a lipid-modified double-stranded RNA alone, or may further contain a pharmaceutically acceptable carrier, if necessary. The carrier to be used is not particularly limited as long as it does not impair the target gene expression inhibitory effect of the modified double-stranded RNA of the invention, and can be suitably selected according to the dosage form. Examples of carriers that can be used include purified water, aqueous sugar solutions, buffers, physiological saline, aqueous polymer solutions, RNase-free water, etc. When the pharmaceutical composition of the invention contains the carrier, the proportions of these components in the composition are not particularly limited, as long as they do not impair the target gene expression inhibitory and impairing effects of the modified double-stranded RNA of the invention, and can be suitably selected according to the dosage form.

For example, the pharmaceutical composition of the invention may contain the modified double-stranded RNA in an amount of 0.001 to 50, more preferably 0.01 to 10, and still more preferably 0.1 to 1. The pharmaceutical composition of the

invention may contain the carrier in an amount of 50 to 99.999 wt.%, preferably 90 to 99.99 wt.%, and still more preferably 99 to 99.9 wt.%, based on the total weight of the composition.

The target gene and disease for which the
5 pharmaceutical composition of the invention is used are not particularly limited. The relationship between the target gene and the disease is known. The type of cell into which the pharmaceutical composition of the invention is introduced is not limited. The cells to be used may be human-derived cells or non-
10 human, animal-derived cells. The pharmaceutical composition of the invention may be used *in vitro* or *in vivo*.

The amount and method of introducing the lipid-modified double-stranded RNA of the invention into cells are the same as in conventional siRNA methods. For example, when the
15 pharmaceutical composition of the invention is used to introduce the lipid-modified double-stranded RNA into cells *in vitro*, a method of culturing cells in the presence of an appropriate amount of the pharmaceutical composition can be used. When the pharmaceutical composition of the invention is used to introduce
20 the lipid-modified double-stranded RNA into cultured cells or cells extracted from the living body *in vitro*, the lipid-modified double-stranded RNA of the invention may be introduced in the presence of serum. When the pharmaceutical composition of the invention is used to introduce the lipid-modified double-stranded
25 RNA into cells *in vivo*, direct injection of the pharmaceutical composition into the tissue; intravenous, subcutaneous, muscular, interperitoneal, intraocular, gastrointestinal or dental injection; inhalation administration into the nasal cavity, oral cavity, lung, or the like; oral administration; transdermal
30 administration through the skin; transmucosal administration through the oral mucosa, vaginal mucosa, ocular mucosa, rectal mucosa, and uterine mucosa; and like methods can be used.

When the pharmaceutical composition of the invention is used, a known gene transfection reagent used to transfect siRNA
35 into cells may be optionally used together. Alternatively, the

pharmaceutical composition of the invention may contain a gene transfection reagent. The lipid-modified double-stranded RNA contained in the pharmaceutical composition of the invention has excellent cellular transfection abilities, even when used alone.

5 Therefore, the lipid-modified double-stranded RNA can be introduced into cells without using a known gene transfection reagent used to deliver siRNA into cells, or using a gene transfection reagent in a reduced amount.

The pharmaceutical composition of the invention can be
10 used in an effective amount, for example, an amount such that the lipid-modified double-stranded RNA is introduced in an amount of 0.001 to 10 pM, preferably 0.001 to 1 pM, and more preferably 0.01 to 0.1 pM, per cell.

The pharmaceutical composition of the invention can
15 inhibit or impair the expression of a target gene to thereby prevent, ameliorate, or treat a disease caused by the expression of the target gene.

The present invention further provides a method of inhibiting the expression of a target gene. The method of
20 inhibiting the expression of a target gene comprises transfecting the lipid-modified double-stranded RNA into cells.

The target gene or disease is not particularly limited, and the relationship between the target gene and the disease is known, as mentioned above. The type of cell into which the
25 modified double-stranded RNA of the invention is introduced is not limited. The cells to be used may be human-derived cells or non-human animal cells. The modified double-stranded RNA of the invention may be introduced *in vitro* or *in vivo*.

In the method of inhibiting the expression of a target
30 gene of the invention, the amount and method of introducing the lipid-modified double-stranded RNA of the invention into cells are the same as in conventional siRNA methods, and can be suitably selected. For example, in the method of inhibiting the expression of a target gene of the invention, to introduce the
35 lipid-modified double-stranded RNA of the invention into cells in

vitro, a step of culturing cells in the presence of an appropriate amount of the lipid-modified double-stranded RNA can be used. In the method of inhibiting the expression of a target gene of the invention, to introduce the lipid-modified double-stranded RNA into cultured cells or cells extracted from the living body *in vitro*, a step of introducing the lipid-modified double-stranded RNA of the invention into cells in the presence of serum can be used. In the method of inhibiting the expression of a target gene of the invention, to introduce the lipid-modified double-stranded RNA into cells *in vivo*, a step as described followed can be used; direct injection of the lipid-modified double-stranded RNA of the invention into the tissue; intravenous, subcutaneous, muscular, interperitoneal, intraocular, gastrointestinal, dental or like injection; inhalation administration into the nasal cavity, oral cavity, lung or the like; oral administration; transdermal administration through the skin; transmucosal administration through the oral mucosa, vaginal mucosa, ocular mucosa, rectal mucosa, and uterine mucosa; and like steps. By bringing an effective amount of the lipid-modified double-stranded RNA into contact with the cells, the lipid-modified double-stranded RNA of the invention can be introduced into cells. For example, the lipid-modified double-stranded RNA is administered in an amount of 0.001 to 10 pM, preferably 0.001 to 1 pM, and more preferably 0.01 to 0.1 pM, per cell.

The lipid-modified double-stranded RNA of the invention has excellent cellular transfection ability, even when used alone. Therefore, the lipid-modified double-stranded RNA can be introduced into cells without using a known gene transfection reagent, or using a gene transfection reagent in a reduced amount.

The method of inhibiting the expression of a target gene according to the present invention can inhibit or impair the expression of the target gene to thereby prevent, ameliorate, or treat a disease caused by the expression of the target gene.

EXAMPLES

The present invention is described in detail with reference to the following Examples; however, the invention is not limited by these Examples.

5 Example 1: Inhibitory Effects of 5' Lipid-Modified Double-Stranded RNAs on the Expression of the Luciferase Gene

1. Synthesis of Lipid-Modified Double-Stranded RNAs Targeting the Luciferase Gene

1-1. Sequences of Sense Strands and Antisense Strands

10 Double-stranded RNAs containing 21- to 27- base-long sense strands and 21- to 27-base-long antisense strands were designed having a sequence homologous to Renilla luciferase and capable of suppressing the expression of the Renilla luciferase gene. Such double-stranded RNAs can produce various forms of
15 double strands, depending on the combination of the antisense strand and the sense strand. The following names were assigned to these double-stranded RNAs. "DS (double-stranded) RNAs": completely double-stranded RNAs not containing a dangling end (a single-stranded region) (i.e., double-stranded RNAs containing
20 blunt ends on both of the 5' and 3' end sides of the sense strand); "Si RNAs": double-stranded RNAs containing dangling ends (overhang) on both end sides thereof; and "RO (Right Overhang) RNAs": double-stranded RNAs containing a dangling end only on the right side when the 5' end side of the sense strand is shown on
25 the left side. The names of these various double-stranded RNAs are distinguished by designating the sense strand as "A" ("A1" or "A2") and the antisense strand as "B", and by indicating the number of bases of each single-stranded RNA, i.e., the sense strand and antisense strand. Because two types of sense strands
30 were designed, they are each designated as "A1" and "A2" for classification. As for the double-stranded RNAs modified with a lipid at the 5' end region of the sense strand, the designation "Cx (x= 16 or 12)" is given after the name of each sense strand. The sequences of the RNAs used are as follows.

Sense Strands:

- 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)
- 5 21nt 21A1: 5'-CUGGCCUUUCACUACUCCUAC-3' (SEQ ID NO: 4)
- 21nt 21A2: 5'-GGCCUUUCACUACUCCUACGA-3' (SEQ ID NO: 5)

Antisense Strands:

- 27nt 27B: 5'-GUGCUCGUAGGAGUAGUGAAAGGCCAG-3' (SEQ ID NO: 6)
- 25nt 27B: 5'-GCUCGUAGGAGUAGUGAAAGGCCAG -3' (SEQ ID NO: 7)
- 10 23nt 27B: 5'-UCGUAGGAGUAGUGAAAGGCCAG-3' (SEQ ID NO: 8)
- 21nt 27B: 5'-GUAGGAGUAGUGAAAGGCCAG-3' (SEQ ID NO: 9)

1-2. Synthesis of Lipid-Unmodified Double-Stranded RNAs Targeting the Luciferase Gene

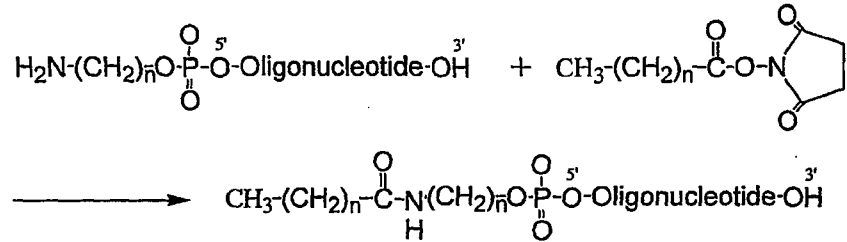
15 Various double-stranded RNAs were prepared using the sense strands and antisense strands listed above. Each double-stranded RNA was prepared by mixing equimolar amounts of a sense strand and an antisense strand in a universal buffer (Hayashi Kasei Co., Ltd.), heating the mixture at 92°C for 2 minutes, and
20 then gradually reducing the temperature to 4°C. The resulting various double-stranded RNAs were electrophoresed on a 20% polyacrylamide gel at 250 V for 60 minutes, and then confirmed by dying with a silver staining kit (GE Health Care Bioscience). FIG. 1A shows the structures of the unmodified double-stranded RNAs.

25 1-3. Synthesis of Lipid-Modified Double-Stranded RNAs Targeting the Luciferase Gene

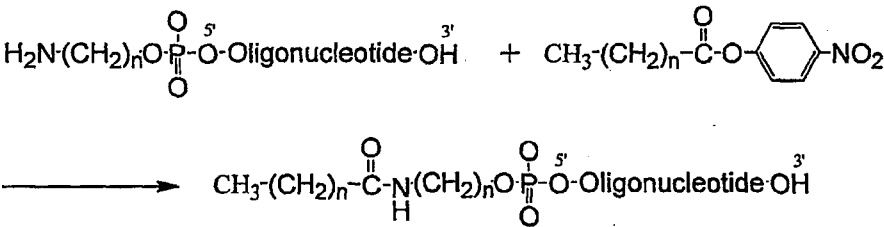
Lipid-modified sense strands in which a lipid was linked to the 5' end of the sense strands of the double-stranded RNAs capable of inhibiting the expression of the luciferase gene
30 were synthesized. In these lipid-modified sense strands, the lipid was covalently attached via an aminoalkyl group (Amino Modifier C6; Glen Research) linked to the 5' end of the above-mentioned sense strands. The lipid-modified sense strands were synthesized by reacting in a liquid phase a lipid compound
35 containing an active ester group (hereinafter referred to as an

"active ester-containing lipid compound" with a sense strand modified by amination of the 5' end (Reaction Schemes 1 and 2).

Reaction Scheme 1



Reaction Scheme 2



5 A specific synthetic process is described below. To
 10 aminate the 5' end of the sense strand, a conventional process
 (the phosphoramidite synthetic process) may be performed using
 5'-Amino-Modifier C6 (Glen Research) on RNA solid phase synthesis,
 to thereby synthesize a sense strand modified with an aminoalkyl
 group at the 5' end (21 bases in length). The sense strand
 modified with an aminoalkyl group at the 5' end, which had been
 purified by HPLC and subjected to MALDI-TOF MS analysis, was
 purchased from Hayashi Kasei Co., Ltd. The resulting sense strand
 modified with an aminoalkyl group at the 5' end has $-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}_2$
 15 linked to the 5' end (the phosphate residue of the first
 nucleotide from the 5' end). The concentration of the resulting
 single-stranded RNA was determined by measuring the absorbance at
 260 nm using a UV spectrometer. The single-stranded RNA modified
 with the aminoalkyl group was mixed with an active ester-
 20 containing lipid compound (palmitic acid N-hydroxysuccinimide
 ester (Sigma-Aldrich), or lauric acid-4-nitrophenyl ester (TCI))
 dissolved in DMF (N,N dimethylformamide) under condensation

conditions to synthesize a lipid-modified sense strand. After the reaction, the reaction solution was purified by HPLC to remove unwanted reagents in the reaction solution containing the lipid-modified sense strand. HPLC purification was performed with

5 Buffer A: 100% 20 mM TEAA (pH 7.0) and Buffer B: 70% CH₃CN/20 mM TEAA (pH 7.0) at a linear gradient of 10-100% Buffer B over a period of 50 minutes. CAP CELL (4.6 x 150 mm, 5 μm; Shiseido) was used as the purification column. FIG. 2 shows exemplary HPLC analytical results. The lipid-modified sense strand purified by

10 HPLC was lyophilized and dissolved in purified water, after which the concentration and synthetic yield thereof were determined by UV spectral analysis.

The structural models and yields of the resulting lipid-modified sense strands are as follows.

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

15 The resulting lipid-modified sense strands were paired with the antisense strands to produce lipid-modified double-stranded RNAs. The double-stranded RNAs were formed according to the same procedure as described above, and confirmed by 20% polyacrylamide gel electrophoresis. FIG. 1B shows the structures of the lipid-modified double-stranded RNAs. In FIG. 1B, X is 16 when a palmitic acid derivative is linked, and X is 12 when a

20

lauric acid derivative is linked.

2. Degradative Enzyme Resistance of Lipid-Modified Double-Stranded RNAs

The nuclease resistance of lipid-modified 27nt dsRNA (Ds 27A1C16/27B) was evaluated. First, 27nt dsRNA modified with a lipid at the 5' end of the sense strand, adjusted to a final concentration of 2 μ M, was incubated at 37°C in an RPMI-1640 medium (Invitrogen) containing 10% FBS (Sanko Junyaku, Co., Ltd.) (final volume: 110 μ l). After 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 12 h, 24 h, and 48 h, each 10 μ l aliquot was sampled and inserted into a sample tube containing 2 μ l of a loading die. In order to subsequently stop the degradation reaction, the sample taken was rapidly lyophilized in liquid nitrogen and preserved at -20°C. The resulting sample product was electrophoresed on a 20% 15 polyacrylamide gel at 250 V for 70 minutes. The product was then dyed with a silver staining kit (GE Health Care Bioscience) (see the product manual for staining conditions), and subjected to gel analysis on a ChemiImager 4000 (Alpha Innotech Corporation). As comparisons, 21-base-long 21siRNA (si 21A2/21B), which is 20 generally in wide use, and unmodified 27nt dsRNA (Ds 27A1/27B) were similarly evaluated for their nuclease resistance. FIG. 3 shows the results of the gel electrophoresis.

As a result, the 21siRNA was rapidly degraded in the serum-containing medium, and disappearance thereof was confirmed 25 in about 1 to 2 hours. On the other hand, the unmodified 27nt dsRNA and lipid-modified 27nt dsRNA had nuclease resistance much higher than that of the 21siRNA, and these double-stranded RNAs still remained even after 48 hours. These results led to a new finding that the lipid-modified double-stranded RNA possessed in 30 vivo stability markedly higher than that of the 21siRNA that is generally in wide use.

3. Processing by Dicer of Lipid-Modified Double-Stranded RNAs Targeting the Luciferase Gene

Processing by recombinant Dicer of the synthesized 35 double-stranded RNAs and lipid-modified double-stranded RNAs was

evaluated. The Dicer cleavage experiments were performed as follows. Ten microliters of 0.5 U recombinant Dicer (Gene Therapy Systems) and unmodified double-stranded RNAs or lipid-modified double-stranded RNAs adjusted to a final concentration of 2 μ M in solutions of 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 15 mM NaCl, and 2.5 mM Mg₂Cl were prepared in sample tubes, and then the samples were incubated in an incubator at 37°C for 12 hours. In order to subsequently stop the cleavage reactions by Dicer, 2 μ l of Dicer Stop Solution (Gene Therapy Systems) was added into the reaction solutions, followed by the addition of 2 μ l of a loading die. The resulting sample products were electrophoresed on a 20% polyacrylamide gel at 250 V for 70 minutes. The products were then dyed with a silver staining kit (GE Health Care Bioscience) (see the product manual for staining conditions), and subjected to gel analysis on a ChemiImager 4000 (Alpha Innotech corporation). As a control, unmodified 21siRNA (si21A2/21B) was also analyzed by gel electrophoresis. The results are shown in FIG. 4.

The results showed that, among the double-stranded RNAs in which the sense strands of Ds RNAs (Ds 27A1/27B, Ds 25A1/25B, Ds 23A1/23B, and Ds 21A1/21B) were modified with a lipid, bands were observed with Ds 27A1C16/27B and Ds 27A1C12/27B in similar positions to the unmodified 21siRNA by the action of recombinant Dicer, thus strongly indicating the production of 21-base-long siRNAs containing a dangling end of two bases by Dicer cleavage. Also with Ds 25A1C16/25B and Ds 23A1C16/23B, new bands were observed in similar positions to the 21siRNA in the presence of Dicer, revealing that they were processed by Dicer. With Ds 21A1C16/21B, on the other hand, no significant change was observed in the presence of Dicer, revealing that it was not processed by Dicer.

Moreover, processing by Dicer of the double-stranded RNAs in which the sense strands of RO RNAs (RO 27A1/25B, RO 25A1/23B, RO 23A1/21B, and RO 21A1/19B) each containing a dangling end of two bases on the 3' end region of the sense

strand were modified with a lipid, was similarly evaluated. As a result, with the three types, i.e., RO 27A1C16/25B, RO 25A1C16/23B, and RO23A1C16/21B, bands were observed in similar positions to the 21siRNA in the presence of Dicer, revealing that they were processed by Dicer. RO 27A1C16/25B and RO 25A1C16/23B, in particular, demonstrated significant processing effects by Dicer. With the relatively short RO 21A1C16/19B, on the other hand, no change was observed in the double-stranded RNA even in the presence of Dicer, suggesting that it was not processed by Dicer.

Furthermore, processing by Dicer of double-stranded RNAs in which the sense strands of the RO RNAs (RO 27A1/23B and RO 25A1/21B) containing a dangling end of four bases on the 3' end region of the sense strand were modified with a lipid, as well as a double-stranded RNA in which the sense strand of the RO RNA (RO 27A1/21B) containing a dangling end of six bases on the 3' end region of the sense strand was modified with a lipid, was evaluated. As a result, all of the aforementioned RO RNAs were processed by Dicer, and new bands were observed in the same positions as the 21nt siRNA.

Furthermore, processing by Dicer of double-stranded RNAs in which the sense strands of the RO RNAs (RO 25A1/27B, RO 23A1/25B, and RO 23A1/27B) containing a dangling end on the 5' end region of the antisense strand were modified with a lipid was similarly evaluated. As a result, with some of the lipid-modified RO RNAs containing a dangling end on the 5' end region of the antisense strand, new bands were observed because of processing by Dicer; however, bands were observed at the same time in similar positions to those observed in the absence of Dicer, revealing that the processing rate by Dicer was slower than the processing rates for the Ds RNAs and the other RO RNAs.

4. Inhibition of Expression of the Luciferase Gene by the Lipid-Modified Double-Stranded RNAs

The RNA interference effects of the synthesized unmodified double-stranded RNAs and lipid-modified double-

stranded RNAs were evaluated using Renilla luciferase as a target. HeLa cells (human cervical cancer cells; Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University) adjusted to 1×10^5 cells/ml prior to the experiments were seeded on a 96-well plate at 100 μ l per well, and incubated at 37°C overnight. On the following day, the old medium on the well was removed, and a new, antibiotic-free medium was added at 80 μ l per well, and a complex solution of a vector expressing the firefly and Renilla luciferases (psiCHECKTM-2 Vector; Promega) and LipofectamineTM 2000 (trade name; Invitrogen) was added at 10 μ l per well containing the HeLa cells. The expression vector was adjusted to 0.02 μ g per well, and LipofectamineTM 2000 was adjusted to 0.2 μ l per well, and OptiMem (Invitrogen) was used to adjust the volume to a necessary level. To form a complex, the expression vector and LipofectamineTM 2000 were mixed using OptiMem, and then the mixture was incubated at room temperature for 30 minutes. After the addition of the complex solution, the cells were incubated at 37°C for 4 hours in the presence of 5% CO₂. After incubation, the unmodified double-stranded RNAs and the double-stranded RNAs modified with a lipid at the end, containing an antisense sequence homologous to the gene sequence of the Renilla luciferase, were complexed with LipofectamineTM 2000 (Invitrogen) at final concentrations of 0 nM, 0.2 nM, 0.5 nM, 1 nM, 2 nM, 5 nM, and 10 nM, and 10 μ l each of the resulting complex solutions was added to the HeLa cells into which the expression vector was introduced. The final volume per well was 100 μ l. The complex solution of each RNA and LipofectamineTM 2000 was prepared by mixing the aqueous RNA solution at 5 μ l per well and a solution of LipofectamineTM 2000 (0.2 μ l) and OptiMem at 5 μ l per well, and incubating the mixture at room temperature for 30 minutes. After the RNA introduction, the cells were incubated for 48 hours, and the levels of firefly and Renilla luciferase expression were assayed using a Dual-GloTM Luciferase Assay System (Promega) and a luminometer (MicroLumat LB96p; Berthold), and the inhibitory effects on the Renilla luciferase expression were determined

based on the level of firefly luciferase expression as a control.

FIG. 5 shows the inhibitory effects on gene expression attained when the concentration of the unmodified double-stranded RNAs and lipid-modified double-stranded RNAs was 0.2 nM. As a result, it was found that when double-stranded RNAs containing a blunt end on the 5' end side of the sense strand, such as Ds RNAs and RO RNAs, were modified with a lipid, these double-stranded RNAs demonstrated RNA interference effects dramatically improved over the effects provided by the double-stranded RNAs that had the same structure but were not modified with a lipid. It was also found that such high RNA interference effects were attained, irrespective of the strand length or position of the dangling end in the RO RNA, by modifying the 5' end of the sense strand with a lipid, as compared with the unmodified RO RNA with the same structure. These results led to a new finding that the RNA interference effects can be dramatically improved by modifying with a lipid the 5' end of the sense strand of RNA interference molecules containing a blunt end on the 5' end side of the sense strand, such as DS RNAs and RO RNAs. Furthermore, si 21A2C16/21B and si 21A2C12/21B, in which the 5' end of the sense strand of 21nt siRNA was modified with a lipid, were also found to demonstrate RNA interference effects greater than the effects provided by the unmodified 21nt siRNA.

5. RNA Interference Effects of Lipid-Modified Double-Stranded RNAs Targeting the Luciferase Genes (Without Using a Gene Transfection Reagent)

Lipid-modified double-stranded RNAs were transfected into cells alone without using any gene transfection reagents such as Lipofectamine™ 2000 or the like, and evaluated whether or not they demonstrated RNA interference effects.

HeLa cells (human cervical cancer cells; Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University) adjusted to 1×10^5 cells/ml prior to the experiments were seeded on a 96-well plate at 100 μ l per well, and incubated at 37°C overnight. On the following day, the old medium on the well was removed, a new,

antibiotic-free medium was added at 80 μ l per well, and a complex solution of a vector expressing the firefly and Renilla luciferases (psiCHECKTM-2 Vector; Promega) and LipofectamineTM 2000 (trade name; Invitrogen) was added at 10 μ l per well containing the HeLa cells. The expression vector was adjusted to 0.02 μ g per well, and LipofectamineTM 2000 was adjusted to 0.2 μ l per well; OptiMem (Invitrogen) was used to adjust the volume to a necessary level. To form a complex, the expression vector and LipofectamineTM 2000 were mixed using OptiMem, and then the mixture was incubated at room temperature for 30 minutes. After the addition of the complex solution, the cells were incubated at 37°C for 4 hours in the presence of 5% CO₂. Each well was then washed with 100 μ l of the medium three times to remove LipofectamineTM 2000 from the well. A medium containing 90 μ l of antibiotics was subsequently added to the cells, and the unmodified double-stranded RNAs and the lipid-modified double-stranded RNAs, containing an antisense sequence homologous to the gene sequence of the Renilla luciferase, were adjusted with OptiMem to prepare samples at final concentrations of 0 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 600 nM, 800 nM, and 1 μ M, and 10 μ l each of the resulting samples was added to the cells, which were then incubated at 37°C for 48 hours. The levels of firefly and Renilla luciferase expression were assayed using a Dual-GloTM Luciferase Assay System (Promega) and a luminometer (MicroLumat LB96p; Berthold). As comparisons, the unmodified 21nt siRNA (si 21A2/21B) and 27nt dsRNA (Ds 27A1/27B) were also evaluated for their RNA interference effects under the same conditions as described above.

The RNA interference effects were determined by evaluating the level of Renilla luciferase expression based on the level of firefly luciferase expression as a control. FIG. 6A shows the results for si 21A2/21B, Ds 27A1/27B, and Ds 27A1C16/27B when the final concentration was from 50 nM to 1 μ M, and FIG. 6B shows the results for Ds 23A1/23B and Ds 23A1C16/23B when the final concentration was from 25 nM to 800 nM. As a

result, it was revealed that Ds 27A1C16/27B and Ds 23A1C16/23B modified with palmitic acid at the 5' end region of the sense strand suppressed the Renilla luciferase expression, dependently upon the concentration of the double-stranded RNA; hence, these double-stranded RNAs, because they were modified with palmitic acid, were transfected into the cells alone and thereby produced RNA interference reactions. On the other hand, the unmodified double-stranded RNAs (si 21A2/21B, Ds 27A1/27B, and Ds 23A1/23B) did not demonstrate significant gene expression inhibitory effects even at high concentrations. This further confirmed that the double-stranded RNAs modified with palmitic acid had markedly superior cellular uptake efficiency, and demonstrated an excellent ability to inhibit gene expression without using a gene transfection reagent.

6. Evaluation of the Cellular Uptake efficiency of Lipid-Modified Double-Stranded RNAs

HeLa cells (human cervical cancer cells; Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University), A549 cells (human lung cancer cells; Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University), and SH10-TC cells (human stomach cancer cells; Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University), adjusted to 1×10^5 cells/ml prior to the experiments, as well as Jurkat cells (acute lymphatic leukemia cells; Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University) and K-562 cells (chronic myelogenous leukemia cells), adjusted to 2×10^5 cells/ml prior to the experiments, were seeded on 24-well plates at 1 ml per well, and the cells were incubated in a medium containing 10% fetal bovine serum (FBS; Sanko Junyaku, Inc.) and antibiotics at 37°C in the presence of 5% CO₂. Regarding the antibiotic and medium used herein, the antibiotic was an streptomycin for all cells, the medium was an MEM medium (Invitrogen) for the HeLa cells, and an RPMI-1640 (Invitrogen) medium for the other cells. Prior to the transfection of fluorescently labeled oligonucleotides, these media were replaced with an antibiotic-free medium (450 μ l). Oligonucleotides labeled

with 6-FAM at the 5' end region of the 27nt antisense strand were used as fluorescently labeled oligonucleotides, and the oligonucleotides were paired with the unmodified 27nt sense strand or the 27nt sense strand modified with a lipid at its 5' end region to form double strands. The cellular uptake efficiency experiments were performed as follows. To form a complex of the fluorescently labeled oligonucleotides and Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen), 50 µl of a mixed solution obtained by combining 25 µl of a mixed solution of 10 µl of a 10µM aqueous fluorescently labeled oligonucleotide solution and 15 µl of the OptiMem solution with 25 µl of a mixed solution of 2 µl of the Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) solution and 23 µl of the OptiMem solution was incubated at room temperature for 30 minutes. When Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) was not used (Section F in FIG. 7; -LF2000), the OptiMem solution was used in place of 2 µl of the Lipofectamine™ 2000 solution used under the conditions of forming a complex described above, and samples were prepared according to the same procedure as above. The resulting 50 µl of the fluorescently labeled oligonucleotide complex was added into 450 µl of the cells prepared above (the final concentration of the double-stranded RNAs: 200 nM), and incubated at 37°C for 4 hours in the presence of 5% CO₂. The cells were subsequently washed with PBS (-) or the medium three times, and the cellular uptake efficiency of the double-stranded RNAs was evaluated using a confocal fluorescence laser microscope and flow cytometry.

In the evaluation using a confocal fluorescence laser microscope, a Radiance 2000 system (Bio Rad) was used, and fluorescence was observed using an argon laser. In the flow cytometry, the cellular uptake efficiency per 10,000 cells counts was measured using a coulter EPICS XL cytometer (Beckman coulter). XL EXPO32™ software (Beckman coulter) was used in the flow cytometric analysis.

The results are shown in FIGS. 7-1 to 7-3. Section F (-LF2000) in FIG. 7-3 shows the results when Lipofectamine™ 2000 was not used, and Sections A to E (+LF2000) in FIGS. 7-1 to 7-3

show the results when LipofectamineTM 2000 was used as a gene transfection reagent. Section A in FIG. 7-1 shows the results of the cellular uptake efficiency of the various double-stranded RNAs into HeLa cells, using LipofectamineTM 2000 as a gene
5 transfection reagent; Section B in FIG. 7-1 shows the results for A549 cells; Section C in FIG. 7-2 shows the results for SH10-TC cells; Section D in FIG. 7-2 shows the results for K-562 cells; and Section E in FIG. 7-3 shows the results for Jurkat cells. Section F in FIG. 7-3 shows the results of the cellular uptake
10 efficiency of the various double-stranded RNAs into HeLa cells without using a commercially available gene transfection reagent. Consequently, the transfection of the unmodified double-stranded RNA and lipid-modified double-stranded RNAs into all of the cells (HeLa cells, A549 cells, SH10-TC cells, Jurkat cells, and K-562
15 cells) was confirmed in the presence of LipofectamineTM 2000. Particularly with Ds 27A1C16/27B modified with palmitic acid at the 5' end of the sense strand, very high cellular uptake efficiency was observed using a confocal fluorescence laser microscope and flow cytometry, as compared with the unmodified
20 double-stranded RNA and the double-stranded RNA modified with a lauric acid. In addition, the observation using a confocal fluorescence laser microscope suggested that the double-stranded RNA modified with palmitic acid was actively localized into the cytoplasm of cells. In the adherent cells (the HeLa cells, A549
25 cells, and SH10-TC cells) in particular, this uptake efficiency was notably apparent. Furthermore, the flow cytometric analysis confirmed that the double-stranded RNA modified with palmitic acid demonstrated higher cellular uptake efficiency than the unmodified double-stranded RNA also in the presence of
30 LipofectamineTM 2000. These results led to a new finding that when a double-stranded RNA is covalently linked with a lipid such as palmitic acid or the like at the 5' end region of the sense strand, the double-stranded RNA can demonstrate dramatically improved cellular uptake efficiency, and can be localized into
35 the cytoplasm of cells.

Example 2: Inhibitory Effects of 5' Lipid-Modified Double-Stranded RNAs on the VEGF Gene Expression

1. Synthesis of Lipid-Modified Double-Stranded RNAs Targeting the VEGF Gene

5 1-1. Sequences of Sense Strands and Antisense Strands

Double-stranded RNAs containing a 27- or 21-base-long sense strand and a 27- or 21-base-long antisense strand were designed having a sequence homologous to VEGF (the vascular endothelial growth factor) and capable of suppressing the expression of the VEGF gene. The following experiments were conducted using these double-stranded RNAs. The 27nt dsRNA is a completely double-stranded RNA not containing a dangling end (a single-stranded region) (i.e., a double-stranded RNA containing blunt ends on both of the 5' and 3' end sides of the sense strand), and the 21siRNA is a double-stranded RNA containing 2 base dangling ends on the 3' ends of both of the sense and antisense strands. The sequences of the 27nt dsRNA and 21siRNA used are as follows.

20 27nt dsRNA:

sense strand: v27A: 5'-CUUCCUACAGCACAAACAAUGUGAAUG-3' (SEQ ID NO: 10)

antisense strand: v27B: 3'-GAAGGAUGUCGUGUUGUUUACACUUAC-5' (SEQ ID NO: 11)

25

21siRNA:

sense strand: v21A: 5'-UCCUACAGCACAAACAAUGUG-3' (SEQ ID NO: 12)

antisense strand: v21B: 3'-GAAGGAUGUCGUGUUGUUUAC-5' (SEQ ID NO: 13).

30

1-2. Synthesis of Lipid-Unmodified Double-Stranded RNAs Targeting the VEGF Gene

The above-mentioned sense strands and antisense strands were annealed in the same manner as Example 1 to form double strands, thereby producing lipid-unmodified double-stranded RNAs.

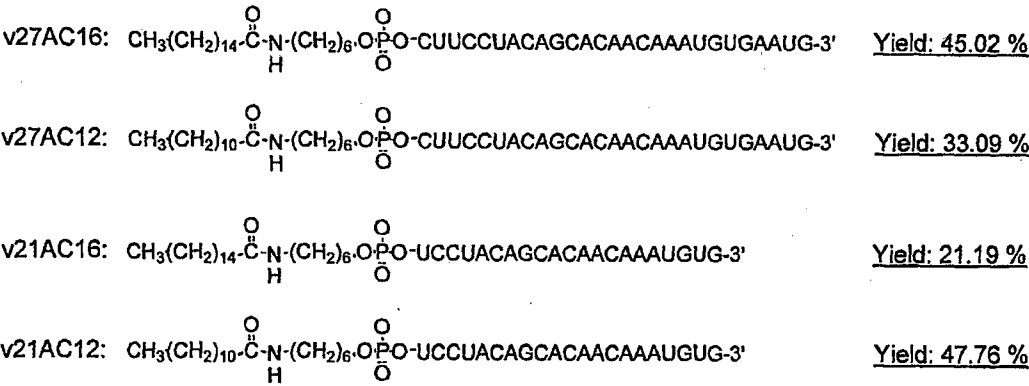
35

The formation of the double strands was confirmed by 20% acrylamide gel electrophoresis, according to the same procedure as Example 1.

1-3. Synthesis of Lipid-Modified Double-Stranded RNAs Targeting the VEGF Gene

Lipid-modified double-stranded RNAs in which a lipid was linked to the 5' end of the sense strands of the above-mentioned double-stranded RNAs capable of inhibiting the expression of the VEGF gene were synthesized. In the lipid-modified double-stranded RNAs, the lipid was covalently attached via an aminoalkyl group (Amino Modifier C6; Glen Research) linked to the 5' end of the above-mentioned sense strand. The lipid-modified single-stranded RNAs (sense strands) were synthesized according to the same procedure as Example 1.

The structural models and yields of the lipid-modified RNAs targeting the VEGF gene are as follows.



The resulting lipid-modified sense strands were paired with the antisense strands to produce lipid-modified double-stranded RNAs. The formation of the double strands was confirmed by 20% acrylamide gel electrophoresis according to the same procedure as Example 1. FIG. 8 shows the structures of the lipid-modified double-stranded RNAs. In the lipid-modified RNAs targeting the VEGF gene, the elution times were also substantially the same as in Example 1.

2. Processing by Dicer of the Lipid-Modified Double-Stranded RNAs Targeting the VEGF Gene

Processing by recombinant Dicer of the synthesized lipid-unmodified double-stranded RNAs and lipid-modified double-stranded RNAs was evaluated. The Dicer cleavage experiments were performed according to the same procedure as Example 1. The results are shown in FIG. 9.

As a result, with Ds v27AC16/v27B and Ds v27AC12/v27B, bands were observed in similar positions to the unmodified 21siRNA by the action of recombinant Dicer, thus strongly indicating the production of 21-base-long siRNAs containing a dangling end of two bases by Dicer cleavage. These results established that attaching a lipid to the 5' end of the sense strand of 27nt dsRNA does not hinder Dicer processing. With si v21AC16/v21B and si v21AC12/v21B, on the other hand, no change was observed even in the presence of Dicer, as compared to when Dicer was absent, revealing that they were not processed by Dicer.

3. Inhibition of the VEGF Gene Expression by Lipid-Modified Double-Stranded RNAs

21nt siRNA with unmodified ends, 27nt dsRNA with unmodified ends, 27nt dsRNA modified with a lipid at the 5' end of the sense strand (27nt dsRNA modified with a lipid at the end), and 21nt siRNA modified with a lipid at the 5' end of the sense strand (21nt siRNA modified with a lipid at the end) were evaluated for their inhibitory effects on the VEGF gene expression, using HeLa cells (human cervical cancer cells; Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University), A549 cells (human lung cancer cells; Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University), SH10-TC cells (human stomach cancer cells; Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University), Jurkat cells (acute lymphatic leukemia cells; Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University), and K-562 cells (chronic myelogenous leukemia cells; Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University). In addition, double-stranded RNAs not having a gene sequence homologous to the VEGF gene (27nt dsRNA (Random) and 21nt siRNA (Random)), as well as lipid-modified double-stranded RNAs in which a lipid was

linked to the 5' end of the sense strands of these double-stranded RNAs, were similarly evaluated.

The experiments were performed according to the following procedures. HeLa cells, A549 cells, and SH10-TC cells adjusted to 1×10^5 cells/ml prior to the experiments, as well as Jurkat cells and K-562 cells adjusted to 2×10^5 cells/ml prior to the experiments, were seeded on 24-well plates at 500 μ l per well, and incubated at 37°C overnight. On the following day, the old medium on the wells was removed, and a new, antibiotic-free medium was added at 450 μ l per well. An MEM medium was used for the HeLa cells, and a PRMI-1640 medium was used for the other cells. A complex of the unmodified or lipid-modified double-stranded RNAs (25 μ l) containing an antisense sequence homologous to the gene sequence of VEGF with the Lipofectamine™ 2000 solution (Invitrogen) (25 μ l) was formed, and then 50 μ l each of the double-stranded RNA solutions was added to 450 μ l of the above-mentioned cells. The final volume per well was 500 μ l. The complex solution of each RNA and the Lipofectamine™ 2000 solution was prepared by mixing the aqueous RNA solution at 25 μ l per well and a solution of Lipofectamine™ 2000 (2 μ l) and OptiMem at 25 μ l per well, and incubating the mixture at room temperature for 30 minutes. After the RNA introduction, the cells were incubated at 37°C for 48 hours in the presence of 5% CO₂. After incubation, the cells were washed with PBS (-) three times, and the total RNA in the cells was extracted using an RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). The RT-PCR reactions were subsequently performed to measure the amount of mRNA in VEGF. A Qiagen OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) was used for the RT-PCR reaction, and 5'-CCC TGA TGA GAT CGA GTA CAT CTT-3' (SEQ ID NO: 14) and 5'-ACC GCC TCG GCT TGT CAC-3' (SEQ ID NO: 15) were used as the PCT primers for VEGF. As a control, the GAPDH gene was measured according to the same procedure. 5'-GGAAAGCTGTGGCGTGATG-3' (SEQ ID NO: 16) and 5'-CTGTTGCTGTAGCCGTATTC-3' (SEQ ID NO: 17) were used as the primers for GAPDH. The RT-PCR reactions were performed as follows. The RT (Reverse Transcription) reaction was performed at 50°C for 30

minutes, and the PCR reaction, which involved repeated 25 to 28 cycles (depending on the cells used) of a double-strand separation reaction at 92°C for 30 seconds, an annealing reaction at 55°C for 30 seconds, and an elongation reaction at 68°C for 45
5 seconds, was performed. Lastly, incubation was preformed at 68°C for 10 minutes, the temperature was decreased to 4°C, and the reaction was completed. The reagents, total RNA, primers, and the like used in RT-PCR were prepared according to the reaction conditions of the Qiagen OneStep RT-PCR Kit (Qiagen). After the
10 RT-PCR reactions, 2 µl of a loading die was added, and the RT-PCR products derived from the mRNAs from VEGF and GAPDH were confirmed using 2% agarose gel. The inhibitory effects on gene expression were evaluated by measuring the level of VEGF expression in the cells into which the double-stranded RNAs (both
15 unmodified and modified) were transfected, assuming that the level of expression of the VEGF gene in the control cells (the cells into which the double-stranded RNAs were not transfected) was 100%. The error in the levels of expression among the cells was corrected based on the level of gene expression of the
20 control gene (GAPDH).

FIGS. 10-1 to 10-3 show the results of the RNA interference effects of the unmodified double-stranded RNAs and lipid-modified double-stranded RNAs when VEGF was targeted and the concentration of the double-stranded RNAs was 200 nM. Graph A
25 in FIG. 10-1 shows the inhibitory effects of the unmodified double-stranded RNAs and lipid-modified double-stranded RNAs on the expression of the VEGF gene in the HeLa cells; Graph B in FIG. 10-2 shows the results for the A549 cells; Graph C in FIG. 10-2 shows the results for the SH10-TC cells; Graph D in FIG. 10-3
30 shows the results for the Jurkat cells; and Graph E in FIG. 10-3 shows the results for the K-562 cells. These results revealed that Ds v27AC16/v27B and Ds v27AC12/v27B, each obtained by modifying the 5' end of the sense strand of the 27-base-long double-stranded RNA (Ds v27A/v27B) with a lipid, as well as si
35 v21AC16/v21B and si v21AC12/v21B, each obtained by modifying the

5' end of the sense strand of the 21-base-long double-strand RNA (si v21A/v21B) with a lipid, possessed very high inhibitory effects on the VEGF gene expression, as compared with the unmodified double-stranded RNAs (si v21A/21B and Ds v27A/v27B).

5 Ds v27AC16/v27B modified with palmitic acid, in particular, demonstrated markedly higher inhibitory effects on gene expression for all of the cells (the HeLa cells, A549 cells, SH10-TC cells, Jurkat cells, and K-562 cells), as compared with the unmodified double-stranded RNAs (si v21A/21B and Ds

10 v27A/v27B). This confirmed that the RNA interference effects can be dramatically improved by modifying double-stranded RNAs with lipids such as palmitic acid and the like. The unmodified double-stranded RNAs and lipid-modified double-stranded RNAs not having a gene sequence homologous to the VEGF gene were also similarly

15 evaluated for their inhibitory effects on gene expression, but none of the double-stranded RNAs demonstrated any significant inhibitory effects on the VEGF gene. These results revealed that the double-stranded RNAs targeted against VEGF used herein inhibited the expression of the target gene in a highly sequence-

20 specific manner, and also suggested that side effects on the cells can be reduced by linking a lipid to the double-stranded RNAs.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

25 FIG. 1 shows the structures of the unmodified and lipid-modified double-stranded RNAs synthesized in Example 1.

FIG. 2 shows the results of HPLC analysis performed on the lipid-modified single-stranded RNAs in Example 1.

30 FIG. 3 shows the nuclease resistances of the double-stranded RNAs modified with a lipid at the 5' end, which were measured in Example 1.

FIG. 4 shows the evaluation results of the processing by Dicer of each of the lipid-modified double-stranded RNAs in Example 1.

35 FIG. 5 shows the evaluation results of the RNA

interference effects of the lipid-modified 27nt dsRNAs at a concentration of 0.2 nM in Example 1.

FIG. 6 shows the evaluation results of the RNA interference effects of the double-stranded RNAs modified with a lipid at the 5' end (without using a gene transfer agent) in Example 1.

FIG. 7-1 shows the evaluation results of the cellular uptake of the lipid-modified double-stranded RNAs into HeLa and A549 cells in Example 1; wherein "FL" denotes images taken with a fluorescence microscope; "Trans" denotes images taken with a phase contrast microscope in the same field of view as that of the FL images; and "Merge" denotes images in which the FL image and Trans image were superimposed.

FIG. 7-2 shows the evaluation results of the cellular uptake of the lipid-modified double-stranded RNAs into SH10-TC and K562 cells in Example 1; wherein "FL" denotes images taken with a fluorescence microscope; "Trans" denotes images taken with a phase contrast microscope in the same field of view as that of the FL images; and "Merge" denotes images in which the FL image and Trans image were superimposed.

FIG. 7-3 shows the evaluation results of the cellular uptake of the lipid-modified double-stranded RNAs into Jurkat and HeLa cells in Example 1; wherein "FL" denotes images taken with a fluorescence microscope; "Trans" denotes images taken with a phase contrast microscope in the same field of view as that of the FL images; and "Merge" denotes images in which the FL image and Trans image were superimposed.

FIG. 8 shows the structures of the unmodified and lipid-modified double-stranded RNAs synthesized in Example 2.

FIG. 9 shows the evaluation results of the processing by Dicer of each of the lipid-modified double-stranded RNAs in Example 2.

FIG. 10-1 shows the evaluation results of the RNA interference effects of lipid-modified double-stranded RNAs on the VEGF gene in HeLa cells in Example 2.

FIG. 10-2 shows the evaluation results of the RNA interference effects of lipid-modified double-stranded RNAs on the VEGF gene in A549 and SH10-TC cells in Example 2.

FIG. 10-3 shows the evaluation results of the RNA
5 interference effects of lipid-modified double-stranded RNAs on the VEGF gene in Jurkat and K567 cells in Example 2.

CLAIMS

1. A lipid-modified double-stranded RNA comprising a sense strand having a nucleotide sequence complementary to a target sequence in a target gene, and an antisense strand having a nucleotide sequence complementary to the sense strand, the double-stranded RNA being capable of inhibiting expression of the target gene, and the sense strand having a lipid linked to at least one of the first to sixth nucleotides from the 5' end directly or via a linker.

2. A lipid-modified double-stranded RNA according to claim 1 which is blunt-ended on the 5' end side of the sense strand, and is blunt-ended or has a dangling end on the 3' end side of the sense strand.

3. A lipid-modified double-stranded RNA according to claim 1 which has dangling ends on both the 5' and 3' end sides of the sense strand.

4. A lipid-modified double-stranded RNA according to any one of claims 1 to 3, wherein the sense strand consists of 21 to 27 nucleotides.

5. A lipid-modified double-stranded RNA according to claim 2 which is blunt-ended on both the 5' and 3' end sides of the sense strand, and in which each of the sense and antisense strands consists of 27 nucleotides.

6. A lipid-modified double-stranded RNA according to claim 2 which is blunt-ended on both the 5' and 3' end sides of the sense strand, and in which each of the sense and antisense strands consists of 23 nucleotides.

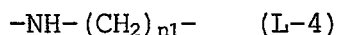
7. A lipid-modified double-stranded RNA according to claim 2 which is blunt-ended on the 5' end side of the sense strand, the sense strand consisting of 25 nucleotides, and the antisense strand consisting of 23 nucleotides.

8. A lipid-modified double-stranded RNA according to claim 3, wherein each of the sense and antisense strands consists of 21 nucleotides.

9. A lipid-modified double-stranded RNA according to any one of claims 1 to 8 wherein the lipid is a fatty acid having 6 to 50 carbon atoms.

5 10. A lipid-modified double-stranded RNA according to any one of claims 1 to 9 wherein the lipid is lauric acid, stearic acid, myristic acid, or palmitic acid.

10 11. A lipid-modified double-stranded RNA according to any one of claims 1 to 10 wherein the lipid is linked to at least one of the first to sixth nucleotides from the 5' end of the sense strand via a linker, the linker being represented by the structural formula



wherein $n1$ is an integer of 1 to 40.

15 12. A pharmaceutical composition comprising the lipid-modified double-stranded RNA of any one of claims 1 to 10 and a pharmaceutically acceptable base.

13. Use of the lipid-modified double-stranded RNA of any one of claims 1 to 10 for the production a pharmaceutical composition in order to inhibit the expression of a target gene.

20 14. A method of inhibiting the expression of a target gene comprising introducing a lipid-modified double-stranded RNA of any one of claims 1 to 10 into cells to inhibit the expression of the target gene.

Fig. 1

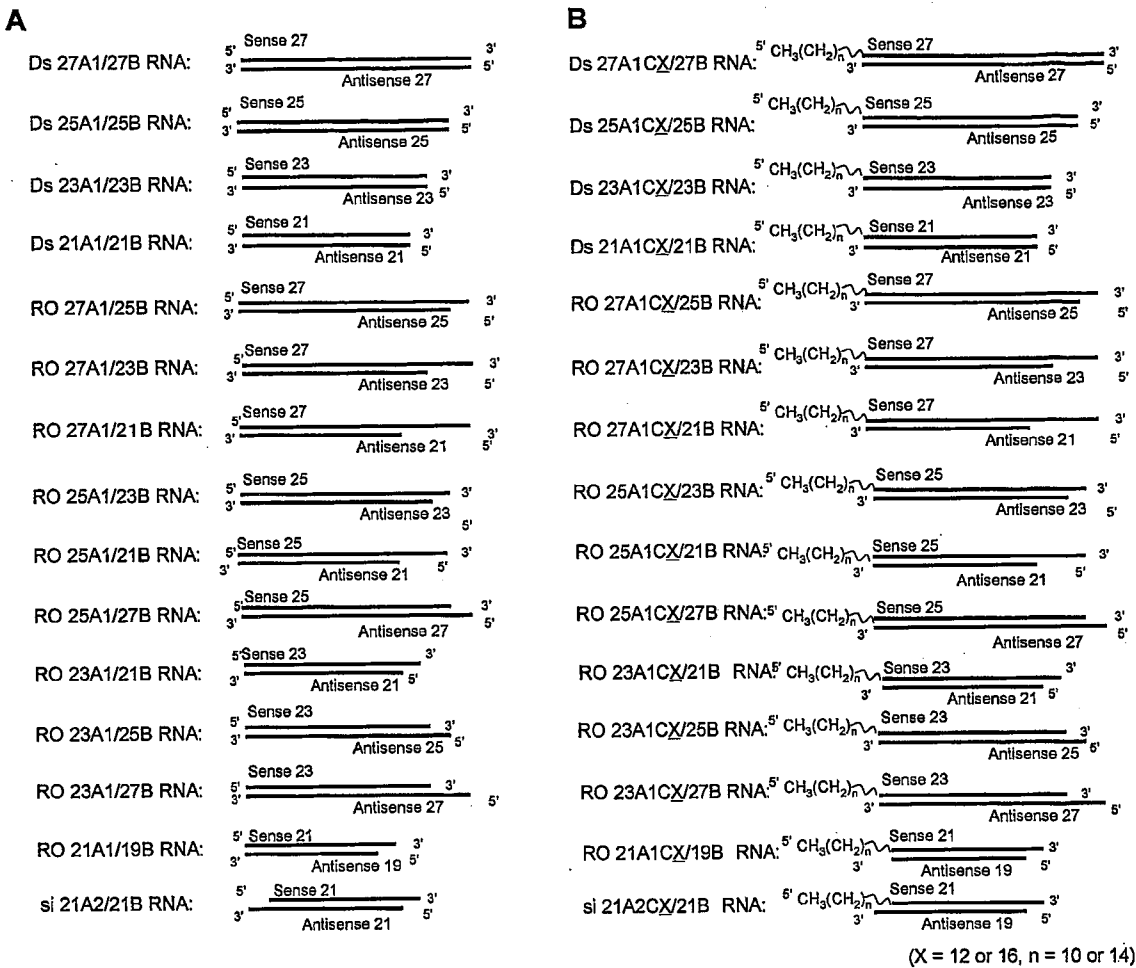


Fig. 2

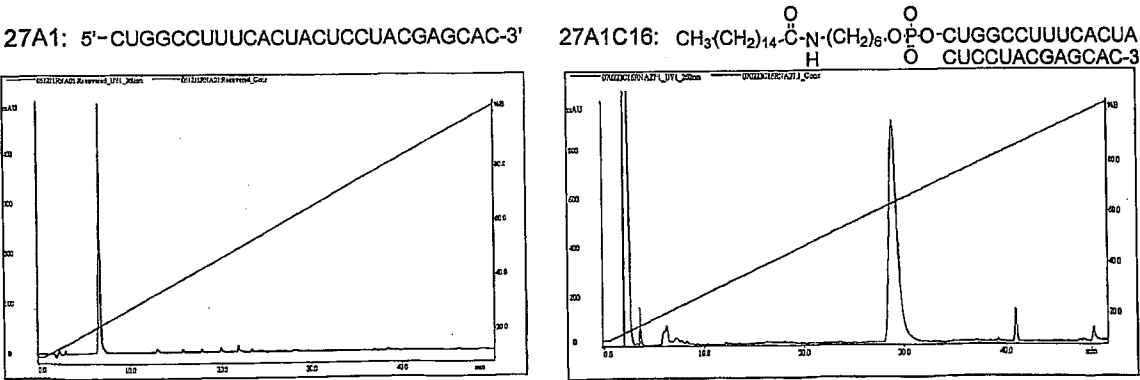


Fig. 3

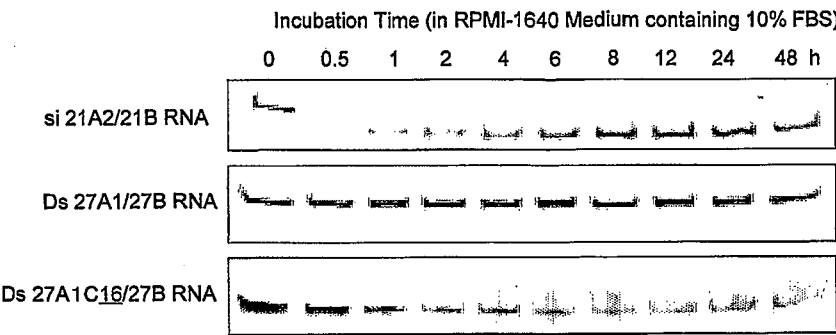
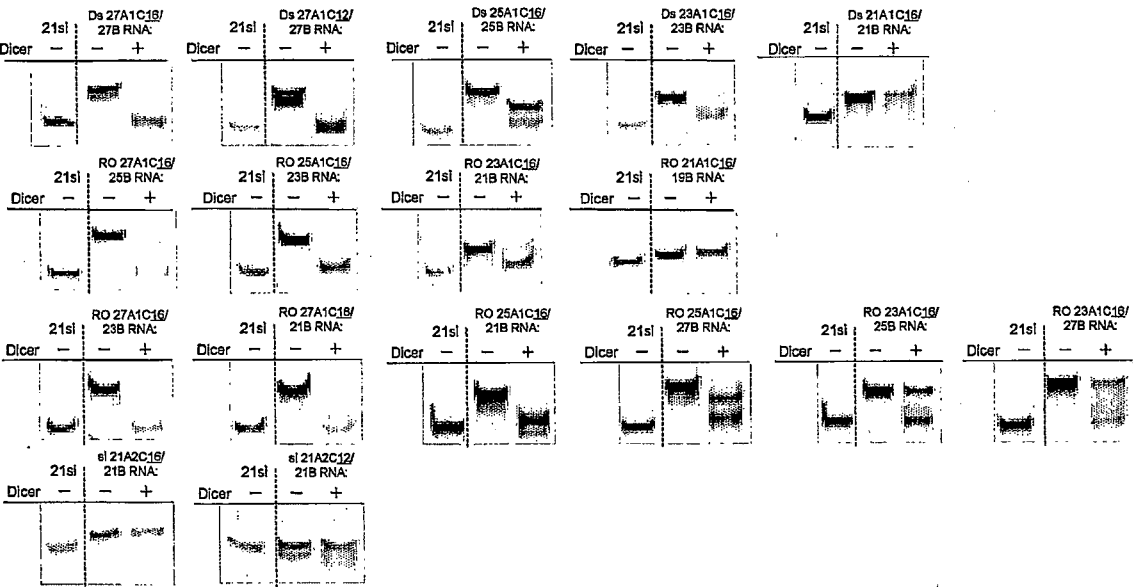
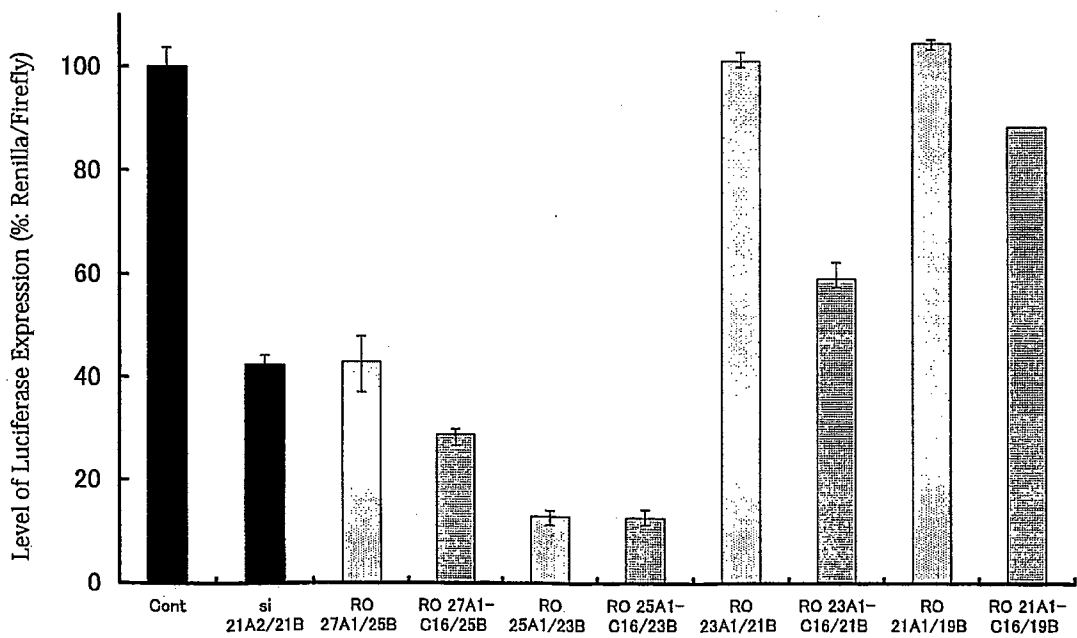
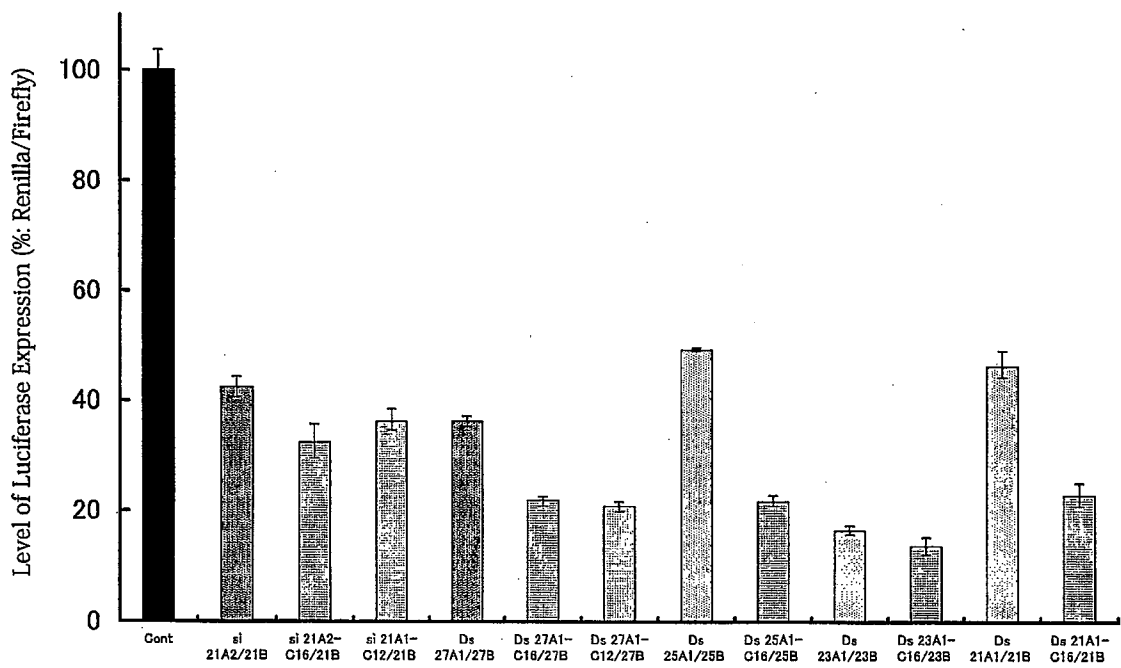


Fig. 4



51

Fig. 5



4/11

Fig. 6

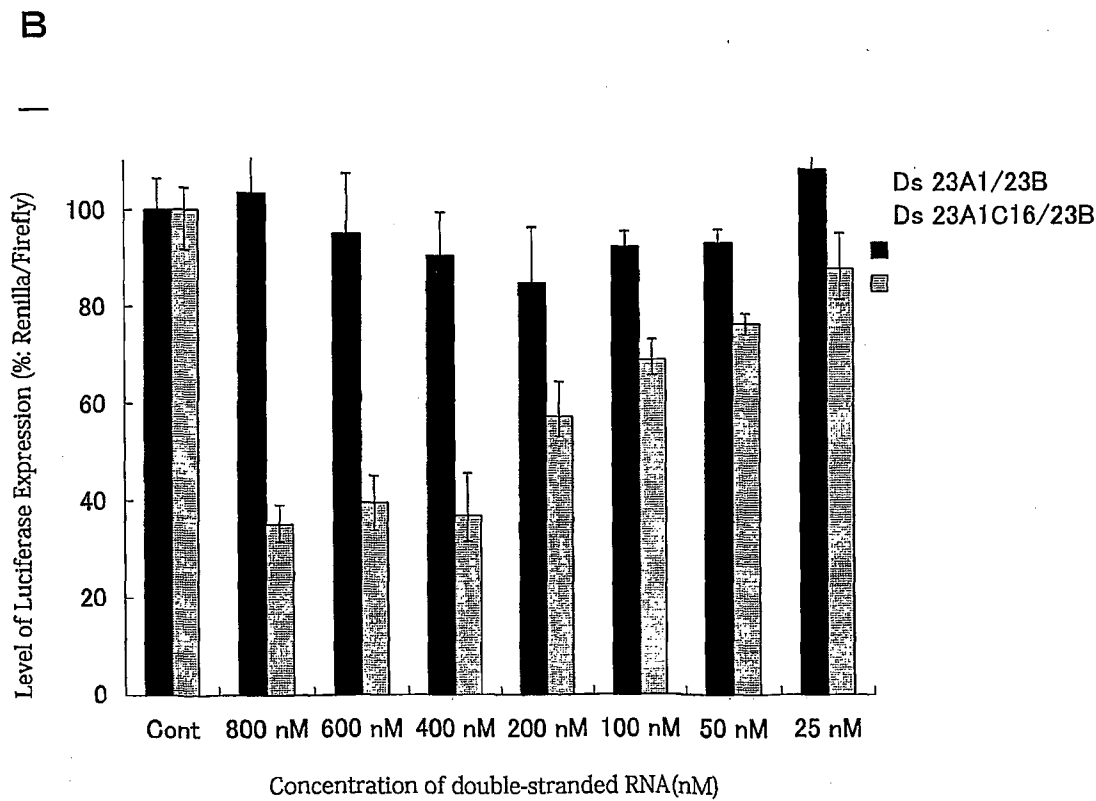
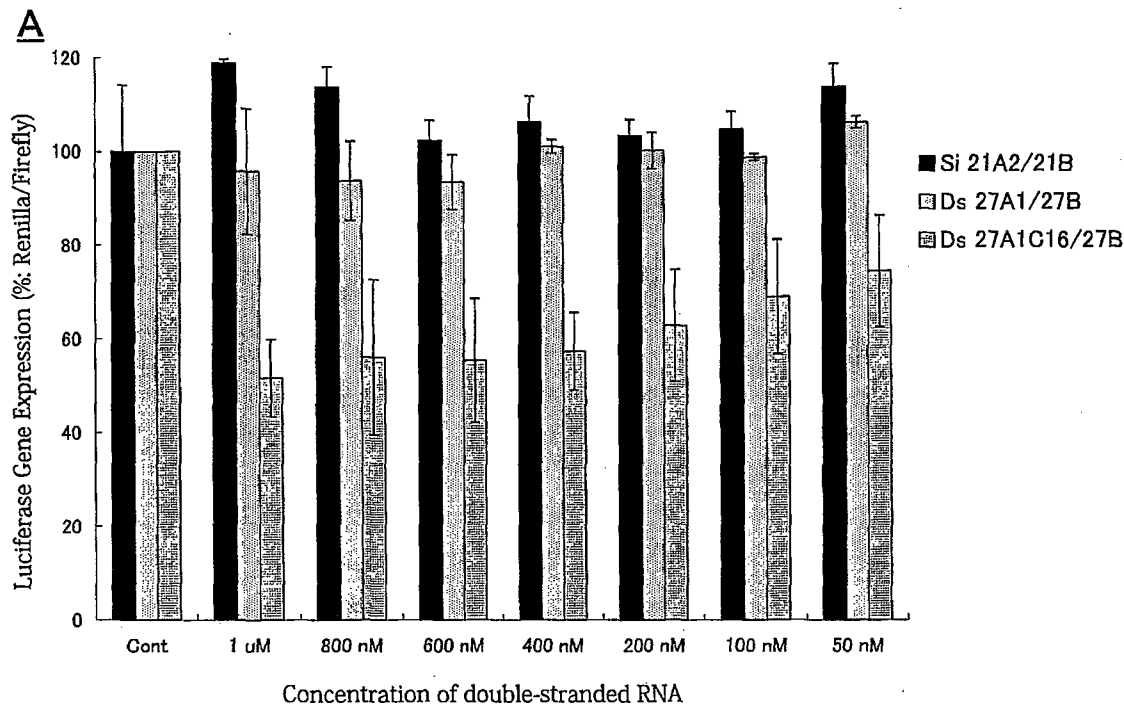


Fig. 7-1

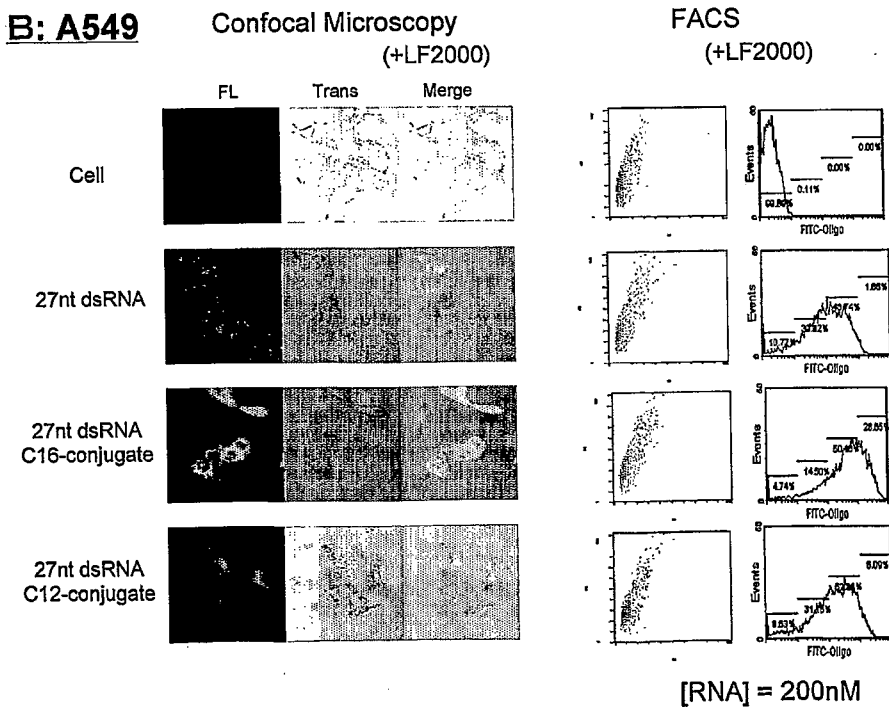
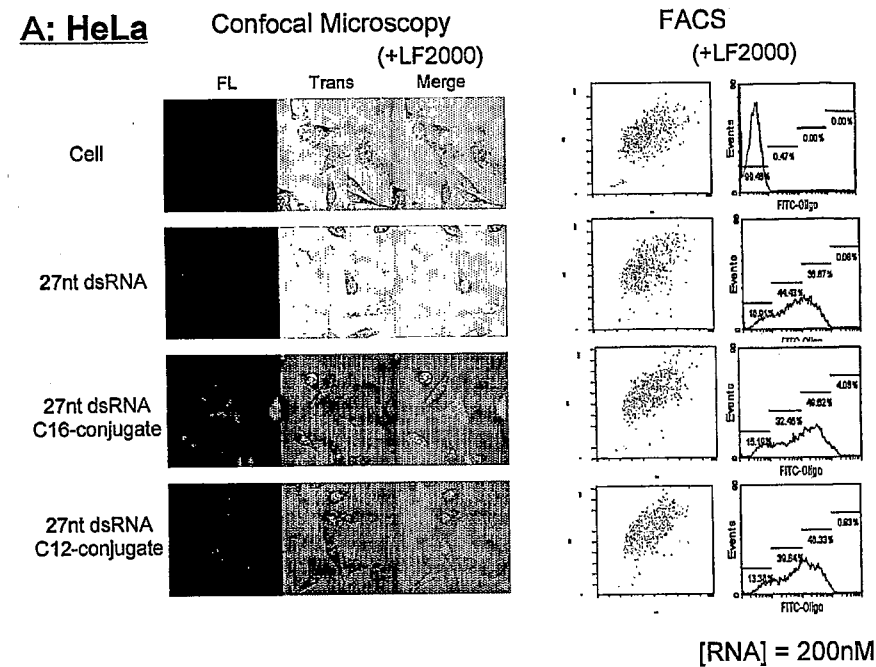


Fig. 7-2

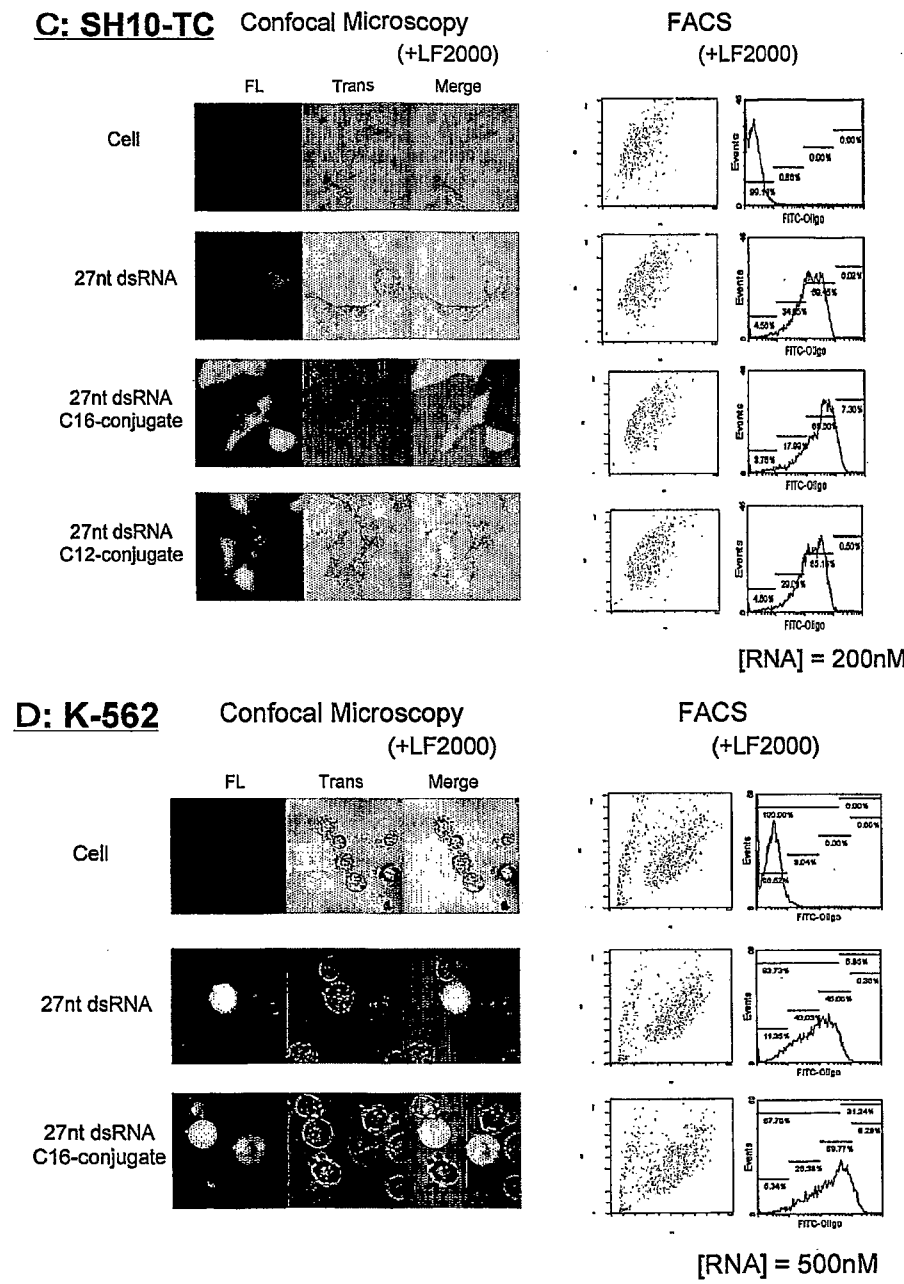


Fig. 7-3

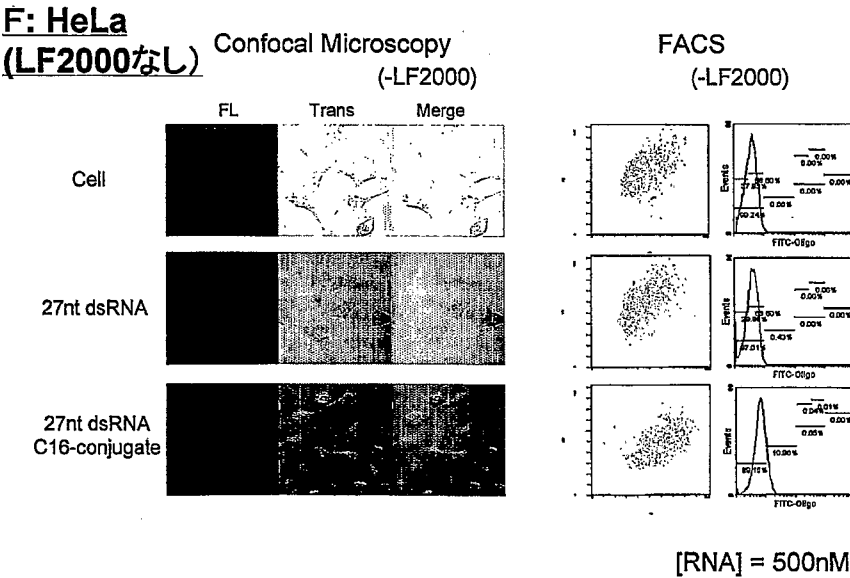
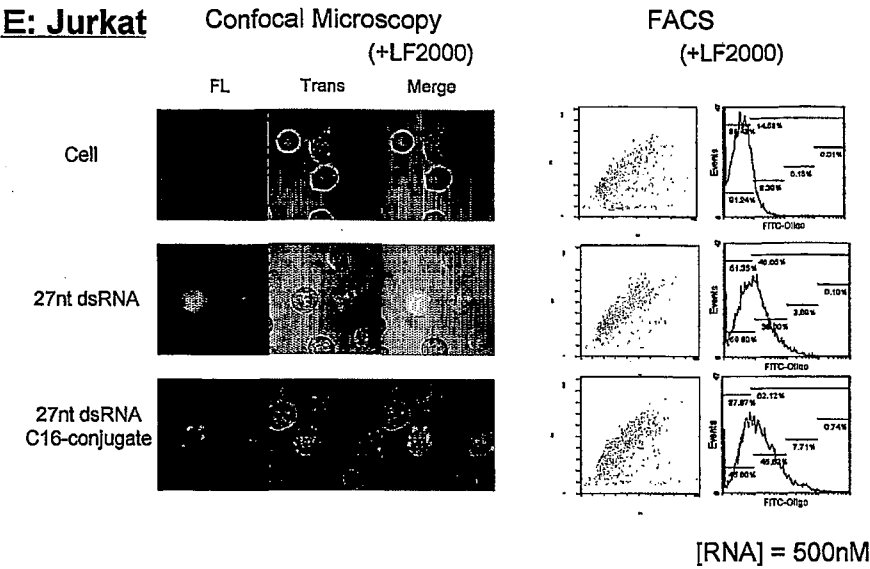


Fig. 8

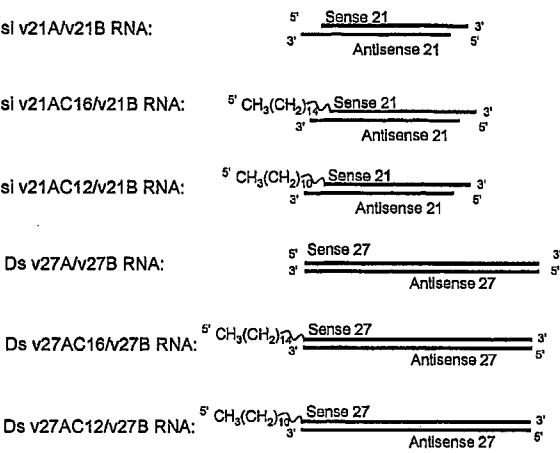
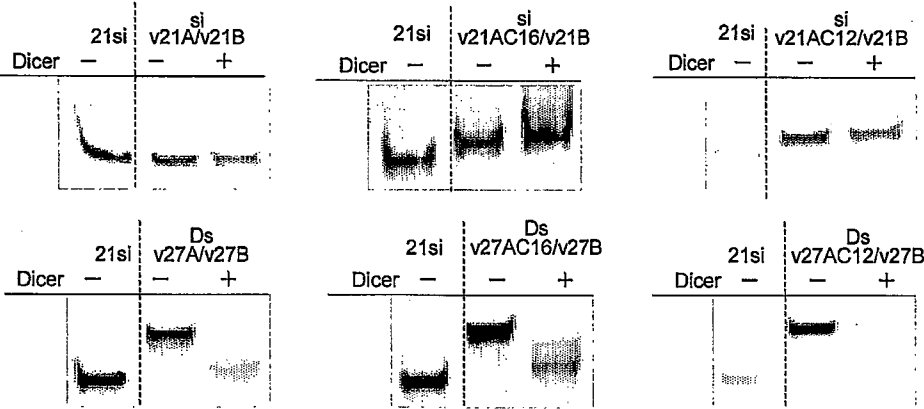


Fig. 9



57

Fig. 10-1

A: HeLa

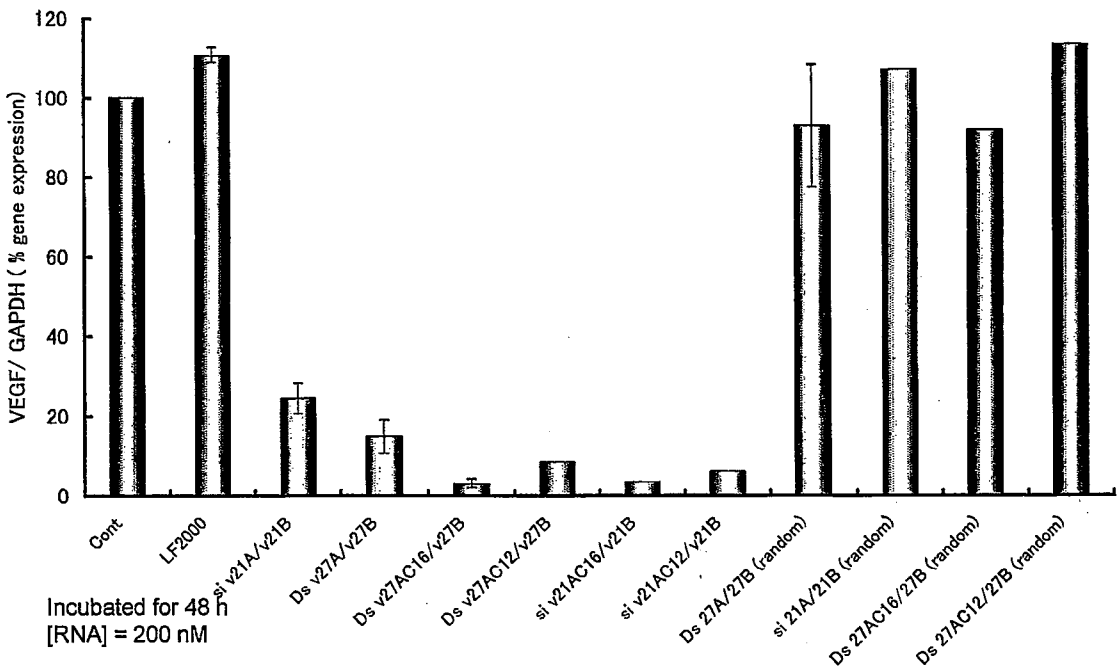
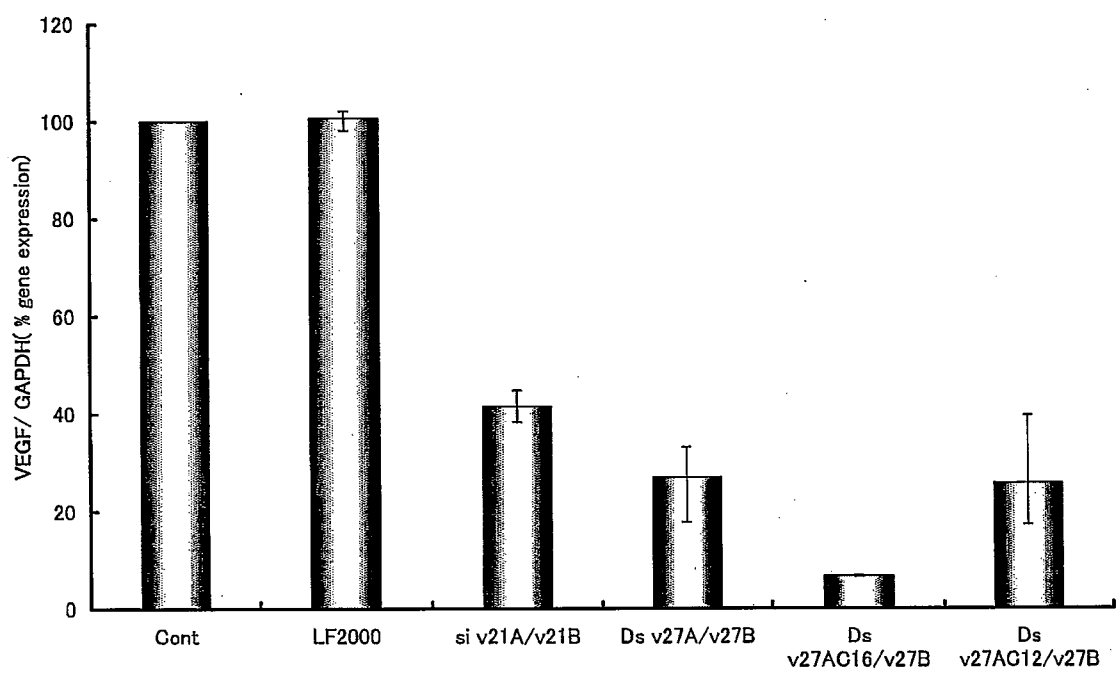


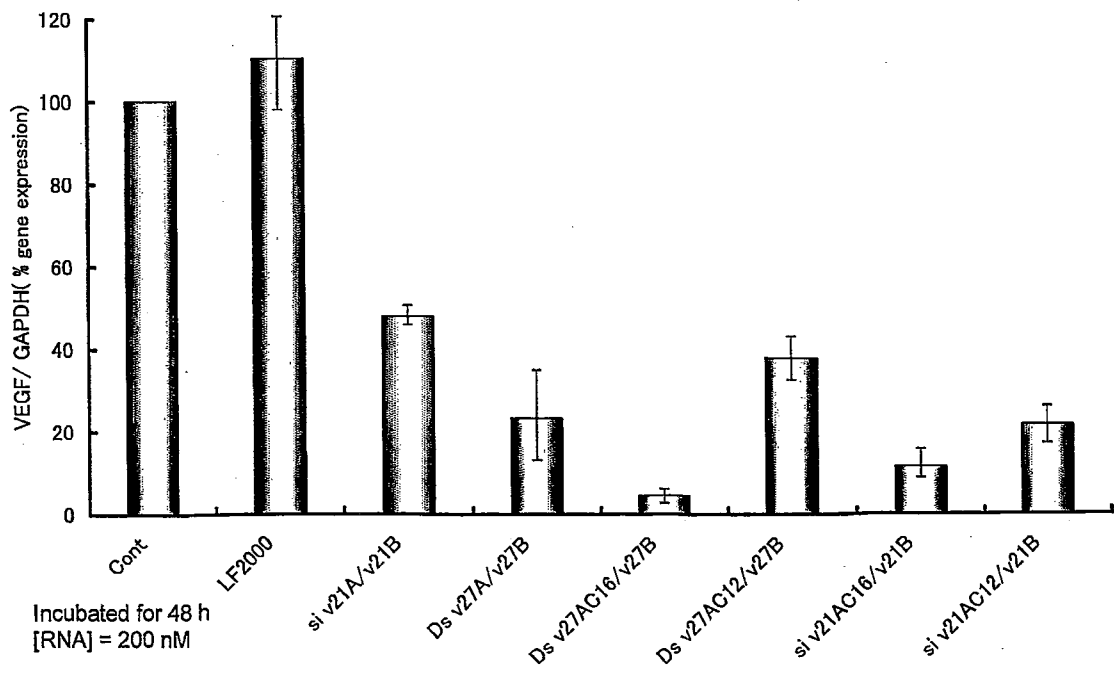
Fig. 10-2 10/11

B: A549



Incubated for 48 h
[RNA] = 200 nM

C: SH10-TC

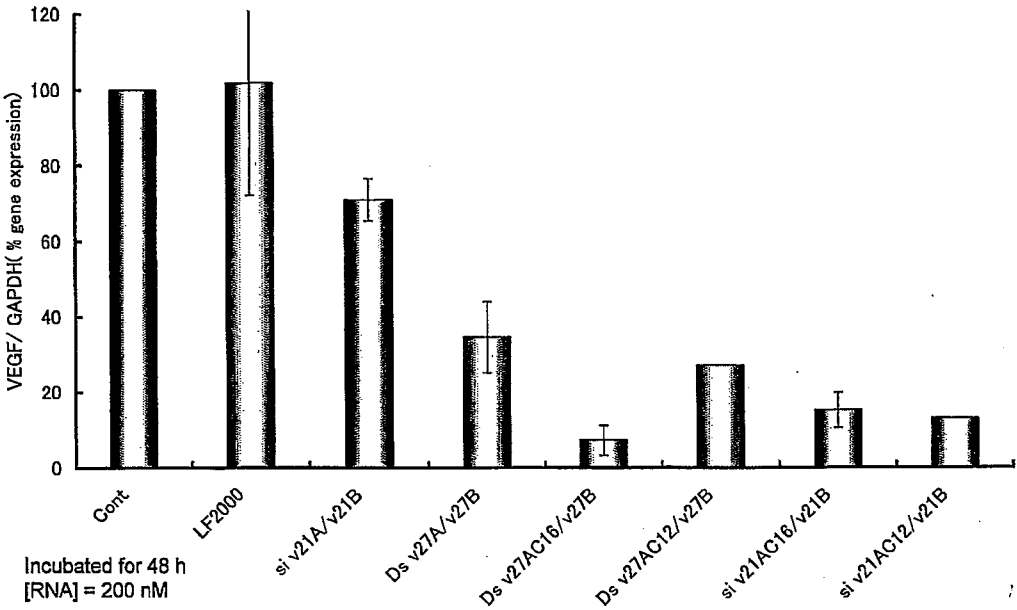


Incubated for 48 h
[RNA] = 200 nM

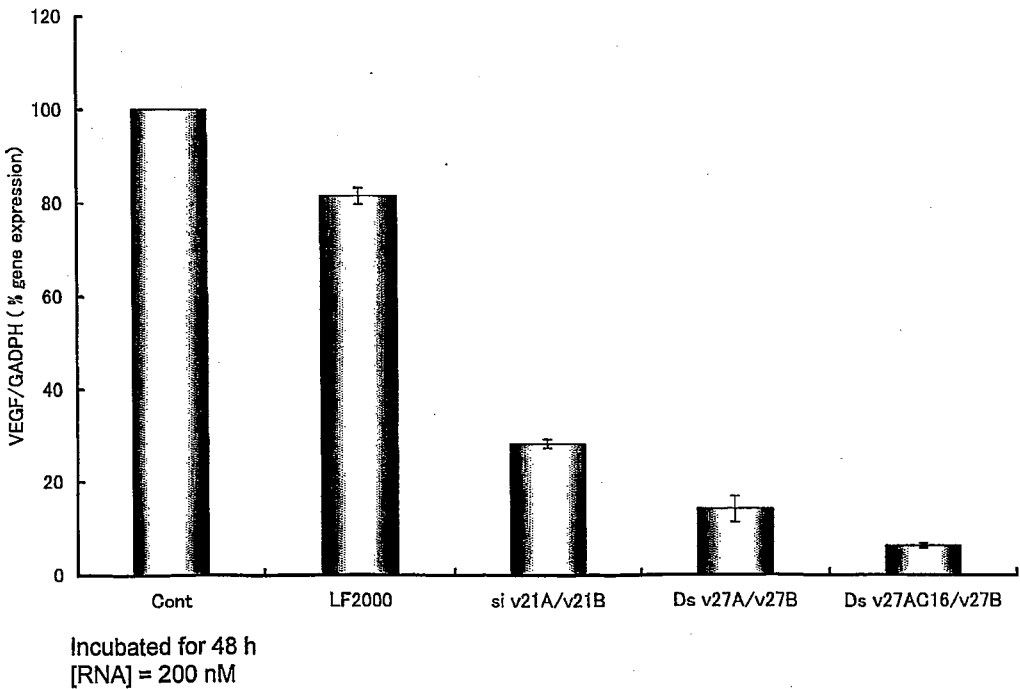
Fig. 10-3

11/11

D: Jurkat



E: K-562



SEQUENCE LISTING

<110> NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY
 <110> OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
 <110> HAYASHI KASEI CO., LTD.

<120> LIPID-MODIFIED DOUBLE-STRANDED RNA HAVING POTENT RNA INTERFERENCE EFFECT

<130> P08-117

<150> JP 2007-276985

<151> 2007-10-24

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 27

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequence of 27nt 27A1

<400> 1

cuggccuuuc acuacuccua cgagcac

27

<210> 2

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequence of 25nt 25A1

<400> 2

cuggccuuuc acuacuccua cgagc

25

<210> 3

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequence of 23nt 23A1

<400> 3

cuggccuuuc acuacuccua cga

23

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sequence of 21nt 21A1

<400> 4

cuggccuuuc acuacuccua c 2/4 21

<210> 5
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequence of 21nt 21A2

<400> 5
 ggccuuucac uacuccuacg a 21

<210> 6
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequence of 27nt 27B

<400> 6
 gugcucguag gaguagugaa aggccag 27

<210> 7
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequence of 25nt 27B

<400> 7
 gcucguagga guagugaaag gccag 25

<210> 8
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequence of 23nt 27B

<400> 8
 ucguaggagu agugaaaggc cag 23

<210> 9
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sequence of 21nt 27B

<400> 9
 guaggaguag ugaaaggcca g 21

3/4

<210> 10
<211> 27
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequence of v27A

<400> 10
cuuccuacag cacaacaaau gugaug

27

<210> 11
<211> 27
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequence of v27B

<400> 11
gaaggauguc guguuguua cacuuac

27

<210> 12
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequence of v21A

<400> 12
uccuacagca caacaaugu g

21

<210> 13
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Sequence of v21B

<400> 13
gaaggauguc guguuguua c

21

<210> 14
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer-1 for VEGF

<400> 14
ccctgatgag atogagtaca tctt

24

<210> 15
<211> 18
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer-2 for VEGF

<400> 15

accgcctcgg cttgtcac

18

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer-1 for GAPDH

<400> 16

ggaaagctgt ggcgtgatg

19

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer-2 for GAPDH

<400> 17

ctgttgctgt agcgtattc

20

DESCRIPCIÓN

ARN BICATENARIO CON LÍPIDO MODIFICADO QUE TIENE UN POTENTE

EFEECTO DE INTERFERENCIA DEL ARN

5 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.

10

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.

20

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

25

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).

20

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

25

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.

5

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 codificante que tiene una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia objetivo en un gen objetivo, y una cadena anticodificante que tiene una secuencia de nucleótido complementaria a la cadena codificante, 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.

20

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.

25

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

secuencia objetivo en un gen objetivo, y una cadena anticodificante que tiene una secuencia de nucleótido complementaria a la cadena codificante, 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.

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
5 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
10 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.

15 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.

20 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
25 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

5

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:

- 5 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)

10

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)
 15 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

- 20 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
 25 reduciendo gradualmente la temperatura a 4°C. Los varios ARN bicatenario resultantes se electroforizados sobre un gen de poliacrilamida al 20% a 250 V durante 60 minutos, y luego confirmados al secar con un kit de tñido de plata (GE

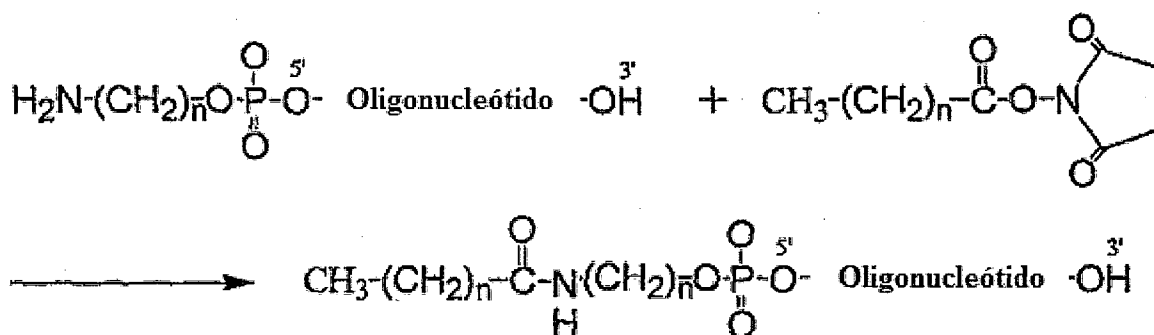
Health Care Bioscience). La FIG. 1A muestra las estructuras de los ARN bicatenario no modificados.

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

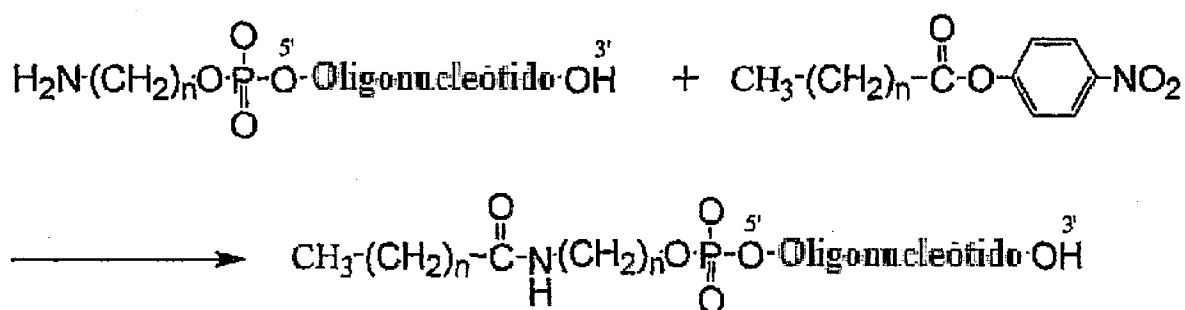
5 Luciferasa

Las cadenas codificantes con lípido modificado en la cual el lípido se ligó al extremo 5' de las cadenas codificantes de los ARN bicatenario capaces de inhibir la expresión del gen de luciferasa se sintetizaron. En estas cadenas codificantes con lípido modificado, el lípido estuvo covalentemente unido por vía de un grupo aminoalquilo (Modificador Amino C6; Glen Research) ligado al extremo 5' de las cadenas codificantes anteriormente mencionadas. Las cadenas codificantes con lípido modificado se sintetizaron al hacer reaccionar en una fase de líquido un compuesto de lípido que contiene un grupo éster activo (denominado a continuación como un "compuesto de lípido que contiene éster activo" con una cadena codificante modificada mediante la aminación del extremo 5' (Esquemas de Reacción 1 y 2).

Esquema de Reacción 1



Esquema de Reacción 2



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 Hayaski Kasei Co., Ltd. La cadena codificante resultante modificada con un grupo aminoalquilo en el extremo 5' tiene $-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}_2$ 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

79

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:	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{CUGGCCUUUCACUACUCCUACGAGCAC}-3'$	Rend. : <u>83.20 %</u>
27A1C12:	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{CUGGCCUUUCACUACUCCUACGAGCAC}-3'$	Rend. : <u>49.02 %</u>
25A1C16:	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{CUGGCCUUUCACUACUCCUACGAGC}-3'$	Rend. : <u>47.36 %</u>
23A1C16:	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{P}}}-\text{O}-\text{CUGGCCUUUCACUACUCCUACGA}-3'$	Rend. : <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 pareadas con las Cadenas anticodificantes para producir los ARN bicatenario con lípido modificado. Los ARN se cadena doble se formaron de acuerdo con el mismo procedimiento 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

5 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 2 μ M, se incubo a 37°C en un medio RPMI-1640 (Invitrogen) que contiene 10% de FBS (Sanko Junyaku, Co., Ltd.) (Volumen final: 110 μ l). 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 μ l de alícuota se muestreo y se inserto en un tubo de muestra que contiene 2 μ l de un tinte de carga. Con el fin de detener posteriormente la reacción de degradación, la muestra fue tomada rápidamente

10 Liofilizada en nitrógeno liquido 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

15 similarmente evaluadas por sus resistencias nucleasas. La Figura 3 muestra los resultados de la electroforesis de gel.

25 Como resultado, los 21siARN fueron rápidamente degradados en medio que contenía suero, y se confirmo 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 2 μ M 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 2 μ l de la solución de parada del Dicer (Gene Therapy Systems) en las soluciones de reacciones, seguido por la adición de 2 μ l 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 analizo 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

5 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.

10 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

15 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

20 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

25 Los efectos de interferencia de los ARN bicatenarios no modificados sintetizados y los ARN bicatenarios con lípido 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 agrego 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 (psiCHECK™ -2 Vector; Promega y Lipofectamina™ 2000 (nombre comercial; Invitrogen) se agrego 10 μ l por pozo que contiene las células HeLa. El vector de expresión se ajusto a 0.02 μ g por pozo, y la lipofectamina™ 2000 se ajusto a 0.2 μ g por pozo, y OptiMem (Invitrogen) se utilizo 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 se incubo 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 lipofectamina™ 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 la soluciones del complejo resultantes se agrego 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 lipofectamina™ 2000 se preparo al mezclar la solución de ARN acuoso a 5 μ l por pozo y una solución de lipofectamina™ 2000 (0.2 μ L) y OptiMem a 5 μ l por pozo, encubando 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 utilizados 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.

5 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

10 modificados con un líquido, 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

15 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

20 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 modifico con un lípido, también se encontró que se demostraron los efectos de interferencia del ARN mayores que los efectos suministrados mediante el 21nt si

25 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

5 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.

10 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
15 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 agrego 10µl por pozo que contiene las células HeLa. El vector de expresión se ajusto a 0.02 µg por pozo, y la lipofectamina™ 2000 se ajusto a 0.2 µg por pozo, y OptiMem (Invitrogen) se
20 utilizo 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
25 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 homóloga 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 1 µl y 10 µl 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 1 µM, 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 confirmó 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

5 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),
10 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
15 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
20 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
25 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

5 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

10 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

15 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.

20 En la evaluación utilizando un microscopio laser fluorescente confocal, se

utilizó un sistema Radiance 2000 (Bio Rad), y se observó fluorescencia utilizando

un laser 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

25 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 utilizo lifectaminaTM 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 liquido 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 e el extremo 5' de la cadena codificante, una eficiencia muy alta de la toma celular se observo 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:

5

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

10

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

21 siARN:

15

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

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

20

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

25

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.

93

Transformación de las cadenas dobles se confirmo mediante electroforesis de gel de acrilamida al 20% de acuerdo con el mismo procedimiento del ejemplo1.

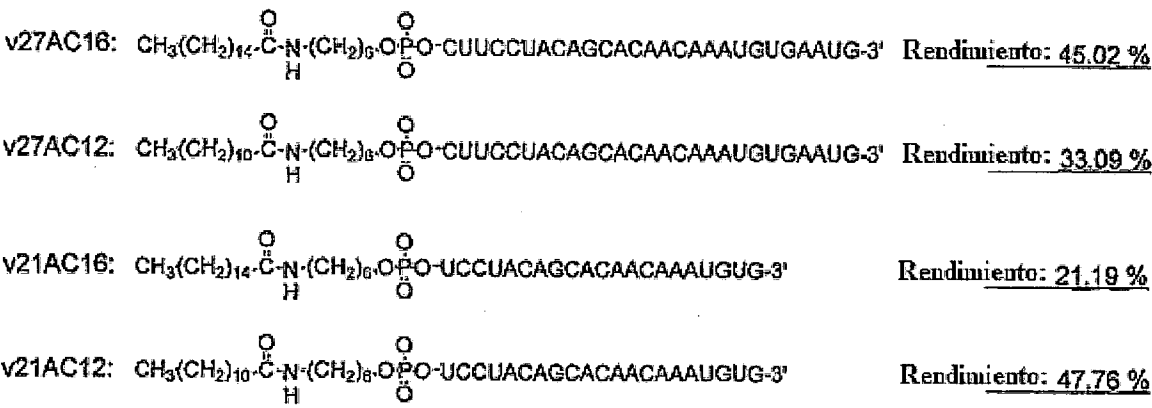
1-3. síntesis de los ARN bicatenario modificados con lípido que apuntan al gen de

5 VEGF

Los ARN bicatenario modificado con lípido en los cuales un lípido se ligo 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.

15

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



20

Las cadenas codificantes modificadas con lípido resultantes fueron pareadas con Cadenas anticodificantes para producir los ARN bicatenario modificados con

lípidos. La formación de cadenas dobles se confirmó mediante electroforesis de gel de acrilamida al 20% de acuerdo al mismo procedimiento del ejemplo 1. En la figura 8 se muestran las estructuras de los ARN bicatenarios modificados con lípidos. En los ARN modificados con lípidos que apuntan al gen de VEGF, los momentos de elusión también fueron los mismos sustancialmente que el ejemplo 1.

2. procesamiento mediante Dicer en los ARN bicatenarios modificados con lípidos que apuntan al gen VEGF

El procesamiento mediante el Dicer recombinante de los ARN bicatenarios modificados con lípidos y los ARN bicatenarios modificados con lípidos se evaluó. 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 de 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 bicatenarios modificados con lípidos

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 estomago 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 homologo 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 agrego un medio libre de antibiótico nuevo a 450 μ l por pozo. El medio MEM se utilizo para las células Hela, y el medio PRMI-640

se utilizo para los otras células. Un complejo de los ARN bicatenario modificados o no modificados con lípido (25 µl) que contienen una secuencia contra sentido homologa a la secuencia del gen VEGF con una solución lipofectaminaTM 2000 (Invitrogen) (25 µl) se formo, y entonces 50 µl de cada una de las soluciones de

5 ARN bicatenario se agrego 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 preparo 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

10 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

15 VEGF. El kit de RT-PCR Quiagen OneStep (Quiagen) se utilizo 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'-

20 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

25 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 completo 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 mRNA 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 grafica C en la figura 10-2 muestra los resultados para las células SH10-TC; la grafica D en la figura 10-3 muestra los resultados para las células Jurkat; y la grafica 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.

20 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.

25 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
5 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
10 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.

15

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
20 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
25 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.

10

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.

25

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 2.

REIVINDICACIONES

1. Un ARN bicatenario modificado con lípido que comprende una cadena codificante que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la
5 secuencia blanco en un gen objetivo, y una cadena anticodificante que tiene una secuencia de nucleótido complementaria a la cadena codificante, 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
10 ligador.
2. Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene un extremo truncado sobre el lado del extremo 5' de la cadena codificante, y tiene un extremo truncado o tiene un extremo en suspensión
15 sobre el lado del extremo 3' de la cadena codificante.
3. Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene extremos en suspensión sobre los lados extremos 5' y 3' de la cadena codificante.
20
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.
- 25 5. Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con la reivindicación 2 que tiene extremos truncados tanto sobre los lados de los extremos 5'

como 3' de la cadena codificante, y en la cual cada una de las cadenas codificantes y anticodificantes consiste de 27 nucleótidos.

5 6. Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con la reivindicación 2 que tiene extremos truncados sobre ambos lados de los extremos 5' como 3' de la cadena codificante, y en la cual cada una de las cadenas codificantes y anticodificantes consiste de 23 nucleótidos.

10 7. Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con la reivindicación 2 que tiene extremos truncados en el lado 5' codificante, y la cadena codificante consiste de 25 nucleótidos y la cadena anticodificante consiste de 23 nucleótidos.

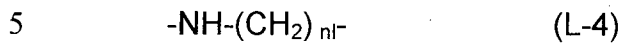
15 8. Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con la reivindicación 3 en donde cada una de las cadenas codificantes y anticodificantes consiste de 21 nucleótidos.

20 9. Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde el lípido es un ácido graso que tiene de 6 a 50 átomos de carbono.

25 10. Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en donde el lípido es ácido láurico, es ácido esteárico, ácido mirístico, o ácido palmítico.

11. Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 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 $n1$ es un entero de 1 a 40.

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

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

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

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

Resumen

5

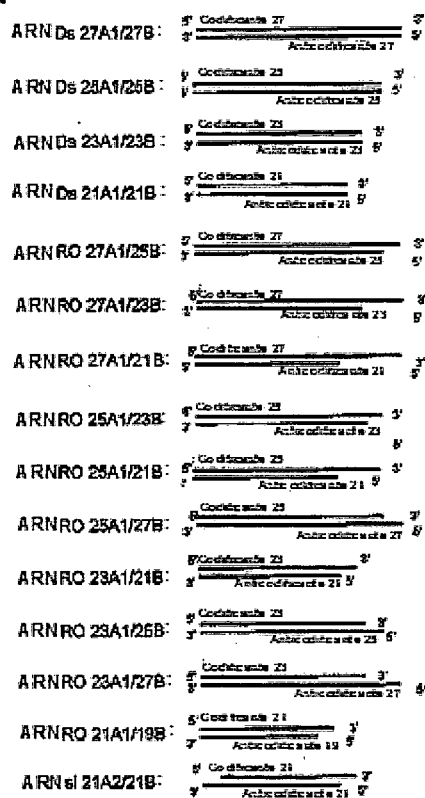
Un objeto de la presente invención es suministrar un ARN novedoso bicatenario que tiene alta resistencia a la nucleasa y alta eficiencia de tomas celular, y que es capaz de producir un excelente efecto en la interferencia del ARN. La presente invención suministra un ARN bicatenario con lípido modificado que comprende

10 una cadena codificante que tiene una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia objetivo, y una cadena contrasentido que tiene una secuencia de nucleótido complementaria a la cadena codificante, el ARN bicatenario es capaz de inhibir la expresión del gen objetivo, la cadena codificante tiene un lípido ligado a al menos uno de los primeros seis nucleótidos desde el lado del extremo 5'

15 directamente o por vía de un ligador.

Fig. 1

A



B



(X = 12 o 16, n = 10 o 14)

Fig. 2

27A1: 5'-CUGGCCUUUCAGUACUCCUACGAGCAG-3'

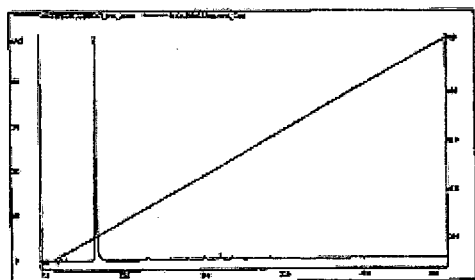
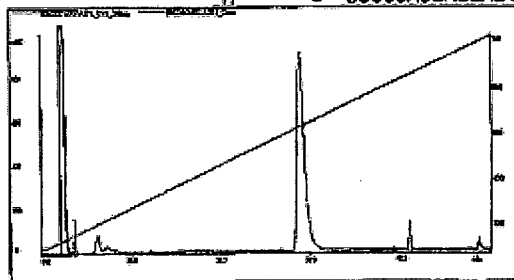
27A1C19: CH₃(CH₂)₁₄-C(=O)-N(CH₂)₆-O-P(=O)(OH)-O-CUGGCCUUUCAGUACUCCUACGAGCAG-3'

Fig. 3

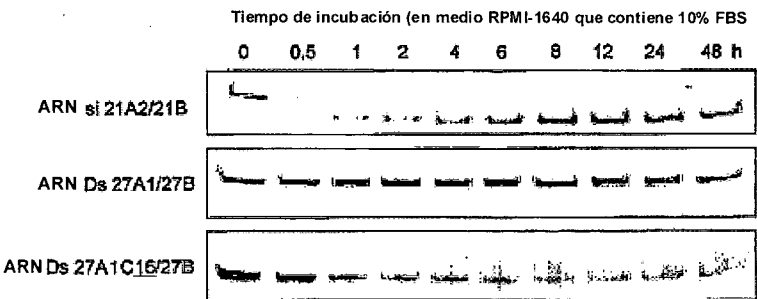


Fig. 4

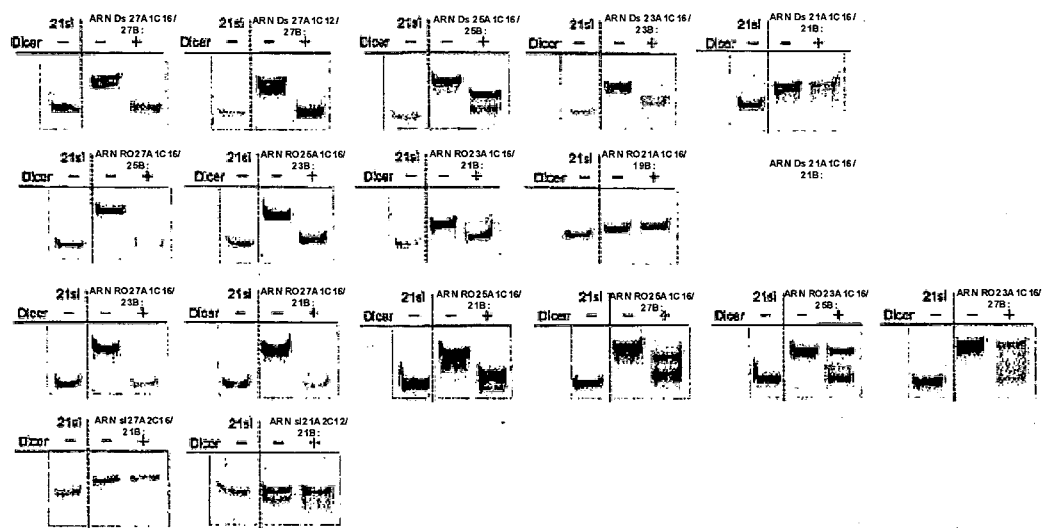


Fig. 5

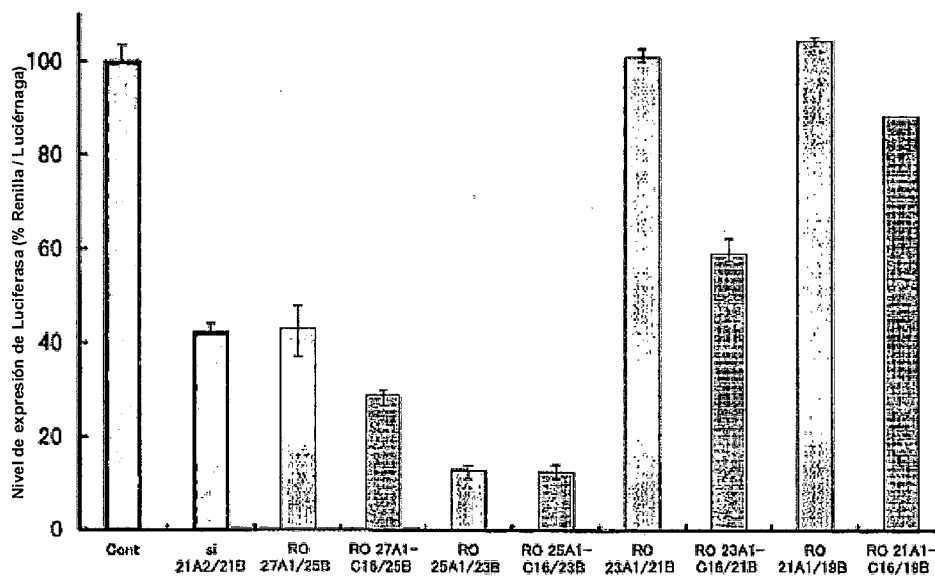
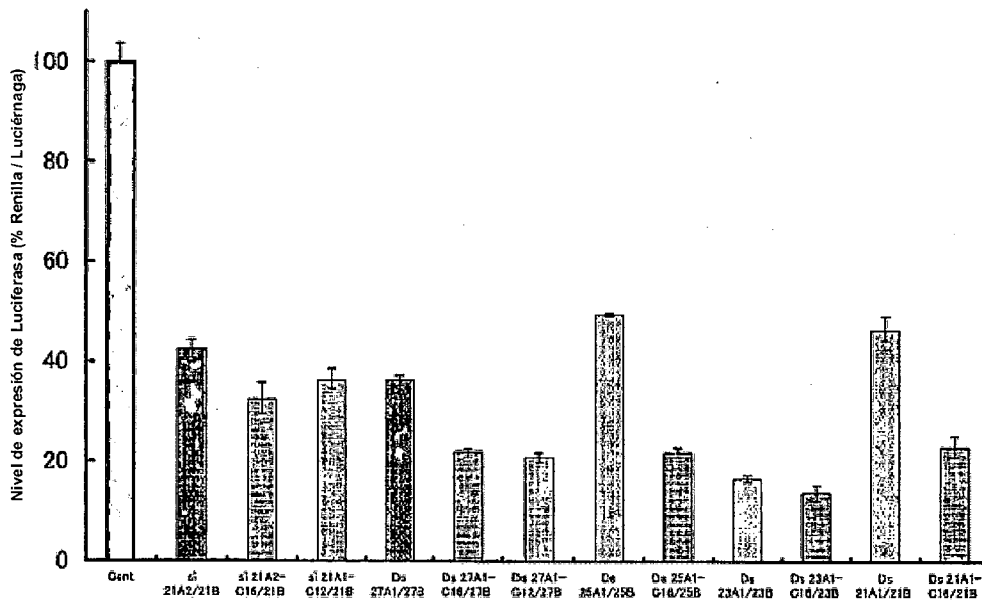


Fig. 6

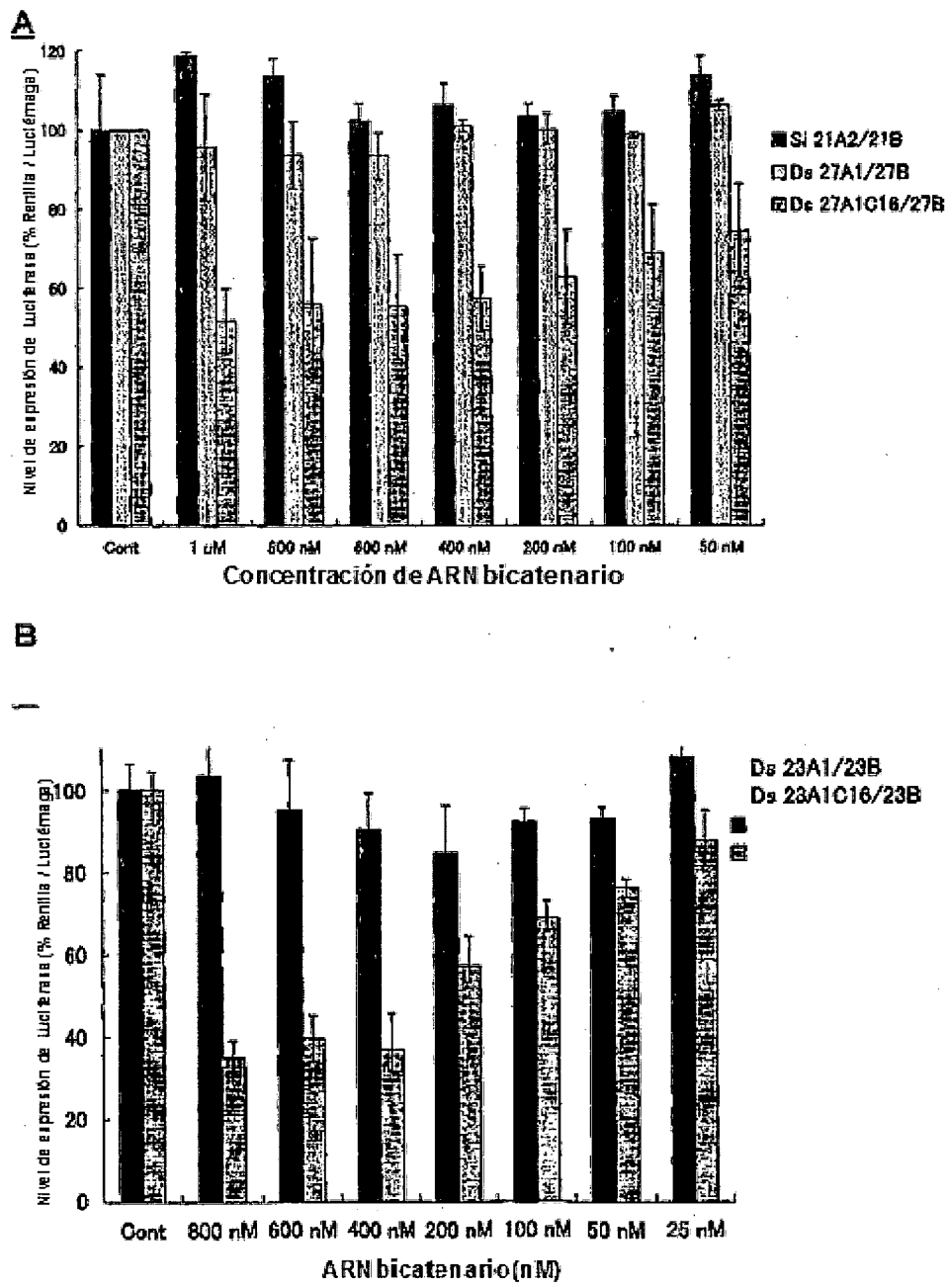


Fig. 7-1

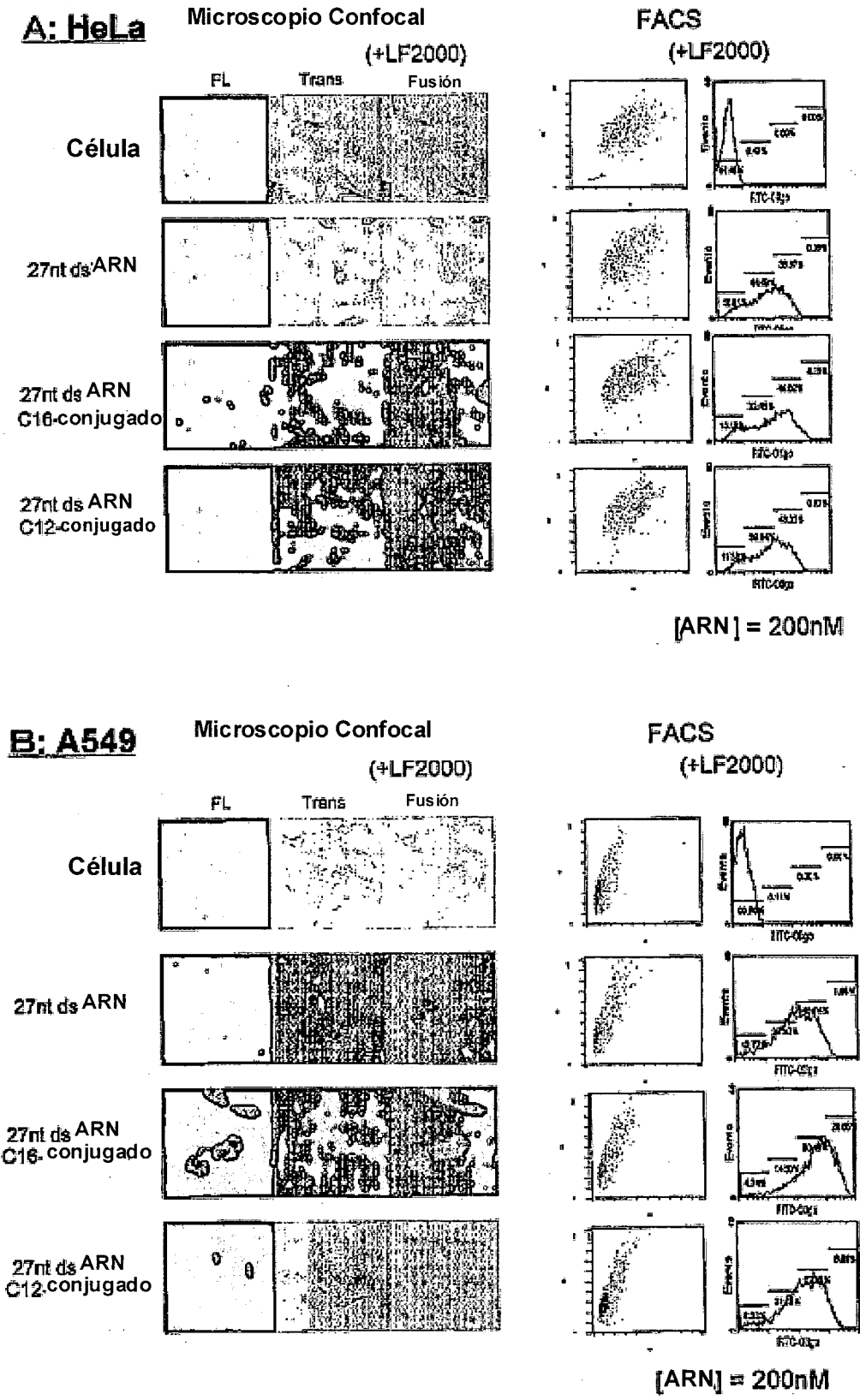


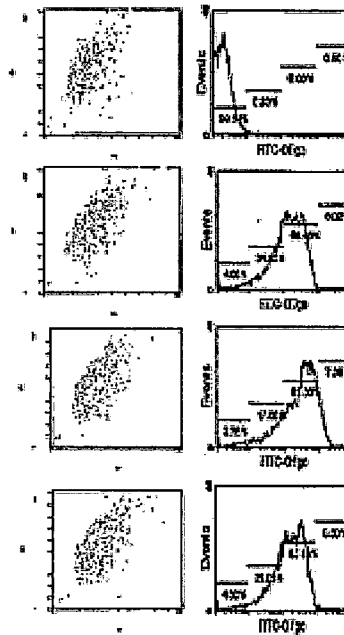
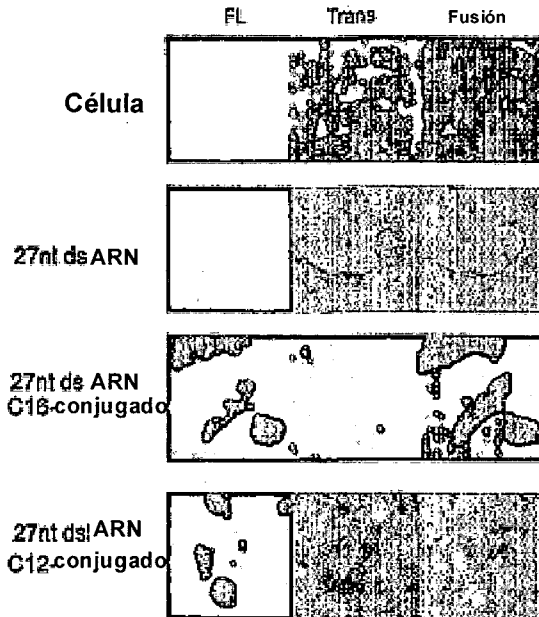
Fig. 7-2

C: SH10-TC

Microscopio Confocal
(+LF2000)

FACS

(+LF2000)



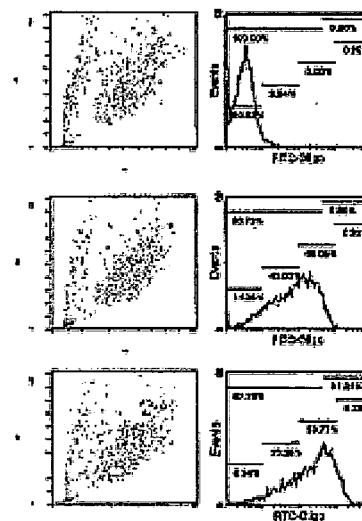
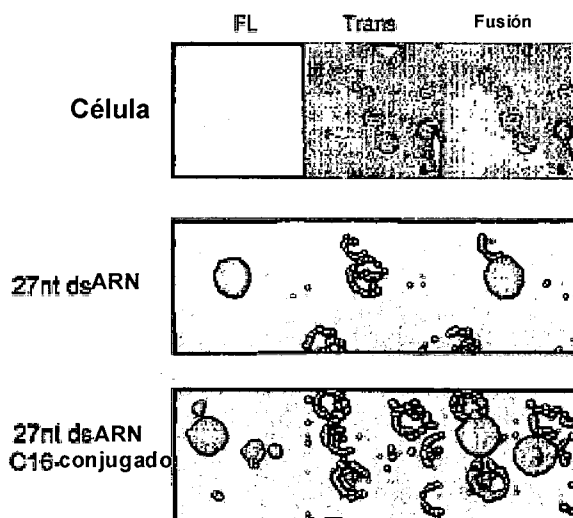
[ARN] = 200nM

D: K-562

Microscopio Confocal
(+LF2000)

FACS

(+LF2000)



[ARN] = 500nM

Fig. 7-3

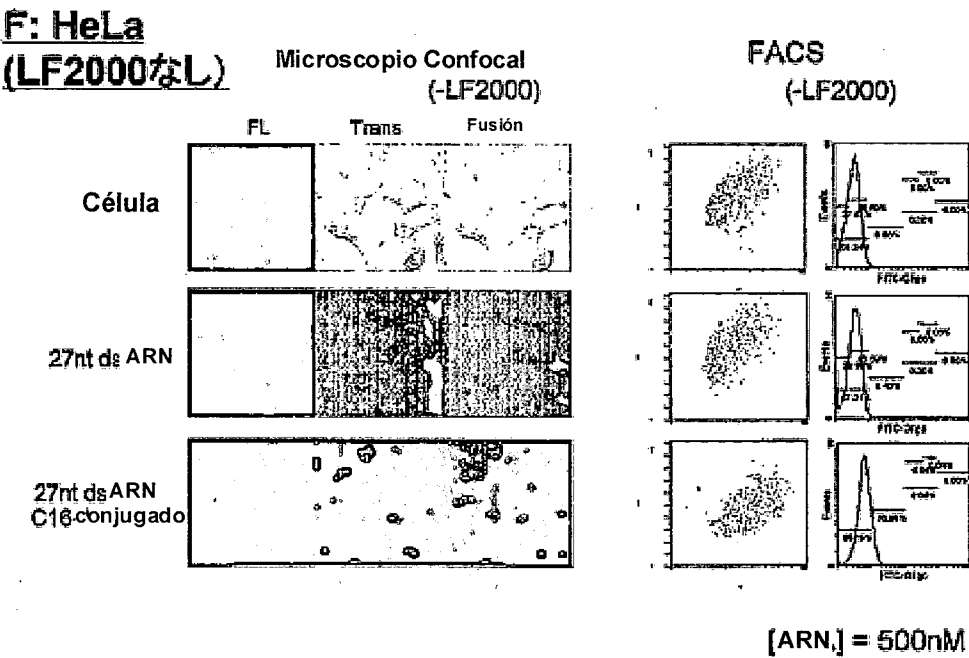
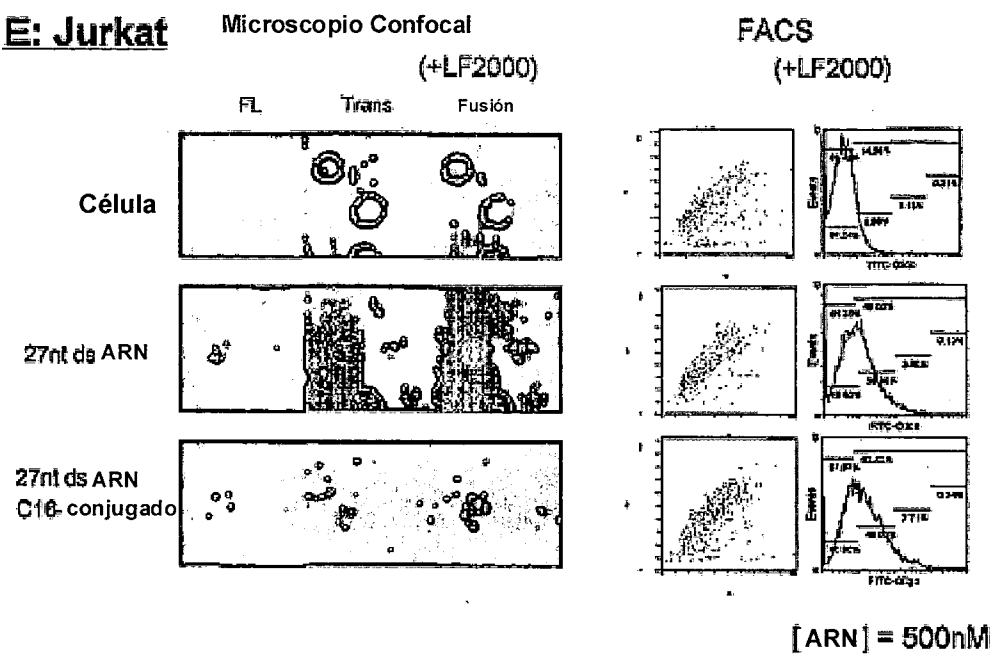


Fig. 3

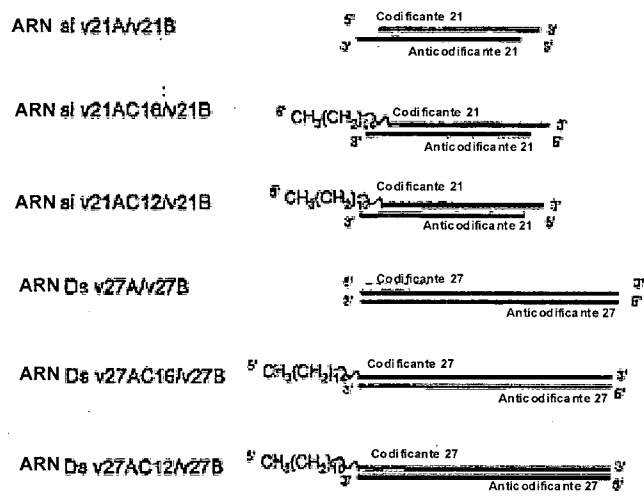


Fig. 9

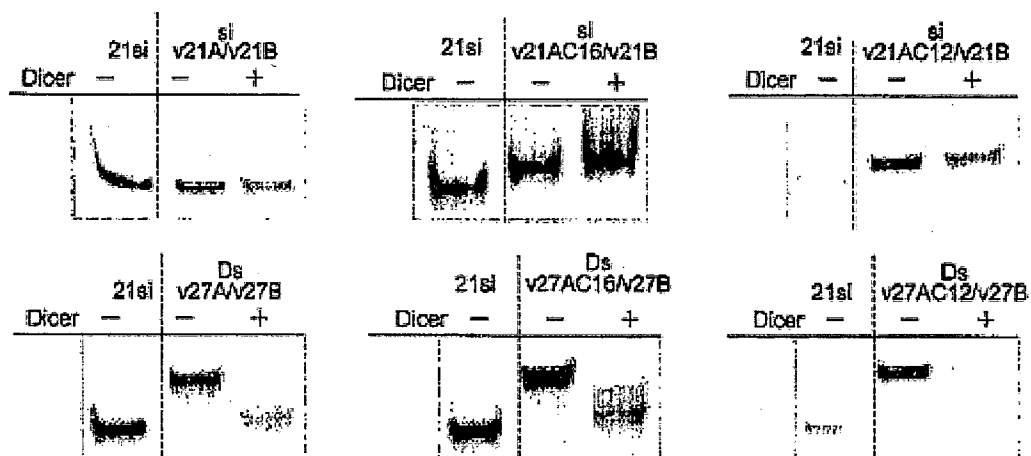


Fig. 10-1

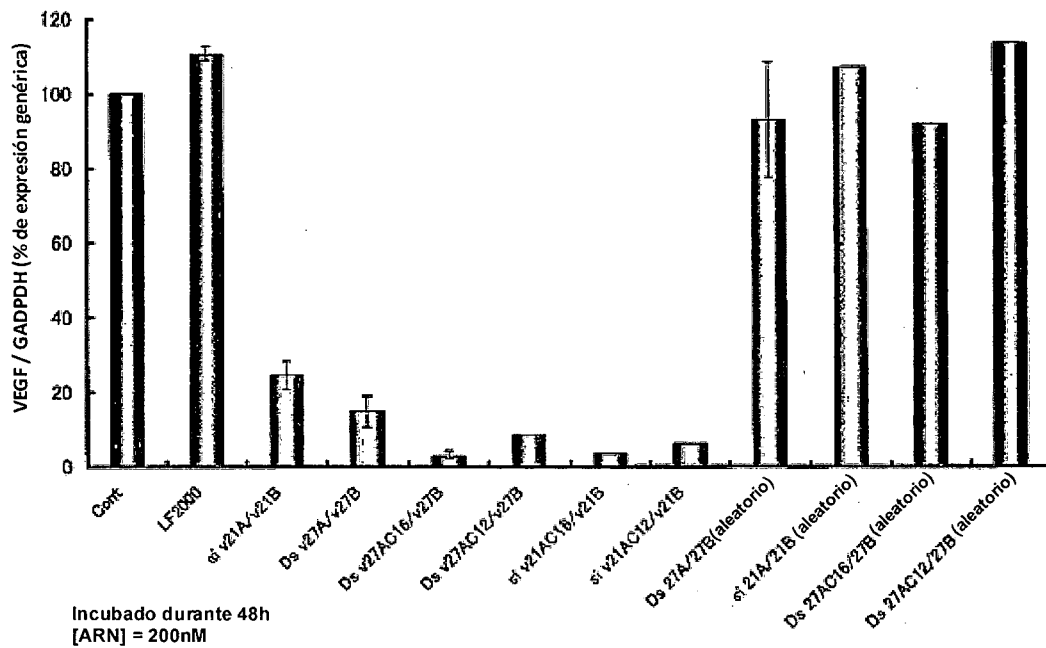
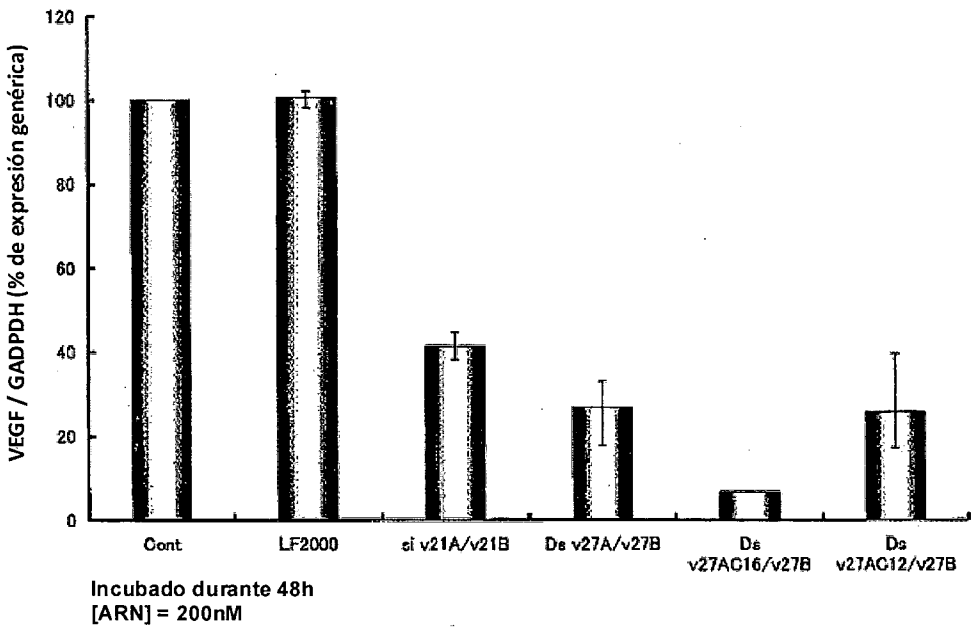
A: HeLa

Fig. 10-2

B: A549



C: SH10-TC

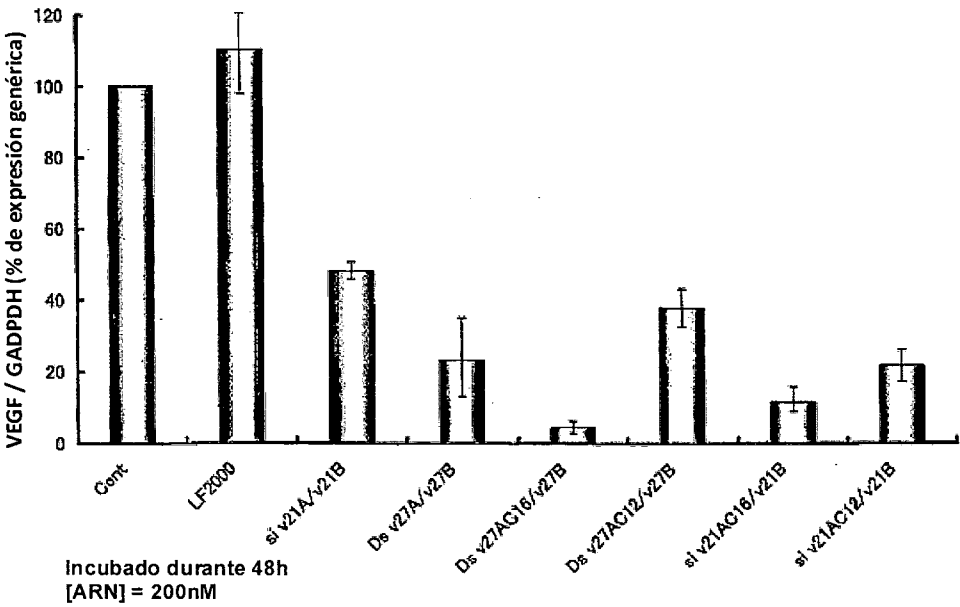
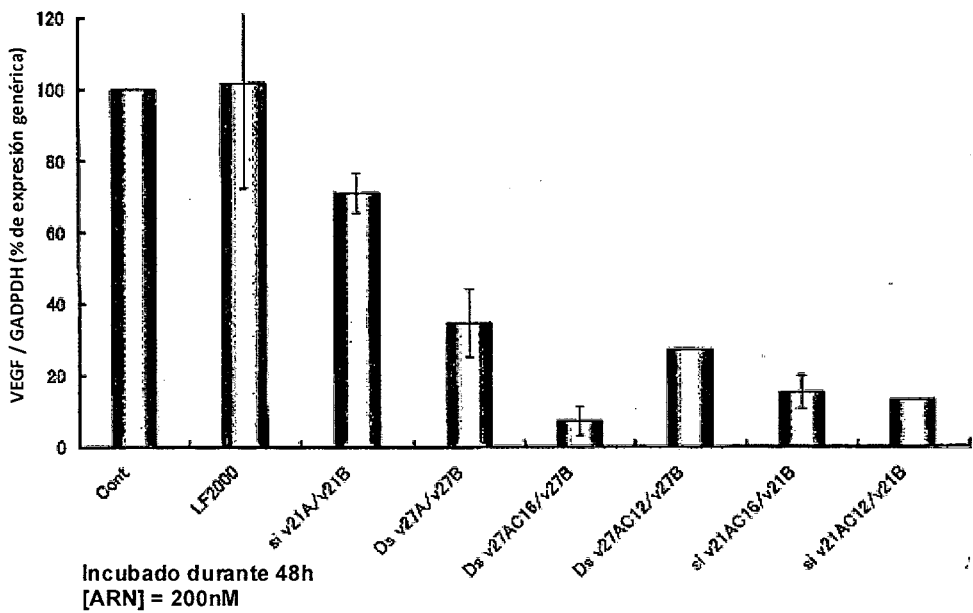
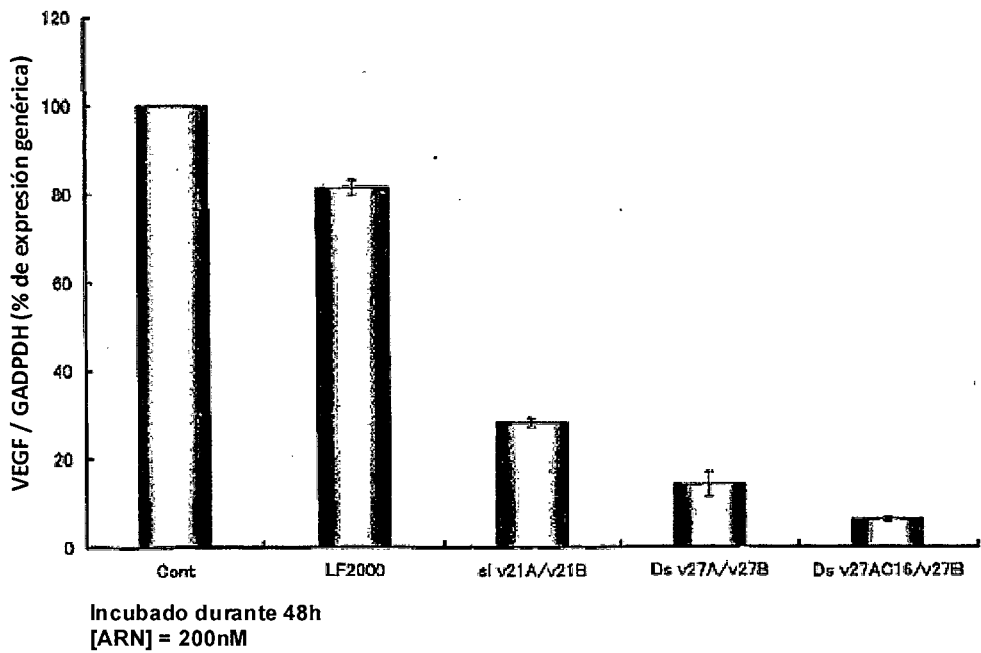


Fig. 10-3

D: Jurkat



E: K-562



1/4
LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA Y CIENCIAS INDUSTRIALES AVANZADAS
<110> OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., L TD.
<110> HAYASHI KASEI CO., L TD.
<120> ARN BICATENARIO CON LÍPIDO MODIFICADO QUE TIENE UN POTENTE EFECTO DE INTERFERENCIA DEL ARN

<130> P08-117

<150> JP 2007-276985
<151> 2007-10-24

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 27
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Sequence of 27nt 27A1

<400> 1
cuggccuuuc acuacuccua cgagcac 27

<210> 2
<211> 25
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de 25nt 25A1

<400> 2
cuggccuuuc acuacuccua cgagc 25

<210> 3
<211> 23
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de 23nt 23A1

<400> 3
cuggccuuuc acuacuccua oga 23

<210> 4
<211> 21
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de 21nt 21A1

<400> 4

2/4	
cuggccuuuc acuacuccua c	21
<210> 5	
<211> 21	
<212> ARN	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Secuencia de 21nt 21A2	
<400> 5	
ggccuuuac uacuccuaag a	21
<210> 6	
<211> 27	
<212> ARN	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Secuencia de 27nt 27B	
<400> 6	
gugcucguag gaguagugaa aggccag	27
<210> 7	
<211> 25	
<212> ARN	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Secuencia de 25nt 27B	
<400> 7	
gcucguagga guagugaaag gccag	25
<210> 8	
<211> 23	
<212> ARN	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Secuencia de 23nt 27B	
<400> 8	
ucguaggagu agugaaaggc cag	23
<210> 9	
<211> 21	
<212> ARN	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Sequence of 21nt 27B	
<400> 9	
guaggaguag ugaaaggoca g	21

3/4

<210> 10
<211> 27
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de v27A

<400> 10
cuuccuacag cacaacaaau gugaug 27

<210> 11
<211> 27
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de v27B

<400> 11
gaaggauugc guguguuua cacuuac 27

<210> 12
<211> 21
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de v21A

<400> 12
uccuacagca caacaaugu g 21

<210> 13
<211> 21
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de v21B

<400> 13
gaaggauugc guguguuua c 21

<210> 14
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador PCR-1 para VEGF

<400> 14
oootgatgag atcgagtaca tctt 24

<210> 15
<211> 18
<212> ADN

4/4

<213> Artificial

<220>

<223> cebador PCR-2 para VEGF

<400> 15

accgcctcgg cttgtoac

18

<210> 16

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador PCR-1 para GAPDH

<400> 16

ggaaagctgt gccgtgatg

19

<210> 17

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador PCR-2 para GAPDH

<400> 17

ctgttgctgt agcgtattc

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/JP2008/069829

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BEILSTEIN Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/022470 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; UNIV MASSACHUSETTS [US]; MANOHARAN M) 22 February 2007 (2007-02-22) paragraph [0152] - paragraph [0166] paragraph [0310] - paragraph [0311]	1-14
X	WO 2004/065601 A2 (RIBOPHARMA AG [DE]; PHILIPP HADWIGER [DE]; MATTHIAS JOHN [DE]; LORENZ) 5 August 2004 (2004-08-05) page 4, line 1 - page 6, line 15 page 14, line 27 - page 15, line 40 page 16, line 16 - line 29 ----- -/--	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 November 2009

Date of mailing of the international search report

18/12/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kukolka, Florian

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/JP2008/069829

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WOLFRUM CHRISTIAN ET AL: "Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 25, no. 10, 1 October 2007 (2007-10-01), pages 1149-1157, XP002493037 ISSN: 1087-0156 [retrieved on 2007-09-16] the whole document	1-14
X	DE PAULA DANIEL ET AL: "Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting" RNA, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, WOODBURY, NY, US, vol. 13, no. 4, 1 April 2007 (2007-04-01), pages 431-456, XP002519468 ISSN: 1355-8382 the whole document	1-14
X	KUBO TAKANORI ET AL: "Modified 27-nt dsRNAs with dramatically enhanced stability in serum and long-term RNAi activity" OLIGONUCLEOTIDES, MARY ANN LIEBERT, NEW YORK, NY, US, vol. 17, no. 4, 25 September 2007 (2007-09-25), pages 445-464, XP002537984 Internet ISSN: 1545-4576 the whole document	1-8, 11-14
X,P	KUBO T ET AL: "Chemically modified symmetric and asymmetric duplex RNAs: An enhanced stability to nuclease degradation and gene silencing effect" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 365, no. 1, 4 January 2008 (2008-01-04), pages 54-61, XP022680920 ISSN: 0006-291X [retrieved on 2007-10-29] the whole document	1-5,8, 11-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/JP2008/069829

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007022470 A2	22-02-2007	AU 2006279280 A1	22-02-2007
		CA 2619534 A1	22-02-2007
		EP 1937066 A2	02-07-2008
		JP 2009504782 T	05-02-2009
		US 2007161591 A1	12-07-2007
		US 2007105803 A1	10-05-2007
		WO 2007022506 A2	22-02-2007
WO 2004065601 A2	05-08-2004	AT 367441 T	15-08-2007
		AU 2004206255 A1	05-08-2004
		AU 2008203538 A1	28-08-2008
		CA 2513809 A1	05-08-2004
		DE 10302421 A1	29-07-2004
		DE 602004007620 T2	10-04-2008
		DK 1587926 T3	19-11-2007
		EP 1587926 A2	26-10-2005
		ES 2289474 T3	01-02-2008
		PT 1587926 E	26-10-2007
		US 2006178324 A1	10-08-2006

(21) N° de solicitud:				(51) Int Cl: A61K 047/048	
22) Fecha de solicitud:				(71)Solicitante(s) NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY Y OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.	
(30) Prioridad	(31) Prioridad	(32) Fecha	(33) País	(72) Inventor(es) TAKANORI KUBO Y OTROS	
	2007-276985	24/10/2007	JP	(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 24/05/2010				(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT				Fecha: 30/04/2009	
Fecha de presentación de la solicitud: 24/10/2008				N° publicación: WO 2009/054551 A3	
No. de solicitud PCT/JP2008/069829					
(54) Titulo: ARN BICATENARIO CON LÍPIDO MODIFICADO QUE TIENE UN POTENTE EFECTO DE INTERFERENCIA DEL ARN					

Reivindicación(es):

- Un ARN bicatenario modificado con lípido que comprende una cadena codificante que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia blanco en un gen objetivo, y una cadena anticodificante que tiene una secuencia de nucleótido complementaria a la cadena codificante, 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.
- Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene un extremo truncado sobre el lado del extremo 5' de la cadena codificante, y tiene un extremo truncado o tiene un extremo en suspensión sobre el lado del extremo 3' de la cadena codificante.
- Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene extremos en suspensión sobre los lados extremos 5' y 3' de la cadena codificante.
- 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.
- Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con la reivindicación 2 que tiene extremos truncados tanto sobre los lados de los extremos 5' como 3' de la cadena codificante, y en la cual cada una de las cadenas codificantes y anticodificantes consiste de 27 nucleótidos.
- Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con la reivindicación 2 que tiene extremos truncados sobre ambos lados de los extremos 5' como 3' de la cadena codificante, y en la cual cada una de las cadenas codificantes y anticodificantes consiste de 23 nucleótidos.
- Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con la reivindicación 2 que tiene extremos truncados en el lado 5' codificante, y la cadena codificante consiste de 25 nucleótidos y la cadena anticodificante consiste de 23 nucleótidos.

- 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.
- Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde el lípido es un ácido graso que tiene de 6 a 50 átomos de carbono.
- Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en donde el lípido es ácido láurico, es ácido esteárico, ácido mirístico, o ácido palmítico.
- Un ARN bicatenario modificado con lípido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 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.
$$-NH-(CH_2)_{nl}- \quad (L-4)$$

en donde nl es un entero de 1 a 40.

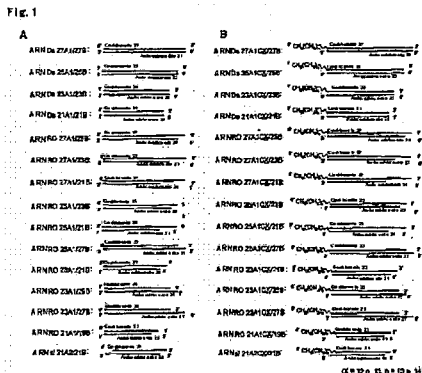
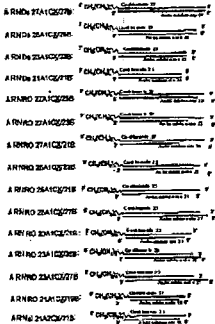


FIG. 1

A



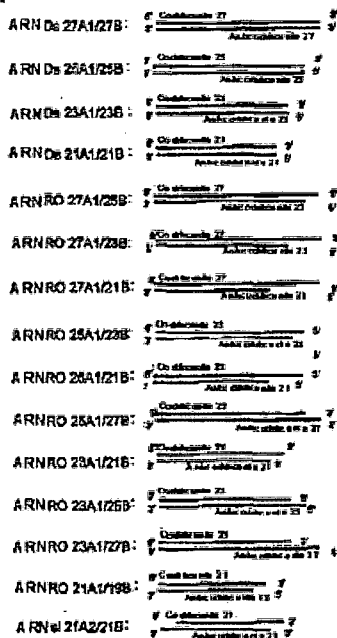
B



(x = 12, y = 10, z = 14)

Fig. 1

A



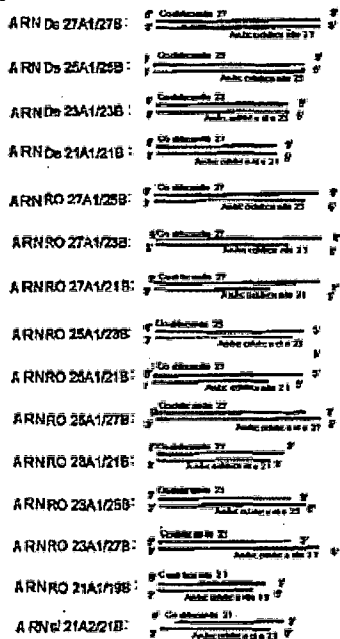
B



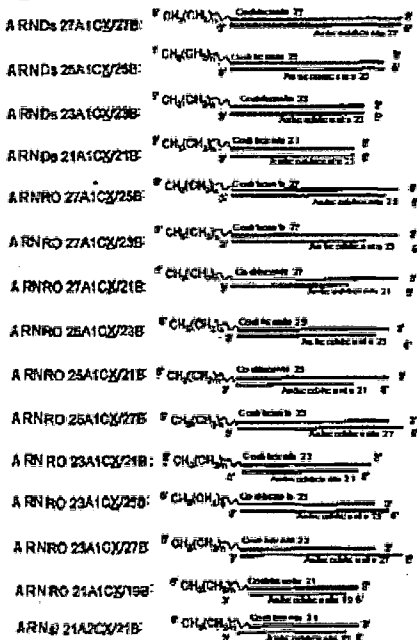
(X = 12 o 16, n = 10 o 14)

Fig. 1

A



B



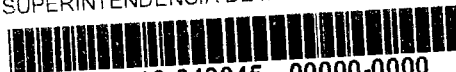
(X = 12, 15, n = 10, 14)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 24,713
FECHA : ABRIL 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-048045- -00000-0000

Fecha: 2010-04-23 16:10:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 128

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175534531	31/03/2010	95,531,000.00

**** CONCEPTO ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

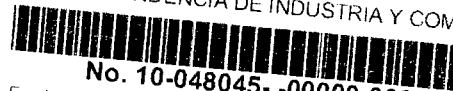
0010: 17572 - 841 - 001-0

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 27,478
FECHA : ABRIL 12 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-048045- -00000-0000

Fecha: 2010-04-23 16:10:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 128

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175534542	12/04/2010	49,791,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	*** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL
			26,000.00
		TOTAL :	\$ 26,000.00

SON: VEINTISEIS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

0010:17572-841-001-0

128

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 27,494
FECHA : ABRIL 12 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-048045-00000-0000
Fecha: 2010-04-23 16:10:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 128

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175534542	12/04/2010	49,791,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-08	PRORROGA DE TERMINOS	83,000.00
		*** N.CREACION PRORROGA DE TERMINOS D	
		TOTAL :	\$ 83,000.00

SON: OCHENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

0020: 17572 841-001-0



No. 10-048045- -00000-0000

Fecha: 2010-04-23 16:10:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 128

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐ Descripción de la invención
☐ Dibujos de ser estos pertinentes
☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒ Dibujos de ser estos pertinentes
☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO LTD

REFERENCIA	Radicación No.	10 048045
	Solicitud internacional	PCT/JP2008/069829
	Fecha inicio fase nacional	24/05/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	<u>007107</u>

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

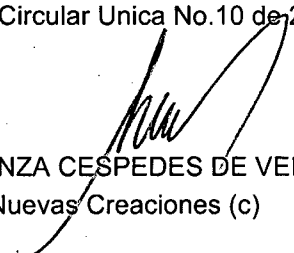
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 10 048045

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

04 JUN. 2010

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11